

論文内容の要旨

Induction of resistance to neurotrophic tropomyosin-receptor kinase inhibitors by

HMGCS2 via a mevalonate pathway

HMGCS2 によるメバロン酸経路を介した NTRK 阻害薬に対する耐性化誘導

日本医科大学医学研究科大学院 呼吸器内科学分野大学院生

加藤 泰裕

Cancer Medicine 2024 年 掲載予定

## 【背景】

NTRK 遺伝子は神経細胞の分化維持に関わる遺伝子であり、ETV6、TPM3などを代表とする遺伝子と融合して、癌化を誘導する Oncogenic driver 遺伝子として知られている。近年 NTRK チロシンキナーゼ阻害薬 (NTRK-TKI) の開発が進み、進行期 NTRK 融合遺伝子陽性の悪性腫瘍に対して Entrectinib、Larotrectinib が本邦でも承認され、良好な治療効果が示されている。しかしながら、薬剤耐性化とその克服が今後の課題となっている。

## 【目的】

NTRK-TKI に対する NTRK 融合遺伝子陽性悪性腫瘍の耐性化機序解明と耐性化克服のための新規治療戦略を探索することを目的とした。

## 【方法】

TPM3-NTRK1 融合遺伝子を有する大腸癌細胞株である KM12 を用いて、NTRK-TKI である Larotrectinib、Entrectinib、Selitrectinib に対する耐性細胞株 (KM12-LR、KM12-ER、KM12-SR) を Step-wise 法、シングルセルクローニング法を用いて樹立した。樹立した3種類の耐性細胞株を全エクソンシーケンスとマイクロアレイを用いた mRNA、長鎖ノンコーディング RNA 発現の網羅的解析を行い、耐性化に寄与する因子の同定を行った。同定した因子について *in vitro*、*in vivo* における機能解析を行い、耐性化克服を試みた。

## 【結果】

薬剤感受性試験にて、3つの耐性細胞株でそれぞれの薬剤と交叉耐性が起こっていることを確認した。網羅的 RNA 発現解析では、3つの耐性細胞株で HMGCS2 が共通して高発現であることを見出し、ウエスタンブロット法、定量的 RT-PCR 法を用いて高発現を確認した。全エクソンシーケンスでは KM12-LR では既知の耐性変異である Gly595Arg があることが見出されたが、新規の二次耐性変異は認めなかった。HMGCS2 の下流シグナルのタンパク発現解析にて、メバロン酸経路にかかわる PPAR $\alpha$ 、SREBP2 が共通して KM12 親株、耐性細胞株の HMGCS2 発現と逆相関することを見出した。siRNA を用いた耐性細胞株の HMGCS2 ノックダウンにて、KM12-ER、KM12-SR では NTRK-TKI 感受性が有意に回復し、3つの耐性株で共通してアポトーシス活性が亢進することを明らかにした。さらに HMGCS2 ノックダウン後の細胞株にメバロン酸処理にて、NTRK-TKI に対する耐性化が誘導され、アポトーシス活性が再低下することが示された。以上の結果より、HMGCS2 がメバロン酸経路を介して NTRK-TKI に対する耐性化誘導に寄与しているが示唆された。

耐性化克服を目的に、HMG-CoA レダクターゼである Simvastatin、HMGCS2 発現阻害作用を有する Silibinin を用いて、3つの耐性株にて薬剤感受性試験を施行した。KM12-ER、KM12-SR にて NTRK-TKI との併用により Simvastatin、Silibinin で共に相乗的な増殖抑制効果が示され、アポトーシス活性が3つの耐性株で共通して NTRK-TKI と StatinSilibinin の併用により亢進することを確認した。さらに、KM12 親株を皮下移植したマウスゼノグラフトモデルを用いて Entrectinib を投与したところ、腫瘍増殖の抑制およ

び腫瘍内の HMGCS2 の高発現を確認した。KM12-ER を用いたゼノグラフとマウスモデルにおいても Simvastatin と NTRK チロシンキナーゼ阻害薬の併用群で有意に腫瘍増殖の抑制効果を認めた。

#### 【考察】

本研究にて、HMGCS2 の高発現によるメバロン酸経路を介した NTRK-TKI による耐性機序を明らかにした。本知見は新規治療標的として有望であり、既存の高コレステロール血症治療薬である Statin が有用である可能性が示唆された。二次耐性変異を獲得した KM12-LR では、HMGCS2 ノックダウンや Statin 投与にて有意な相乗効果を示さず、HMGCS2 での耐性機序は既知の耐性変異と独立した機序である可能性が示唆された。

#### 【結論】

HMGCS2 はメバロン酸経路を介して NTRK-TKI に対する耐性化に寄与しており、新規治療標的となり得る。