

主 論 文

Triplet therapy with afatinib, cetuximab and bevacizumab induces deep remission in lung cancer cells harboring EGFR T790M *in vivo*

(*vivo* モデルでの EGFR T790M 陽性肺癌においてアファチニブ、セツキシマブ、ベバシズマブの 3 剤併用療法は深い寛解をもたらす)

【緒言】

上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異を含むドライバー遺伝子変異の発見は、進行非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者の治療戦略を劇的に変えた。しかし、大部分の EGFR 陽性肺癌は、約 12 カ月の治療後に EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) に対する耐性を獲得し、その約 60%が EGFR のエキソン 20 において二次耐性突然変異 T790M が原因である。T790M に対してアファチニブおよびモノクローナル抗 EGFR 抗体であるセツキシマブの併用療法は有効な結果を示している。我々は、アファチニブとセツキシマブに加えて血管新生阻害剤であるベバシズマブを追加することによって 3 剤併用療がより良好な抗腫瘍効果及びより耐容性のある治療であると仮定し *in vitro* 及び *in vivo* での 3 剤併用療法の効果を検証した。

【材料と方法】

細胞培養および増殖阻害

EGFR del19 (E746-A750) 及び Exon20 (T790M) を有するゲフィチニブ耐性腺癌細胞 (RPC-9) と Exon21 (L858R) および T790M を保有する H1975 肺腺癌細胞を使用した。MTT アッセイを用いて増殖阻害を測定し、各アッセイは 3 回実施した。

ゼノグラフトモデル

5~7 週齢の雌無胸腺マウスに滅菌した食物および水を与え、12 時間の明/12 時間暗サイクル下で動物実験施設で飼育した。2×10⁶個の細胞をマウスの背中に左右両側に注射した。注射 10 日後、マウスを無作為に単剤療法、併用療法、3 剤併用療法のグループに割り当てた。1 群は 4~10 匹とした。それぞれの薬剤はアファチニブ (10mg/kg あるいは 25mg/kg を経口投与、5 回/週)、ベバシズマブ (2mg/kg を腹腔内投与、2 回/週)、セツキシマブ (0.1mg/匹を腹腔内投与、1 回/週) またはオシメルチニブ (5mg/kg を経口投与、5 回/週) であった。腫瘍体積は (短径) 2 x (長径) x 0.5 で計算し、週 2 回測定した。各薬剤の投与期間は 28 日であり、追跡期間はさらに 28 日間とした。

液体クロマトグラフィー質量分析法

クロマトグラフィー分離は、高速液体クロマトグラフィーシステムおよび CAPCELL PAK C18 MGIII S-5 分析カラムを用いて 40°C で行った。アイソクラティック移動相は、0.3mL/分の流速で移動相-A (0.1%ギ酸) および移動相-B (メタノール) で組成されていた。この溶液を 0.22 μm 膜を用いて濾過した。質量分析は、AB SCIEX API 2000 トリプル四重極質量分析計で行った。質量分析計を陽イオンモードで操作した。定量は、アファチニブについて 486.5> 371.5 での質量電荷比 (m/z) 遷移を有する多重反応モニタリング (MRM) モードで行った。

統計処理

統計分析は SPSS を用いて行った。群間差はスチューデント t 検定を用いて比較した。P 値で 0.05 未満のものを統計的に有意であることとした。

【結果】

EGFR T790M 陽性肺癌細胞で用量調節したアファチニブ、セツキシマブ、ベバシズマブの 3 剤併用療法は病理学的完全寛解をもたらした。

アファチニブ (10mg/kg、週 5 日)、セツキシマブ (0.1mg/マウス、週に 1 回)、およびベバシズマブ (2mg/kg、週 2 回) の 3 剤併用療法の有効性および安全性を検討した。驚くべきことに、3 剤併用療法は、RPC-9 において最初の 2 週間以内に完全寛解 (CR) を誘導した。さらに、3 剤併用療法で治療した群は、4 週間の観察期間中に再増大しなかった。いずれの群においても有意な体重減少は観察されなかった。病理学的完全寛解を確認するために、薬物投与開始 56 日後に腫瘍を摘出した。HE 染色で 3 剤併用療法群では癌細胞は観察されなかった。対照的コントロール群、アファチニブ単剤、2 剤併用療法で治療された腫瘍では、多くの癌細胞が観察された。同様の事象を EGFR L858R および T790M 突然変異を有する H1975 細胞株で行った。H1975 細胞株においても 3 剤併用療法群で病理学的完全寛解を認めた。3 剤併用療法が、*in vivo* で EGFR T790M 変異を有する肺癌細胞に病理学的完全寛解を誘導した。

3 剤併用療法によって誘導される病理学的完全寛解の機序

アファチニブの代わりにゲフィチニブを用いた 3 剤併用療法の抗腫瘍効果を RPC-9 で確認した。腫瘍抑制効果は投与期間に間に認められたが、治療期間が終了すると腫瘍は増大していった。アファチニブが病理学的完全寛解において重要な役割をはたしていることが示唆された。

次に CD31 や Ki-67 の発現を免疫染色で調べて血管新生や細胞増殖の評価を行った。ベバシズマブが無い治療群と 3 剤併用療法群を比較すると CD31 陽性血管は明らかに減少していた。また Ki-67 陽性細胞の数も 3 剤併用療法群で有意に少なかった。

アポトーシスの評価のため cleaved caspase-3 の発現を免疫染色で調べ、3 剤併用療法群は他の群と比較して有意に陽性細胞が多かった。この結果に一致してアポトーシス促進タンパク質である BIM の活性化も 3 剤併用療法群で認められた。

これらの結果から 3 剤併用療法による *in vivo* での病理学的完全寛解の機序として、血管新生阻害、細胞増殖阻害、アポトーシス誘導が重要な役割を果たしていると考えられた。

[考察]

EGFR-TKI に対する耐性は、EGFR 変異陽性肺癌において依然として重要な問題である。本研究では、アファチニブとセツキシマブに加えてベバシズマブ含む 3 剤併用療法が、EGFR T790M 変異を有するゼノグラフトモデルにおいて早期に病理学的完全寛解を誘導することを示した。早期寛解とより深い寛解は、フィラデルフィア染色体陽性の慢性骨髄性白血病において全生存期間の延長と相関する。完全奏功および部分奏効はまた、EGFR 変異陽性肺癌患者における全生存を予測するための潜在的なマーカーである。したがって、本研究で *in vivo* で 3 剤併用療法が深い寛解を観察された事実は重要と考えられる。

いくつかの臨床試験は、EGFR-TKI にベバシズマブを加えることの重要性を示している。この組み合わせが成功した機序の 1 つは血管新生阻害効果である。別の考えられる機序としては、腫瘍微小環境の正常化による EGFR-TKI の腫瘍への到達の改善である。しかし、この研究では、ゼノグラフトモデルにおいてアファチニブ腫瘍内濃度は上昇しなかった。これは、エルロチニブの腫瘍内濃度に対するベバシズマブの影響を評価する他の実験結果と一致している。また、高濃度アファチニブと高濃度セツキシマブの組み合わせでは、本研究で病理学的完全寛解を誘導しなかった。最近の報告では、VEGFR と EGFR との間のクロストークが腫瘍増殖にとって重要であり得ることが示唆しており、EGFR および VEGFR 遺伝子の二重阻害が完全な腫瘍阻害をもたらすことを示した。VEGFR および EGFR 経路の二重阻害は、本研究でみられた深い寛解機序の 1 つである可能性がある。

我々の戦略は、TKI および血管新生阻害薬を用いてドライバー癌タンパク質の二重阻害であった。この戦略は、結腸癌、乳癌、唾液腺癌および肺癌を含む固形腫瘍の臨床試験において既に用いられている。これらの臨床研究の完了により、我々は、アファチニブ、セツキシマブ、およびベバシズマブの 3 剤併用療法を用いた試験が臨床的に実現可能であることを期待している。しかし、我々はこの治療の毒性、特に野生型 EGFR 阻害からしばしば生じる皮膚および下痢に関して検討する必要がある。第 2 に、我々は結腸直腸癌に対するセツキシマブおよびベバシズマブの併用療法の臨床試験がネガティブだったことを考慮しなければならない。しかし、薬剤の用量調節

を行うことによって治療耐受性をもたらし、それでもなお十分な効果が得られることが期待される。

【結論】

アファチニブ、セツキシマブ、およびペバシズマブの 3 剤併用療法は、EGFR T790 変異を有する肺癌ゼノグラフトモデルにおいて許容可能な毒性であり、病理学的完全寛解を誘導することを示した。3 剤併用療法は、EGFR 変異を有する肺癌患者において、深い寛解を誘導し、生存を延長する可能性がある。アファチニブ、セツキシマブ、およびペバシズマブによる 3 剤併用療法の臨床試験が妥当である。