

論文内容の要旨

Phosphoproteomic Analysis Identified Mutual Phosphorylation of FAK and Src

as a Mechanism of Osimertinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer

リン酸化プロテオーム解析による EGFR 変異肺癌におけるオシメルチニブ

耐性のメカニズムとしての FAK と Src の相互リン酸化の同定

日本医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学分野

大学院生 戸塚 猛大

JTO Clinical and Research Reports

Volume 5, Issue 4, April 2024

【背景】

上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor; EGFR)遺伝子変異等のドライバー遺伝子を標的とする分子標的治療薬により、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer : NSCLC)の予後は大きく改善した。*EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC において、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)であるオシメルチニブは進行期だけでなく、術後補助化学療法においても標準治療であるが、オシメルチニブ耐性化克服が臨床上の課題である。オシメルチニブの耐性機序に関する研究の多くは、*EGFR* 遺伝子 2 次変異や他の遺伝子変異・遺伝子増幅等に注目したものであり、遺伝子異常に依らない耐性化機序は十分に検討されていない。

【目的】

リン酸化プロテオーム解析を用いて、*EGFR* 遺伝子変異陽性 NSCLC におけるオシメルチニブ耐性化機序を明らかにし、新規治療標的を同定することを目的とした。

【方法】

EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌細胞株(PC-9、HCC827)及び、それらのオシメルチニブ耐性株(PC-9OR、HCC827OR)を使用した。高感度質量分析を用いて、耐性株と親株のリン酸化プロテオミクスプロファイルを比較した。上流のキナーゼは、Kinase Enrichment Analysis version 3(KEA3)を用いて推定した。リン酸化プロテオーム解析及び上流キナーゼの解析に基づき同定された治療標的について、低分子干渉 RNA(small interfering RNA; siRNA)や特異的阻害薬を用いた *in vitro* での機能解析を行った。また、特異的阻害薬の *in vitro* での細胞増殖抑制効果の検証、異種移植マウスモデルにおける腫瘍増殖抑制効果の検証を行った。さらに、オシメルチニブ耐性化前後の患者腫瘍組織を用いて免疫組織化学染色を行った。

【結果】

高感度質量分析により約 17000 のリン酸化タンパク部位を網羅的に解析した。2 種類の耐性株で発現が上昇した 80 のリン酸化タンパク部位を同定した。KEA3 を用いた解析により、focal adhesion kinase(FAK)と proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (Src)が、これらのリン酸化タンパク質の上流キナーゼとして推定された。耐性株において、FAK 特異的 siRNA 処理により Src のリン酸化が低下し、Src 特異的 siRNA 処理により FAK のリン酸化が低下し、FAK と Src が相互にリン酸化されることが示唆された。また、FAK および Src 特異的 siRNA 処理を行うと、耐性株の EGFR リン酸化が回復した。FAK と Src の阻害薬の併用は、*in vitro* で高い細胞増殖抑制効果を示した。耐性株において、Src 特異的 siRNA 処理により FAK 阻害薬の効果が高まり、FAK 特異的 siRNA 処理により Src 阻害薬の効果が高まることを確認した。Synergy score を算出し、FAK と Src の阻害薬の併用効果は相加的ではなく相乗的であることを確認した。オシメルチニブ耐性腫瘍の異種移植マウスモデルでは、FAK と Src の阻害薬の併用により腫瘍増殖が有意に抑制された。*EGFR* 遺伝子変異陽性患者腫瘍組織の免疫組織化学染色にて、7 例中 2 例でオシメルチニブ耐性

化後に FAK と Src のリン酸化が上昇していた。

【考察】

本研究では、肺癌細胞株のリン酸化プロテオーム解析を行い、FAK と Src の相互リン酸化がオシメルチニブ耐性化に関わることを明らかにした。FAK と Src の阻害薬の併用は相乗効果であると考えられた。また、臨床検体による検討にて、オシメルチニブ耐性化後に FAK と Src のリン酸化の上昇を認める症例が確認された。以上より、FAK と Src の阻害薬の併用治療はオシメルチニブ耐性化後の有望な治療であると考えられる。リン酸化プロテオーム解析を用いることで、遺伝子解析のみでは同定できなかった新たなオシメルチニブ耐性化機序を明らかにすることができた。

【結論】

FAK と Src の相互リン酸化がオシメルチニブ耐性化に関与しており、これらのキナーゼの阻害は耐性化後の新規治療戦略となり得る。リン酸化プロテオーム解析は、肺癌の分子標的治療に対する耐性化機序の解明に役立つ可能性がある。