学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　　　氏 名　　髙橋　宏典

学 位 論 文 題 名

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における osimertinib 耐性と Notch 経路の関わりに関する研究

(Studies on Notch pathway regulates osimertinib drug-tolerant persistence in *EGFR*-mutated non-small cell lung cancer)

【背景と目的】Osimertinib は第三世代の上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor：EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬（tyrosine kinase inhibitors：TKIs）であり、前世代 EGFR-TKIs に起因する *EGFR*-T790M 変異の有無にかかわらず *EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌（non-small cell lung carcinoma：NSCLC）患者に対して著しい抗腫瘍効果を示す。しかしこの効果は一過性であり、大多数の患者はいずれ耐性を獲得する。Osimertinib 治療後の耐性機序は多岐にわたり、さらに約 50％は耐性機序不明である。このため osimertinib 耐性後の治療は困難なことが多く、耐性獲得を克服または遅延させることが重要である。近年、抗癌剤治療初期に細胞集団の大部分が死滅する薬剤濃度下でも生存能力を維持する可逆性薬剤耐性持続性（drug-tolerant persister：DTP）細胞が検出された。DTP 細胞は標的薬剤への感受性が著しく低下した細胞亜集団として定義され、EGFR-TKIs に対する早期の非遺伝的獲得耐性として注目されている。Notch は腫瘍形成に重要な役割を果たす膜貫通型受容体であり、細胞の発生、分化、増殖に関与し、癌種によって腫瘍増殖性または抑制性に機能する。我々は以前に、NSCLC において Notch 経路と EGFR 経路間に有意なクロストークが存在することを報告している。Notch 経路活性化が前世代 EGFR-TKIs 耐性に関与する報告はあるが、osimertinib 治療における Notch の役割は十分に理解されていない。本研究では、osimertinib DTP 細胞の発生、増殖における Notch 経路の関与を評価した。

【対象と方法】*EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 細胞株 PC-9（exon19 deletion）、H1975（L858R point mutation/T790M）、HCC827（exon19 deletion）を使用した。Osimertinib、Notch 経路阻害剤 γ-secretase inhibitor（GSI）を実験に使用した。既報に基づき IC_{50} の 100 倍濃度である osimertinib 3 μmol/L に 9 日間曝露した細胞を osimertinib DTP 細胞と定義した。MTT proliferation assay で薬剤抗腫瘍効果を確認した。Clonogenic assay でコロニー形成速度を確認した。RNA sequencing を用いて遺伝子プロファイリングを行った。EGFR、Notch 関連タンパク、mRNA 発現をウエスタンブロット法、quantitative reverse transcription polymerase chain reaction（qRT-PCR）法で検討した。5 週齢の雌のヌードマウスに PC-9 または H1975 細胞を皮下注射し、osimertinib（5 mg/kg/日）を週 5 日経口投与、GSI（3.3 mg/kg/日）を週 4 日腹腔内注射し腫瘍体積を測定した。2015 年 1 月から 2020 年 12 月までに北海道大学病院呼吸器内科で EGFR-TKIs 治療を受け、かつ EGFR-TKIs 治療前後で分析可能な病理組織を有する 17 症例について、Notch1 および HES1 の免疫組織染色を行った。Notch1、HES1 発現と生存期間の関連について統計学的に解析した。

【結果】Osimertinib DTP 細胞は親細胞と比較して有意に osimertinib の IC_{50} が上昇しており、osimertinib に対する耐性を認めた。Osimertinib 曝露中止後は時間経過で osimertinib に対する感受性を回復した。また PC-9 DTP 細胞は親株と比較して細胞周期が G1 期にとど

まっており、DTP 細胞の特色として矛盾しないもであった。RNA sequencing の結果、PC-9 DTP 細胞は親株と比較して *NOTCH1* 応答性遺伝子の一部が上昇していた。Osimertinib DTP 細胞は時間経過で再増殖を認めたが、GSI 併用では DTP 細胞の再増殖が抑制された。Clonogenic assay でも同様に、GSI 併用でより強くコロニー形成が阻害された。DTP 細胞における EGFR 経路の検討では、リン酸化 EGFR 発現が抑制されたが、リン酸化 ERK 発現は低下しなかった。一方で GSI 併用 DTP 細胞ではリン酸化 ERK 発現が低下した。Notch 経路に関しては、DTP 細胞では Notch 細胞内ドメイン（Notch intracellular domain：NICD）1 と Notch 標的遺伝子である HES1 と HEY1 発現が上昇していたが、GSI 併用により低下を認めた。*NOTCH1*、*HES1*、*HEY1* mRNA 発現も同様の結果であった。また Notch 経路とともに EGFR 経路への関与が報告されている dual specificity phosphatase 1（DUSP1）は、GSI 併用で顕著に発現が上昇した。PC-9 と H1975 細胞を皮下接種したマウスにおいて osimertinib は投与初期では腫瘍縮小を認めたが、30 日後には腫瘍再増殖を認めた。Osimertinib と GSI 併用では 30 日後も腫瘍増殖を有意に抑制した。治療 9 日目のマウスの腫瘍を切除し EGFR 経路と Notch 経路の発現を検討した。Osimertinib、併用治療ともにリン酸化 EGFR 発現が低下していた。Osimertinib 単剤ではリン酸化 ERK 発現は低下しなかったが、GSI 併用でリン酸化 ERK 発現が低下した。また DUSP1 は osimertinib 単剤投与と比べて GSI 併用でより増強された。Osimertinib 投与により NICD1、HES1、HEY1 発現が上昇したが、GSI 併用でそれらの発現は有意に抑制された。これらは *in vitro* の所見と一致していた。次に 17 症例の *EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者における EGFR-TKIs 治療前後の腫瘍組織を用いて Notch1 と HES1 発現を免疫組織学的に検討した。9 症例で治療後に Notch1 と HES1 発現が上昇していた。Notch1 発現上昇群の全生存期間中央値は 25.5 カ月、非上昇群は 29.5 カ月であった（p=0.38）。HES1 発現上昇群の全生存期間中央値は 24.3 カ月、非上昇群は 29.5 カ月であった（p=0.91）。

【考察】本研究では osimertinib DTP 細胞で Notch 経路が活性化されており、osimertinib と GSI 併用で *in vitro* および *in vivo* で腫瘍増殖が抑制されることを明らかにした。erlotinib 投与により Notch3 がβ-catenin を制御し DTP 細胞を誘導する報告があるが、本研究では osimertinib DTP 細胞に Notch3 の発現変化はなかった。肺癌における Notch 経路の働きはしばしば状況依存的であり、腫瘍形成において Notch1 と Notch2 が逆の役割を担うことや、NSCLC 細胞では Notch1 が放射線で活性化されることも報告されている。今回の結果と既報の違いについては、使用した EGFR-TKIs や活性化された Notch 受容体の違いが状況依存性と関連している可能性が考えられた。Osimertinib DTP 細胞ではリン酸化 EGFR 発現が低下したがリン酸化 ERK 発現は低下しておらず、GSI 併用がリン酸化 ERK 発現を低下させ腫瘍増殖を抑制している可能性が考えられた。さらに osimertinib と GSI 併用で DUSP1 が亢進しており、DUSP1 を介してリン酸化 ERK 発現が抑制されている可能性が示唆された。しかし他の経路が osimertinib と GSI 併用に関連しているかさらなる検討が必要である。ヒト腫瘍組織において EGFR-TKIs 治療後に Notch1 と HES1 が高発現しており、高発現群では有意ではないが予後が悪い傾向があった。症例数は少ないが EGFR-TKIs 前後で特に Notch1 発現を比較検討した報告は今までになく、今回が初めての検討となる。ヒト組織における結果は上述した *in vitro*, *in vivo* のデータをさらに深めるものであると考えられる。

【結論】Osimertinib DTP 細胞の出現には Notch 経路が極めて重要な役割を果たしており、osimertinib と GSI 併用は、*EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC 患者における治療戦略の一つであることが示唆された。