

## 主論文

### Combined effect of cabozantinib and gefitinib in crizotinib-resistant lung tumors harboring ROS1 fusions

(クリゾチニブ耐性 ROS1融合遺伝子陽性肺癌に対するカボザンチニブとゲフィチニブの併用療法による効果)

#### 【緒言】

Oncogenic driver 遺伝子と当該遺伝子に対応する分子標的薬の発見は、この15年間の非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療を大きく変化させた。c-ros oncogene 1 (ROS1) 融合遺伝子も、Oncogenic driver 遺伝子の一つであり、NSCLC 患者の1-2%に認められる。また、ROS1融合遺伝子に対して、MET/ALK/ROS1を標的とした ALK/ROS1阻害剤としてクリゾチニブが薬事承認されており、ROS1融合遺伝子を有する NSCLC に対して著明な有効性を示している。しかしながら、ROS1融合遺伝子を有する NSCLC は、必然的にクリゾチニブに対する耐性を獲得するため増悪する。したがって、クリゾチニブに耐性を獲得した後の新たな治療戦略が必要とされている。

クリゾチニブに対する耐性機序について、複数の研究により、G2032R 等の ROS1キナーゼドメインの二次突然変異が報告されているものの、未だ十分には明らかにされていない。

今般、我々は、クリゾチニブに対する耐性機序を明らかにするために、SLC34A2-ROS1融合遺伝子を有する HCC78細胞からクリゾチニブ耐性株を樹立した。分析した結果、上皮成長因子受容体 (EGFR)、EGFR のリガンドの一つである HB-EGF 及び受容体チロシンキナーゼである AXL が、クリゾチニブに対する耐性獲得に起因していることが明らかとなった。また、EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) であるゲフィチニブと AXL 阻害剤であるカボザンチニブとの併用投与は、*in vitro* 及び *in vivo* で、クリゾチニブに耐性を獲得した腫瘍についても有効性を示した。

#### 【材料と方法】

##### 細胞株(ヒト)

HCC78細胞 (SLC34A2-ROS1融合遺伝子)

ABC-20細胞 (CD74-ROS1融合遺伝子)

##### クリゾチニブ耐性細胞株の樹立

HCC78細胞を、IC50値よりも低い0.2 $\mu$ mol/L からクリゾチニブ濃度を徐々に上昇させ、4か月かけて耐性株を樹立した (HCC78R 細胞と命名した)。最終的に2 $\mu$ mol/L のクリゾチニブ投与下で HCC78R が増殖することを確認した。

## 試薬

ROS1阻害剤:クリゾチニブ、セリチニブ、ブリガチニブ、ロルラチニブ

AXL 阻害剤:カボザンチニブ、ジルテリチニブ

EGFR-TKI:アファチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ

抗 EGFR 抗体:セツキシマブ

## In vitro 実験の主な方法

MTT assay (細胞増殖抑制 assay)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 assay 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、リン酸化チロシンキナーゼ (RTK)-array を用いて、各細胞株のタンパクレベルを評価した。

## 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)

6週齢の NOG マウス(雌)にクリゾチニブ耐性細胞株(100万個)を1か所皮下移植した。腫瘍が100mm<sup>3</sup>程度の大きさになった頃に5群に分け、①vehicle、②クリゾチニブ(100mg/kg)、③ゲフィチニブ(5mg/kg)、④カボザンチニブ(30mg/kg)、⑤ゲフィチニブ(5mg/kg)とカボザンチニブ(30mg/kg)の併用投与を週5日、3週間投与した。

## **【結果】**

### クリゾチニブ耐性 HCC78R における上皮成長因子受容体(EGFR)の活性化

SLC34A2-ROS1 融合遺伝子を保有する HCC78 細胞株を使用し、クリゾチニブ耐性株 (HCC78R) を樹立した。MTT アッセイで、HCC78R はクリゾチニブのみだけではなく、次世代の ROS1 阻害剤であるセリチニブ、ブリガチニブ、ロルラチニブに対しても細胞増殖抑制効果は認めなかった。RTK-array を用い、HCC78 と HCC78R 細胞間の受容体チロシンキナーゼ (RTK) のリン酸化レベルについて検討し、HCC78 と比較して HCC78R では、クリゾチニブ曝露後の EGFR のリン酸化が維持され、かつ AXL のリン酸化が上昇していることが示された。

### クリゾチニブ耐性 HCC78R 細胞における EGFR-TKI の有効性

MTT assay において、HCC78R で、クリゾチニブによる細胞増殖抑制は得られなかったが、EGFR-TKI であるゲフィチニブにより細胞増殖は著明に抑制された。また、ウエスタンブロット法において、HCC78R で、EGFR 及びその下流シグナル伝達タンパクである ERK1/2 のリン酸化は、ゲ

フィチニブにより抑制された。更に、ゲフィチニブ以外の EGFR-TKI であるエルロチニブ及びアファチニブを用いて同じ実験を行ったところ、ゲフィチニブと同様の結果を認めた。抗 EGFR 抗体であるセツキシマブについても同様に、MTT assay で HCC78よりも顕著に HCC78R 細胞増殖を抑制し、ウエスタンブロット法で EGFR とその下流のシグナル伝達タンパクのリン酸化抑制を認めた。したがって、HCC78R のクリゾチニブ耐性機序に EGFR シグナル伝達経路の活性化が関与していることが判明し、当該経路を阻害することで耐性を克服できる可能性が示唆された。

#### クリゾチニブ耐性機序に係る HB-EGF 及び EGFR シグナル伝達経路の役割

HCC78R で、EGFR シグナル伝達経路が活性化する原因を分析した。HCC78R で、EGFR のタンパク発現レベルは、増加しておらず、また、EGFR 遺伝子の二次変異も認められなかった。しかし、RT-PCR において、EGFR のリガンドである EGF、HB-EGF、TGF- $\alpha$ 、EREG 及び AR の遺伝子発現のレベルを分析したところ、HCC78と比較して HCC78R で、HB-EGF の発現レベルが 2.5倍高い発現を認めた。また、FISH assay で、HCC78と比較して HCC78R の培地で、10倍の HB-EGF を確認した。更に、HB-EGF を HCC78培地に添加した場合、クリゾチニブの細胞増殖効果は有意に抑制された。ウエスタンブロット法で、HCC78細胞に HB-EGF を付加した場合、クリゾチニブ投与下でも、EGFR およびその下流のシグナル伝達経路の ERK1/2のリン酸化が維持されることが示された。加えて、患者検体から樹立した ABC-20においても、同様の結果であった。したがって、HB-EGF による刺激によって EGFR のリン酸化が促進され、クリゾチニブに対する耐性を誘導することが考えられた。

#### AXL の up-regulation と HCC78R のクリゾチニブ耐性機序

次世代シーケンサー (NGS) を使用し、HCC78及び HCC78R の mRNA 発現レベルを包括的に比較した。PLK1及び2、PBK、AURKA、AURKB、TTK、CDK1、NEK2並びに AXL の9遺伝子の mRNA 発現が、HCC78と比較して HCC78R で8倍を超える変化を示した。NGS データ結果と一致して、RTK array で、AXL の増加を認めたことから、AXL 阻害剤であるカボザチニブ及びジレチニブ並びに EGFR-TKI であるゲフィチニブにより、HCC78R で耐性が解除されるかを検討した。HCC78R においてゲフィチニブの効果と比較して、カボザチニブ及びジレチニブの効果は限定的であったものの、ゲフィチニブとカボザチニブの併用投与又はゲフィチニブとジレチニブの併用投与は、ゲフィチニブ単独療法よりも有意に細胞増殖を抑制した。In vivo では、HCC78R を皮下に異種移植したマウスを使用し、vehicle、クリゾチニブ (100mg/kg)、ゲフィチニブ (5mg/kg)、カボザチニブ (30mg/kg)、ゲフィチニブ (5mg/kg) とカボザチニブ (30mg/kg) の併用投与の腫瘍縮小効果を比較した。結果、vehicle とクリゾチニブでは異種移植腫瘍は増殖し、カボザチニブの限定的な腫瘍増殖抑制を示した。一方、ゲフィチニブは有意な抗腫瘍効果を示し、ゲフィチニブと比較して統計学的に有意な差は認めなかったものの、ゲフィチニブとカボザチニブの併用投与は、より高い抗腫瘍効果を示した。

## 【考察】

我々は、HB-EGF を介した EGFR シグナル伝達経路のリン酸化及び AXL のリン酸化が、クリゾチニブに耐性となった ROS1融合遺伝子を有する NSCLC において、耐性機序の一因であることを実証した。また、*in vitro* の実験結果に基づき、*in vivo* でも、EGFR 及び AXL のシグナル伝達経路の双方を阻害することにより、クリゾチニブに耐性となった腫瘍が縮小効果を得て当該耐性を克服できる可能性を見出した。

ROS1融合遺伝子を有する NSCLC の約50%が、クリゾチニブ治療後に ROS1 G2032R 等の二次変異を有すると報告されている。また、二次変異以外にも、EGFR、HER2、KIT 等のシグナル伝達経路の活性化がバイパス経路として、クリゾチニブに対する耐性機序として報告されており、我々の研究を含む複数の前臨床研究において、EGF 又は HB-EGF による EGFR の刺激が、ROS1融合遺伝子を有する肺癌細胞株において耐性を誘導することが示されている。更に、最近の前臨床研究において、ROS1融合タンパクを阻害することにより、アダプタータンパクである GRB2が、ROS1から EGFR にシフトし、バイパス経路である EGFR シグナル伝達を活性化させることが報告されている。加えて、我々は、EGFR 以外の受容体のリガンドである IGF 及び FGF が、HCC78細胞に対するクリゾチニブの有効性に影響を与えないことも示した。したがって、EGFR シグナル伝達経路は、ROS1融合遺伝子を有する肺癌細胞において、活性化を維持するために特に重要なバイパス経路であることが示唆された。

次に、我々は、クリゾチニブに耐性となった HCC78R 細胞で、AXL が他の遺伝子と比較して有意に増加することを示した。AXL は、がんタンパク阻害剤に対する耐性獲得において役割を果たすことが既に報告されているが、クリゾチニブ耐性獲得に関する当該役割は未だ報告されていない。我々は、2つの AXL 阻害剤を使用し、HCC78R 細胞における効果を検証した。結果、AXL 阻害剤の単独投与の有効性は中程度であったが、ALK 阻害剤と EGFR-TKI の併用投与の有効性は、単独投与と比較してより優れた抗腫瘍効果を示した。これらの結果により、AXL が EGFR シグナル伝達経路の活性化を補助し、クリゾチニブに対する耐性に寄与することが示唆された。このような状況では、他の癌遺伝子の活性化は、単に「バイパス」としてではなく、「主要な」癌タンパクとして機能していると考えられている。我々の研究においても、HCC78R は ROS1融合遺伝子を保持していたが、その RNA 及びタンパク発現は、HCC78細胞と比較して減少しており、「癌遺伝子の交換」が、HCC78R で生じた可能性があると考えられた。

## 【結論】

AXL 阻害剤であるカボザチニブと EGFR-TKI の併用投与は、クリゾチニブに耐性を獲得した ROS1融合遺伝子を有する NSCLC に対して効果的であり、新たな治療選択肢として検討する価値のある治療方法であることが示唆された。