

主論文

MET or *NRAS* amplification is an acquired resistance mechanism to the third-generation EGFR inhibitor naquotinib
(*MET*増幅および *NRAS*増幅は第3世代 EGFR 阻害剤ナコチニブの獲得耐性機構である)

【緒言】

上皮成長因子受容体 (*EGFR*) の体細胞突然変異の発見と *EGFR* チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の登場により *EGFR* 変異を有する非小細胞肺癌患者の予後は劇的に改善した。ただし、それらの肺癌は第 1-2 世代 *EGFR*-TKI に約 12 ヶ月程度で耐性となる。複数の研究において、*EGFR T790M* 点突然変異が最も高頻度な耐性メカニズムであることが明らかになっており、それを克服した第 3 世代 *EGFR*-TKI が開発され、その一つであるオシメルチニブは *EGFR T790M* を有する肺癌患者の予後をさらに改善させた。

しかし、残念ながら第 3 世代 *EGFR*-TKI への獲得耐性は避けられない。*EGFR T790M* 変異を有する肺癌に対する第 3 世代 *EGFR*-TKI の無増悪生存期間中央値は 10 ヶ月程度であり、未だ不十分である。いくつかの耐性メカニズムがすでに非臨床及び臨床において報告されているが、第 3 世代 *EGFR*-TKI の薬剤別に阻害活性は異なると思われ、それらの耐性メカニズムはまだ十分には検討されていない。

我々は、第 3 世代 *EGFR*-TKI であるナコチニブの耐性メカニズムを説明するため、第 1-2 世代 *EGFR*-TKI に感受性及び耐性の細胞株を用いてナコチニブ耐性株を樹立し、次世代シーケンサーを用いた包括的検討を行った。さらに、ナコチニブがオシメルチニブ耐性肺癌細胞株に有益かどうか検討した。

【材料と方法】

細胞株(ヒト)

PC-9 細胞 (*EGFR Ex19 del E746_A750*)

RPC-9 細胞 (ゲフィチニブ耐性: *EGFR Ex19 del E746_A750* and *Ex20 T790M*)

PC-9/BRc1 細胞 (アファチニブ耐性: *EGFR Ex19 del E746_A750* and *Ex20 T790M*)

試薬

EGFR-TKI; ゲフィチニブ (第 1 世代)、アファチニブ (第 2 世代)、オシメルチニブ (第 3 世代)、ナコチニブ (第 3 世代)

MET チロシンキナーゼ阻害剤; クリゾチニブ、SGX-523

MEK 阻害剤; セルメチニブ、トラメチニブ

In vitro 実験の主な方法

MTT アッセイ(細胞増殖抑制アッセイ)を用いて、それぞれの細胞株において各薬剤の細胞増殖抑制の程度を評価した。定量 PCR、FISH アッセイ、ダイレクトシーケンスを用いて、各細胞株の DNA を評価した。ウエスタンブロット法、免疫染色(IHC)、リン酸化チロシンキナーゼ(RTK)アレイキットを用いて、各細胞株の蛋白レベルを評価した。

ターゲット RNA シーケンス解析(次世代シーケンサー)

細胞株から抽出した RNA を用いて、SureSelect RNA Human Kinome Kit (Agilent Technologies)による 612 遺伝子(517 個のヒト蛋白キナーゼ遺伝子及びその関連遺伝子)のターゲットシーケンス解析を行った。シーケンス解析は、次世代シーケンサー(MiSeq)を用いて行った。

動物実験(マウス)

7 週齢の BALB/c nu/nu マウス(雌)にナコチニブ耐性細胞株(200 万個)を 2 か所皮下移植した。腫瘍が 100mm³程度の大きさになった頃に 4 群に分け、vehicle、ナコチニブ(50mg/kg)、クリゾチニブ(25mg/kg)、その 2 剤の併用を週 5 日、4 週間投与した。

【結果】

それぞれのナコチニブ耐性株の遺伝子発現プロファイルには共通性がない

まず、我々は PC-9 のナコチニブ耐性株:PC-9/NaqR、RPC-9 のナコチニブ耐性株:RPC-9/NaqR、PC-9/BRc1 のナコチニブ耐性株:PC-9/BRc1/NaqR を樹立した。それぞれの耐性株は、すべての世代の EGFR-TKI に交叉耐性を来していた。キナーゼを用いたターゲット RNA シーケンス解析では、耐性株に共通してみられる遺伝子発現の変化は認められなかった。

PC-9/NaqR 耐性株の MET 発現には不均一性がある

PC-9/NaqR は、RTK アレイ解析で MET リン酸化の上昇を認めた。しかし PC-9/NaqR は、MET 阻害剤とナコチニブの併用で細胞増殖抑制を認めなかった。単一細胞クローニングを行うと、ウエスタンブロット法では MET リン酸化に不均一性があり、PC-9/NaqRc2 のみ MET リン酸化を強く認めた。免疫染色では PC-9/NaqR 細胞の MET 蛋白の不均一性が確認できた。PC-9/NaqRc2 は、FISH アッセイ、定量 PCR において、MET 増幅を認めた。PC-9/NaqRc2 を用いた MTT アッセイ及びウエスタンブロット法では、ナコチニブと MET 阻害剤の併用効果を認めた。PC-9/NaqRc2 を用いた動物実験モデルでは、ナコチニブと MET 阻害剤の併用が最も腫瘍増殖を抑制することができた。以上より、ナコチニブの耐性メカニズムの1つは MET 増幅であることを明らかにした。

RPC-9/NaqR 耐性株は NRAS 増幅を有する

RPC-9/NaqR は、キナーゼを用いたターゲット RNA シーケンス解析において NRAS の高発現

を認め、**NRAS** 活性アッセイにてその活性化が確認された。定量 PCR において、**NRAS** 増幅を認め、単一細胞クローニングでも **NRAS** 増幅はそれぞれの細胞で維持されていた。**RAS/MAPK** 経路の阻害剤である **MEK** 阻害剤とナコチニブの併用は、**RPC-9/NaqR** の細胞増殖を **MTT** アッセイ、ウエスタンブロット法で抑制できることが確認できた。以上より、ナコチニブの耐性メカニズムの1つは **NRAS** 増幅であることを明らかにした。

ナコチニブと **MEK** 阻害剤の併用効果

RPC-9/NaqR は、ナコチニブと **MEK** 阻害剤の併用で細胞増殖の抑制効果が見られたが、別の第 3 世代 **EGFR-TKI** であるオシメルチニブと **MEK** 阻害剤の併用ではその効果が見られなかった。その効果の違いを検証するため、我々は **RPC-9** のオシメルチニブ耐性株である **RPC-9/OsiR** を樹立し評価した。**RPC-9/OsiR** において、ナコチニブと **MEK** 阻害剤の併用は細胞増殖を抑制できたが、オシメルチニブと **MEK** 阻害剤の併用は細胞増殖抑制効果が弱かった。その違いの原因として、ウエスタンブロット法においてナコチニブがより **AKT** のリン酸化を抑制していたため、ナコチニブの特性として **EGFR** 阻害効果以外に **AKT** 経路の阻害作用を有することが示唆された。

【考察】

EGFR 変異肺癌に対して第 3 世代 **EGFR-TKI** の耐性機序を解明すること及びその新規治療戦略を開発することは優先課題である。この研究では、我々はナコチニブと **MEK** 阻害剤の併用効果がオシメルチニブ耐性株に対して有用であることを示した。但し、その併用療法の高い効果の正確な作用機序は示されなかった。仮説として、ナコチニブのオフターゲット効果として **AKT** 経路を阻害しており、**MEK** 阻害剤との相乗効果が高いことが考えられた。

我々は、**MET** もしくは **NRAS** の増幅がナコチニブの耐性において臨床的に治療標的となり得る機序であることを明らかにした。**MET** 増幅はすでに第 1-3 世代 **EGFR-TKI** の耐性機序としていくつかの研究で報告されており、さらに臨床試験において **EGFR-TKI** と **MET** 阻害剤の併用療法も試みられている。**RAS** 経路の活性もまた **EGFR-TKI** の耐性機序として報告されているが、**RAS** 経路を直接阻害させる薬は現在開発されていない。**RAS** 経路の下流にあたる **MEK** 阻害剤の併用の有用性が我々の試験と同様に報告されている。纏めると、第 3 世代 **EGFR-TKI** の耐性の克服として **MET** 阻害剤や **MEK** 阻害剤の上乗せは有望な治療戦略となる可能性がある。

第 3 世代 **EGFR-TKI** は複数存在し、その耐性機序や臨床効果の違いなどから薬剤別で効果が異なる可能性が示唆されている。**EGFR** 変異肺癌に対しオシメルチニブはすでに標準治療の一つであり、その耐性に対しナコチニブと **MEK** 阻害剤の併用が有用な可能性がある。

【結論】

ナコチニブの獲得耐性機構の一つは **MET** もしくは **NRAS** の増幅であることを明らかにした。ナコチニブと **MEK** 阻害剤の併用は、オシメルチニブ耐性肺癌に有用な可能性がある。