

主 論 文

Activation of AXL as a preclinical acquired resistance mechanism against osimertinib treatment in *EGFR*-mutant non-small cell lung cancer cells

(EGFR 変異陽性非小細胞性肺癌におけるオシメルチニブ耐性機構としての AXL 活性化)

【緒言】

肺癌は世界中で癌死亡の主因であり、非小細胞肺癌 (NSCLC) は全肺癌の 85%以上を占め、そのうち約 50%が腺癌である。NSCLC 患者のうち、L858R 点突然変異および Exon19 欠失のような上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) 突然変異は、欧米で約 10%-15%、アジアでは約 40%の症例で起こる。EGFR 変異陽性進行 NSCLC 患者の標準治療として、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI : gefitinib、erlotinib および afatinib) が推奨されている。しかしほとんどの場合、約 1 年以内に薬剤耐性を獲得する。TKI 薬剤耐性の最も一般的な原因は EGFR T790M 突然変異で、耐性獲得症例の約半数で検出される。

Osimertinib (AZD9291) は、T790M 変異を伴う EGFR 感受性変異 (Exon19 欠失および L858R) を阻害するように設計された経口の不可逆的 EGFR-TKI であり、EGFR 変異に対して高い活性を示すが、野生型 EGFR に対する活性は低い。AURA 試験の結果に基づき、EGFR-TKI 治療中または治療後に進行をきたした T790M 変異陽性 NSCLC 患者の二次治療として、osimertinib は世界中で承認されている。さらに近年第 3 相 FLAULA 試験の結果に基づき、Food and Drug Administration (FDA) は L858R 点突然変異または Exon19 欠失を有する NSCLC 患者に対して一次治療として osimertinib を承認した。FLAURA 試験では、未治療の局所進行あるいは転移性 EGFR 変異陽性 NSCLC 患者における osimertinib と第 1 世代 EGFR-TKI (gefitinib または erlotinib) の有効性を比較した。osimertinib は第 1 世代 EGFR-TKI より優れた有効性を示し、かつ低い有害事象発生率を示した。しかし、非 T790M 変異陽性症例を含め、EGFR 変異陽性 NSCLC の一次治療として osimertinib を使用した場合の獲得耐性機構についての知見は不十分である。

臨床モデルまたは前臨床モデルでは、EGFR C797S 変異、MET 遺伝子増幅および RAS シグナル依存性増加など、osimertinib に対する獲得耐性のメカニズムが解明されている。これらの耐性機構は主に遺伝的变化によって引き起こされるが、非遺伝的耐性メカニズムも関与している。T790M 変異陽性だけでなく T790M 変異陰性の場合においても EGFR 変異陽性 NSCLC に対する獲得抵抗性を予測することは有用である。

本研究では、複数の NSCLC 細胞株から osimertinib 耐性株を樹立し、分子プロファイルを調べて耐性機序を明らかにした。

【材料と方法】

細胞株と試薬

本研究には 5 種類の EGFR 変異陽性 NSCLC 肺癌細胞株を用いた：HCC827 (Exon19 欠失)、HCC4006 (Exon19 欠失)、PC-9 (Exon19 欠失)、HCC4011 (L858R 変異)、H1975 (L858R 変異および T790M 変異)。Osimertinib 耐性株は 2 種類の異なる方法によって樹立した。10 nmol/L から 2 μ mol/L に徐々に曝露濃度を上昇させる方法 (stepwise 法) または間欠的に 2 μ mol/L の薬剤曝露を行う方法 (high-concentration 法) である。また、本研究では抗 EGFR 剤である osimertinib (第 3 世代)、 gefitinib (第 1 世代)、 afatinib (第 2 世代)、に加え AXL 阻害剤である cabozantinib を使用した。

ウェスタンブロット

肺癌細胞株および osimertinib 耐性株から蛋白を抽出し、EGFR、MET、AKT、MAPK、cleaved(c-) PARP、E-cadherin、vimentin、ALDH1A、AXL の活性をウェスタンブロットにて評価した。AXL 活性については親株と比較し発現濃度が 4 倍以上の際に「発現上昇あり」と定義した。

DNA 分析

EGFR の Exon 20 領域の変異は direct sequencing により検出した。EGFR および MET のコピー数は TaqMan copy number assays にて qPCR を用いて評価し、親株と比較して 4 倍以上であった際にコピー数増幅ありと定義した。

次世代シーケンス

全ての親株、耐性株に対し次世代シーケンス (NGS) を行った。ライブラリ調整は HaloPlex HS システムおよび 100ng の genomic DNA を使用して行った。NGS データは MiSeq にて生成され、専用ソフト (SureCall) にて解析した。

遺伝子発現

肺癌細胞株および osimertinib 耐性株から mRNA を抽出し、コピー数解析と同様に qPCR 法にて計測し比較した。

siRNA トランスフェクション

肺癌細胞株および osimertinib 耐性株に AXL に対する 2 種類の siRNA および control siRNA をもちいてトランスフェクションを行い、AXL のノックダウンを行なった。

腫瘍増殖抑制能試験

薬剤の抗腫瘍効果は MTS アッセイ、もしくは MTT アッセイを行い評価した。いずれの方法においても、薬剤曝露時間は 3 日間とした。

動物実験

動物実験ではマウス（BALB/c-nu/nu）の背部に H1975 の親株および耐性株を移植し、osimertinib 投与群、osimertinib+cabozantinib 投与群、およびコントロール群の 3 群（各群 5 匹）に 3 週間の薬剤経口投与（1 週間に 5 回投与）を行った。投与期間中、腫瘍のサイズを週に 3 回測定し、各薬剤の抗腫瘍効果を評価した。

統計学的評価

統計学的な評価には GraphPad Prizm 7R を用い、 $p < 0.05$ をもって二群間に有意差ありとした。

【結果】

EGFR 変異陽性 NSCLC 株における osimertinib 耐性株の樹立

5 種類の EGFR 変異陽性 NSCLC 株（HCC827、HCC4006、HCC4011、PC-9、H1975）に対し 2 通りの方法で薬剤曝露を行い（stepwise 法：ORS、high concentration 法：ORH）、計 9 種類の細胞株を樹立した（HCC827-ORS、HCC827-ORH、HCC4006-ORS、HCC4006-ORH、PC-9-ORS、PC-9-ORH、H1975-ORH、H1975-ORH、HCC4011-ORH）。

Osimertinib 耐性株の遺伝子変化

9 種類の osimertinib 耐性株について、まずダイレクトシーケンス法および NGS を用いて変異検索を行なったが、C797S 変異の出現および T790M 変異の出現／消失は認めなかった。また EGFR、KRAS、NRAS、BRAF、TP53 を含む癌関連 47 遺伝子を対象とした NGS では secondary mutation の出現を認めなかった。

続いて獲得耐性機構と関連すると考えられる遺伝子コピー数の変化を調べた。HCC827-ORH、HCC827-ORH において EGFR のコピー数の減少を認め、HCC827-ORH、PC9-ORH および HCC4011-ORH において MET 増幅を認めた。YES1 のコピー数に有意な変化は見られなかった。更にウエスタンブロットにて EGFR および MET タンパク質の発現レベルおよびこれらのタンパク質のリン酸化を調べた。コピー数解析と同様に、EGFR の発現は HCC827-ORS および HCC827-ORH において低下を認めたが、MET の発現は HCC827-ORH、PC9-ORH および HCC4011-ORH において上昇した。MET 増幅を伴う HCC4011-ORH は、osimertinib と MET 阻害剤である crizotinib との併用療法が効果的であった。一方同じく MET 増幅を示す HCC827-ORH および PC9-ORH に対しては効果を認めず、MET 増幅に加え他の耐性機構の存在が示唆された。

Osimertinib 耐性株における EMT 表現型の獲得

耐性化の原因として EMT（epithelial to mesenchymal transition；上皮間質転換）の関連を調べるため、親株および osimertinib 耐性株について上皮型マーカーである E-cadherin および間葉型マーカーである vimentin についてウエスタンブロットを用いた評価を行なった。

HCC827-ORS、HCC827-ORH、HCC4006-ORS、HCC4006-ORH は E-cadherin の増幅および vimentin の減少を認めた。H1975-ORS および H1975-ORH では E-cadherin の明らかな増幅を認めたが vimentin の変化は乏しかった。顕微鏡的には、6 つの耐性細胞株（HCC827-ORS、HCC827-ORH、HCC4006-ORS、HCC4006-ORH、H1975-ORS、H1975-ORH）は、親株とは異なる紡錘体様細胞形態を呈した。これらの所見は EMT を示唆しており、耐性化の一因であると考えられた。また、stem-cell マーカーである ALDH1A1 の発現レベルは H827-ORS においてウェスタンブロットおよび qRT-PCR で上昇を認めた。

osimertinib 耐性株における AXL 活性

受容体型チロシンキナーゼである AXL は、NSCLC、乳癌、および膵臓癌を含む特定の腫瘍における EMT に関連する重要な因子であることが報告されているが、EMT における正確な役割は不明な点が多い。我々は AXL 発現を調べ、細胞増殖能との関連を検討した。ウェスタンブロットにおいて、HCC827-ORS、HCC4006ORS、HCC4006ORH、PC9-ORS、PC9-ORH、H1975-ORS、H1975ORH において AXL の増幅を認めた。そのうち、H1975 および HCC4006 由来の耐性細胞株に絞り、まず siRNA を用いて AXL のノックダウンを行なった。AXL ノックダウンは H1975 親株における細胞生存率に有意な影響を及ぼさなかったが、H1975-ORS および H1975-ORH では細胞増殖が抑制された。HCC4006 シリーズにおいても H1975 と同様に AXL siRNA によって osimertinib 耐性株の細胞増殖が抑制された。これらの耐性細胞株の増殖は AXL シグナル伝達に依存することを示唆している。

続いて cabozantinib 単独療法および osimertinib/cabozantinib 併用療法の効果を検証した。cabozantinib は AXL を含む複数のチロシンキナーゼ阻害剤である。MTT において、cabozantinib 単独では H1975 および HCC4006 耐性細胞株の両方において細胞増殖は阻害されなかったが、併用にて osimertinib 感受性の改善を認めた。ウェスタンブロットにて観察したところ、cabozantinib 単独では osimertinib 耐性株の AXL 発現は変化を認めなかったが、併用療法ではアポトーシスマーカーである cPARP の発現が確認された。これらの結果は、osimertinib と cabozantinib の併用療法が osimertinib に対する獲得耐性の克服に有効であることを示している。

動物実験での osimertinib/cabozantinib 併用療法の効果

In vitro での実験結果を踏まえ、osimertinib 耐性株である H1975-ORS、H1975-ORH を用いて動物実験を行い osimertinib/cabozantinib 併用療法 の効果を検証した。コントロール群、osimertinib 単独投与群と比較して併用療法群は有意に抗腫瘍効果を示した。マウスの体重減少や行動変容などの毒性はいずれの群でも認めなかった。

【考察】

本研究では、EGFR 変異陽性 NSCLC 細胞株を用いて第 3 世代 EGFR-TKI である osimertinib の耐性株を樹立し耐性機構を調べた。osimertinib 耐性化の原因として、臨床例では EGFR C797S 変異をはじめとして BRAF V600E 変異、KRAS 変異、PIK3CA 変異、ALK 融合遺伝子などが報

告されている。本研究で樹立した耐性株に対し遺伝子パネルを用いた NGS を行ったが、EGFR C797S 変異を含め secondary mutation は検出されなかった。今回は異なる 2 種類の薬剤曝露方法を採用したが、実際の in vivo 条件とは異なる可能性がある。臨床サンプルを用いたさらなる検討が必要である。MET 遺伝子増幅は HCC827-ORH、PC9-ORH および HCC4011-ORH で認められたが、osimertinib と crizotinib の併用療法が有効であったのは HCC4011-ORH のみであった。MET 遺伝子増幅が MET/EGFR 阻害剤の併用治療の効果予測因子として不十分であるという報告があり、本研究においても併用療法が無効であった細胞株については他の耐性機構が存在すると考えられた。

非遺伝的な変化としては、いくつかの耐性株において EMT を認めた。さらに AXL の発現に着目したところ、AXL 過剰発現耐性株のうち、H1975 および HCC4006 耐性株において AXL ノックダウンによる細胞増殖の抑制を認めた。AXL キナーゼの活性化が第 1 世代 EGFR-TKI 耐性化の原因となるとの報告があるが、第 3 世代での報告はまだなく、本研究が最初の観察報告である。我々はまた、cabozantinib が一部の osimertinib 耐性株において感受性を改善し、osimertinib と cabozantinib の併用療法が xenograft モデルにおいても腫瘍増殖を阻害することを示した。FDA 承認薬剤である cabozantinib は、osimertinib 耐性化克服のための重要な薬剤となりうる。

本研究の結果をふまえて、osimertinib と cabozantinib による併用療法の臨床試験は今後有用であると考えられる。EGFR-TKI 耐性患者に対する選択的 AXL 阻害剤を用いた第 1 世代または第 3 世代の EGFR-TKI を評価する臨床試験が現在進行中であるが、AXL を含むマルチキナーゼ阻害剤である cabozantinib はこれらの選択的 AXL 阻害剤と比較しより有用である。osimertinib が EGFR 陽性の進行 NSCLC 患者の一次治療として承認されたことで、今後耐性患者の数が増加することが予想される。osimertinib 治療後に耐性を獲得した臨床検体の AXL 発現について、より一層の研究が必要である。

【結論】

EGFR 陽性 NSCLC 細胞株から osimertinib 耐株を樹立し、MET 増幅、EMT、AXL 発現を含む種々の耐性機序を観察した。AXL は osimertinib 耐性の治療ターゲットとなる可能性が示された。