



2024年9月13日

公益財団法人がん研究会

RET 融合遺伝子陽性肺がんの新たな分子標的薬耐性機構を発見 ～MIG6 欠損による EGFR シグナル活性化を介した RET 阻害薬耐性～

1. ポイント

- 3次元浮遊培養は RET 陽性肺がん細胞の RET-阻害薬感受性を再現しました。
- CRISPR/Cas9 ノックアウトスクリーニングにより、MIG6 の欠損が RET 阻害薬耐性細胞を増加させることを明らかにしました。
- MIG6 を欠損した肺がん細胞では、ごく微量の EGF によって EGFR が活性化して RET 阻害薬に耐性となること、その耐性は抗 EGFR 抗体の併用で克服できる可能性を示しました。
- RET 肺がん患者由来のがん細胞株の一部では、EGFR 活性化による初期耐性が認められました。

2. 研究の概要

非小細胞肺がんは肺がんの 85%程度を占めますが、その中の 1～2%では RET 融合遺伝子（注 1）が検出されます。これらの患者さんでは RET チロシンキナーゼを標的とした分子標的薬（RET 阻害薬：注 2）が高い抗腫瘍効果を示すことが知られています。しかし、治療開始当初は腫瘍の大幅な縮小を認めても数年程度経過すると薬剤が効かなくなってしまう薬剤耐性を獲得し、がんは再び増悪・進行してしまうことが問題となっています。

がん研究会の片山量平（がん化学療法センター 基礎研究部 部長）、魏 薪兆(WEI Xinzhao)（同研究部所属、東京大学大学院 新領域創成科学研究科 博士課程 大学院生）らの研究グループは、薬剤耐性の芽となる治療残存細胞（DTP 細胞）に関連する遺伝子を同定するために、RET 融合遺伝子陽性肺がん患者さんから樹立したがん細胞株を用いて、ヒトのゲノムワイド CRISPR/Cas9 スクリーニング（注 3）を行いました。その結果、複数の候補遺伝子が同定されましたが、その中でも MED12 または MIG6 タンパク質をコードする *ERRF1* 遺伝子をノックアウトすると、RET 阻害薬存在下で残存する DTP 細胞の数が有意に増加しました。MIG6 は EGFR に結合しその活性を抑制している分子であり、MIG6 を人為的に欠損させると、わずか 1 ng/ml という健常人血中濃度レベルの EGFR リガンド(EGF や TGF α)を処理するだけでも EGFR 活性化を誘導し、RET 阻害薬への耐性をもたらしました。この MIG6 ノックアウトによる耐性は、アファチニブといった EGFR 阻害薬やセツキシマブといった抗 EGFR 阻害抗体を RET 阻害薬と併用することで、克服されることが判明しま

した。また、RET 阻害薬による治療を受けていない RET 融合遺伝子陽性肺癌患者より樹立されたがん細胞株の 1 つは、元々 RET 阻害薬に耐性を示しました（初期耐性）。この細胞においても、EGFR シグナルの活性化が生じており、EGFR を Afatinib などの処理によって阻害すると RET 阻害薬耐性は克服されましたが、この細胞では MIG6 は発現しており、EGFR シグナルを介した耐性には関わっていませんでした。本研究では、RET 阻害薬抵抗性に関わるメカニズムを同定すると共にその克服法候補を発見することができており、今後の治療法開発に貢献しうる研究成果であると考えます。

3. 論文名、著者およびその所属

○[MIG6 loss increased RET inhibitor tolerant persister cells in RET-rearranged non-small cell lung cancer](#)

○ジャーナル名

Cancer Letters

○著者

Xinzhao Wei^{1,2}, Ken Uchibori^{1,3}, Nobuyuki Kondo^{1,4}, Takahiro Utsumi^{1,5}, Ai Takemoto¹, Sumie Koike¹, Satoshi Takagi¹, Noriko Yanagitani³, Makoto Nishio³, Ryohei Katayama^{1,2*}

(* 責任著者)

○著者の所属機関

1. 公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 基礎研究部
2. 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻
3. 公益財団法人がん研究会 がん研有明病院 呼吸器内科
4. 東京医科歯科大学 呼吸器内科
5. 九州大学大学院 医学研究院 呼吸器内科学分野

4. 研究の詳細

【背景】

RET (Rearranged during Transfection) は、細胞の成長、分化、そして生存を制御する受容体型チロシンキナーゼをコードするがん原遺伝子であり、遺伝子変異や融合遺伝子形成などの異常が、がんの発生に寄与することが知られています。RET 融合遺伝子は、2015 年に、がん研究会病理部長の竹内賢吾博士や、国立がん研究センターの河野博士らによって発見され、様々な RET チロシンキナーゼ阻害薬が治療薬として開発されてきました。わが国では、RET チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の selpercatinib (LOXO-292) が、米国では、pralsetinib (BLU-667) も承認され治療薬として臨床応用されています。しかし、他の分子標的薬と同様に、RET 阻害薬に対

する耐性がんの出現によって再増悪してしまうことが問題となっています。薬剤耐性のメカニズムとしては、RET 阻害薬が結合する RET チロシンキナーゼ領域に起こる二次変異や、EGFR や KRAS などのバイパス経路の活性化が報告されてきていますが、その詳細な耐性メカニズムはまだ不明です。また、薬剤耐性が出現するには、そもそも RET 阻害薬治療で残存し生き延びてしまうがん細胞がいることが原因と考えられます。そこで本研究グループは独自に患者検体から樹立した RET 融合遺伝子陽性肺がん細胞株を用いて CRISPR/Cas9 によるゲノムワイドスクリーニング*4 を実施し、治療残存細胞に関与する因子と、新規の薬剤耐性メカニズムの探索、そしてその克服法の解明を目指して研究を行いました。

【研究内容】

はじめに、がん研究会の倫理審査委員会承認済みのプロトコールに則り同意の得られた RET 融合陽性肺がん患者さんから検査などの残余組織検体を頂き、がん細胞株の樹立を行いました。樹立できたがん細胞株 LCC-190 と LCC-175 は、それぞれ、CCDC6-RET と KIF5B-RET 融合遺伝子を有していました。これらの細胞株加えて、購入可能な RET 融合陽性非小細胞肺がん細胞株 LC2/ad を用いて以後の実験を行いました。

まず、RET 阻害薬への感受性を LC2/ad と LCC-190 を用いて、それぞれ 2 次元平面培養 (2D) 条件、および胸水環境を模倣した 3 次元浮遊培養環境(3D)で培養し、セルペルカチニブおよびヤプラルセチニブで処理し、細胞の増殖、RET チロシンキナーゼおよびその下流シグナルの阻害、細胞死の指標である PARP タンパク質の発現量を評価しました。その結果、LC2/ad と LCC-190 細胞は、2D 条件では RET 阻害薬への耐性を示しましたが、3D 浮遊培養条件では薬剤感受性を示しました(図 1)。

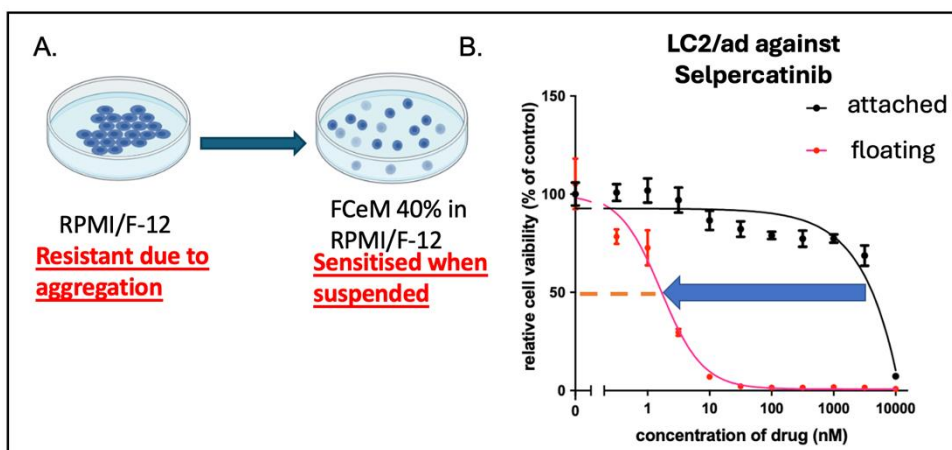


図 1. 3D 浮遊培養条件下では RET 融合遺伝子陽性肺がん細胞は RET-TKI 感受性を示す。
A: 3D 浮遊培養方法の模式図。B: 2D および 3D 培養条件下における LC2/ad の RET 阻害薬(Selpercatinib)感受性。縦軸：細胞生存率、横軸：Selpercatinib の濃度(nM)

次に、RET 阻害薬への抵抗性に関連する遺伝子を特定するために LCC-190 細胞を用い、CRISPR/Cas9 の全ゲノムノックアウトスクリーニングを実施しました。LCC-190 細胞に約 12 万種類の sgRNA ライブラリ（1 つの遺伝子をノックアウトするために 3~6 個の sgRNA が含まれる）を導入し、RET 阻害薬を約 9 日間処理して、その後生存した細胞に含まれた sgRNA を調べました。その結果、ERRFI1 (MIG6) 遺伝子のノックアウトが RET 阻害薬抵抗性に関与していることが強く示唆されました(図 2)。この結果を検証するため、LC2/ad と LCC-190 細胞を用いて、追加で異なる配列を持つ sgRNA も用いて MIG6 のノックアウトを行いました。その結果、MIG6 ノックアウト細胞では、EGFR 経路が過剰に活性化され、薬剤耐性が誘導されることが明らかになりました。特にヒトの血中濃度に匹敵する 1 ng/mL という低濃度の EGF を共処理することで、顕著な EGFR 活性化が認められ RET 阻害薬耐性が認められました。これに対して、逆に MIG6 を過剰発現させた細胞では、RET 阻害薬への感受性が回復し、耐性が克服されました。以上より、EGFR 経路の負の制御因子である MIG6 遺伝子の欠損は RET-TKI 耐性に寄与することが示唆されました。

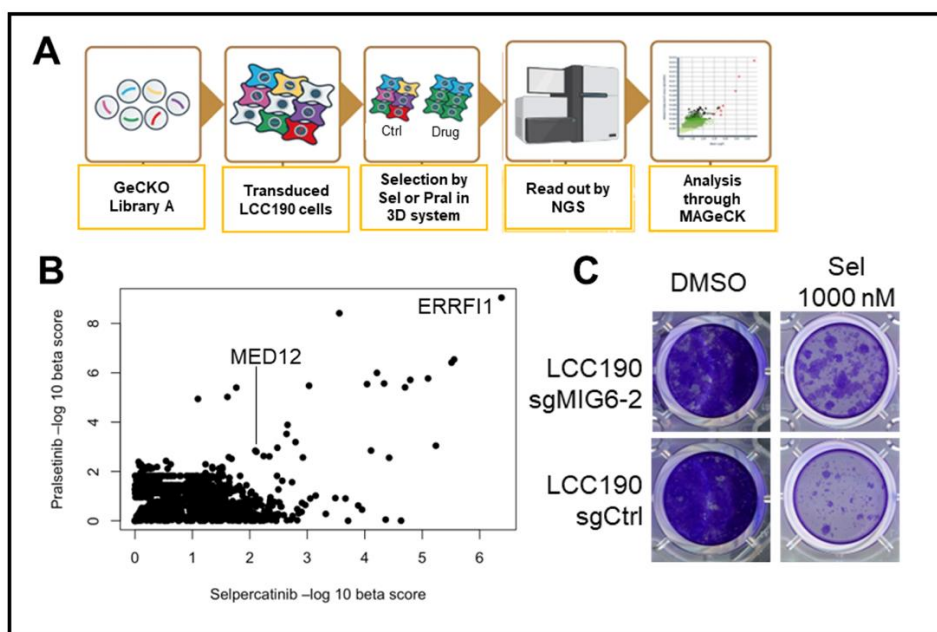


図 2. Crispr/Cas9 スクリーニングから同定された ERRFI1 (MIG6) の欠損は RET 阻害薬抵抗性に関わる。

A: CRISPR スクリーニングによる治療残存細胞の生存関連因子のスクリーニング法。B: スクリーニングの結果同定された因子として ERRFI1(MIG6)と MED12 等を図示。C: MIG6 をノックアウトすると RET 阻害薬 (Sel: Selpercatinib) 処理時の治療残存細胞が多くなることを示す実験結果。

MIG6 の欠損による RET 阻害薬耐性はリガンド依存的な EGFR の過剰活性化が主な原因であると考え、その克服には、EGFR の阻害が有効であると推定しました。そこで、MIG6 を欠損させた LC2/ad と LCC-190 細胞を用いて RET 阻害薬と EGFR 阻害剤 (アファチニブや抗 EGFR 抗体セツキシマブ) の併用実験を行いました。コロニー形

成アッセイおよび細胞生存率試験を通じて、これらの併用療法が治療残存細胞数を減少させ、RET 阻害薬耐性細胞の薬剤感受性を回復させることが明らかになりました。免疫不全マウスに LCC-190 細胞を移植したゼノグラフトモデルを用いて RET 阻害薬と EGFR 阻害抗体を併用する治療実験を行ったところ、腫瘍の増殖が顕著に抑制されました。

一方で、同様に RET 陽性肺がん患者より樹立した RET 融合遺伝子陽性肺がん細胞株の LCC-175 は KIF5B-RET 融合遺伝子を有しているにもかかわらず、2D でも 3D の培養条件でも RET 阻害薬に強い抵抗性を示しました（初期耐性）。詳細な解析から LCC-175 細胞では EGFR 経路が強く活性化されており、RET 阻害剤に耐性を示していました。そこで RET-TKI とアファチニブを併用し、細胞生存率試験を行った結果、この併用療法が LCC-175 の増殖を顕著に抑制しました。以上の結果より、LCC-175 細胞に対しても、RET 阻害薬と EGFR 阻害薬を併用することで薬剤耐性を克服できることが示唆されました。

本研究から、EGFR 経路を抑制する MIG6 遺伝子の欠損は RET 阻害薬耐性に寄与することが示唆され、EGFR 経路の活性化が RET 阻害薬耐性の 1 つの原因であることを基礎研究レベルで示し、RET-TKI と EGFR 阻害薬の併用による耐性克服の可能性について報告した。(図 3)

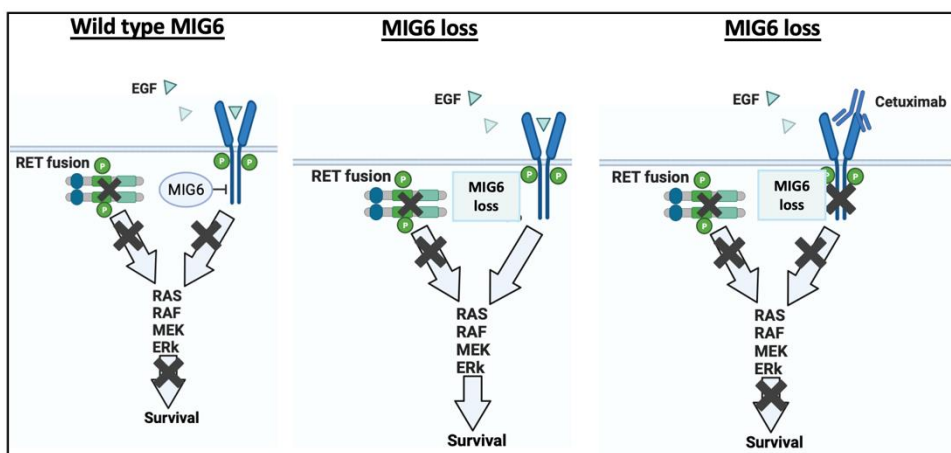


図 3. 本研究の概要。

MIG6 存在下（左）では EGFR シグナルが抑制されているため RET 阻害剤に感受性を示す。MIG6 が欠損した細胞（中）ではわずかな量の EGF でも EGFR シグナルが活性化し RET 阻害薬耐性が誘導されるため、EGFR を阻害する薬剤や抗 EGFR 抗体 (Cetuximab など) を併用することで耐性は克服できる（右） BioRender により作図。

5. 本研究への支援

本研究は、下記機関・財団より資金的支援等を受けて実施されました。

- ・ 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED） 次世代がん医療加速化研究事業（P-PROMOTE）、革新的がん医療実用化研究事業

- ・日本学術振興会 科学研究費（基盤研究 B, 挑戦的開拓, 若手研究）
- ・日本財団研究助成
- ・公益財団法人武田科学振興財団 研究助成
- ・公益財団法人中外創薬科学財団 特別研究助成
- ・公益財団法人三菱財団 自然科学研究助成
- ・公益財団法人小林がん学術振興会 研究助成

ほか

6. 用語解説

(*注 1) RET 融合遺伝子

RET (Rearranged during Transfection) 遺伝子がコードする RET タンパク質は受容体型チロシンキナーゼです。がん細胞の中には染色体転座や逆位などの現象により、CCDC6 や KIF5B などの遺伝子と RET 遺伝子が融合遺伝子を形成する場合があります。融合遺伝子形成により恒常的に RET 融合タンパク質が発現するとともに、多量体形成を介して、恒常的に RET キナーゼが活性化されることでがん化が促進されると考えられています。

(*注 2) RET 阻害薬

RET 融合タンパク質のキナーゼ活性を抑制する分子標的薬です。本邦においては、RET 阻害薬としてセルペルカチニブが承認されています。

(*注 3) CRISPR/Cas9 スクリーニング

CRISPR/Cas9 は大腸菌由来の Cas9 タンパク質と sgRNA を組み合わせた遺伝子編集技術です。標的遺伝子の配列に合わせた sgRNA を設計することで Cas9 タンパク質が sgRNA と結合した二本鎖 DNA を切断します。それにより、簡便かつ高精度に目的遺伝子からのたんぱく質発現を喪失させることが可能です。この技術を応用してヒトの全遺伝子（約 2 万）を対象にノックアウト細胞を作成し、薬剤処理などの介入後に次世代シーケンサで sgRNA を解析することにより原因遺伝子を特定するといったことが可能となる研究手法です。

❖ がん研究会について

がん研究会は 1908 年に日本初のがん専門機関として発足して以来、100 年以上にわたり日本のがん研究・がん医療において主導的な役割を果たしてきました。基礎的ながん研究を推進する「がん研究所」や、新薬開発やがんゲノム医療研究を推進する「がん化学療法センター」「がんプレジジョン医療研究センター」、さらに新しい医療の創造をする「がん研有明病院」を擁し、一体となつてがんの克服を目指しています。

ウェブサイト：<https://www.jfcr.or.jp/>

本件に関するお問い合わせ先

公益財団法人がん研究会 社会連携部 広報課

住所:東京都江東区有明 3-8-31 TEL:03-3570-0775 E-mail: ganken-pr@jfcr.or.jp