

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06754

研究課題名(和文) CGH解析に基づいた消化器癌におけるEGFR阻害剤の新たなバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Novel biomarkers for EGFR inhibitors in gastroenterological cancers based on CGH analyses

研究代表者

富樫 庸介 (Togashi, Yosuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員

研究者番号：80758326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：CGH解析から明らかになったFGF9・MAP3K10・AKT2遺伝子について、FGF9とAKT2については強制発現株でEGFR阻害剤への耐性化への関与が示唆され、それぞれFGFR阻害剤とPI3K阻害剤で耐性化の解除も確認した。一方でMAP3K10について耐性化は認められなかった。
臨床検体では145例の大腸癌手術検体でFGF9遺伝子の増幅を調べたところ、8例で増幅を認め、KRAS野生型に多い傾向にあった(7/96)。さらに抗EGFR抗体使用コホートでも著効例には増幅は認めなかったが耐性例には1/7例で増幅を認めた。また進行膵癌ではAkt2高発現症例でEGFR阻害剤への耐性傾向を認めた。

研究成果の概要(英文)：The CGH analysis has shown that FGF9, MAP3K10, and AKT2 genes can be related to the resistance to EGFR inhibitors. Using overexpressing cell lines, the resistance has been demonstrated in FGF9 and AKT2 genes, which can be cancelled by FGFR and PI3K inhibitors, respectively, but not in MAP3K10 gene.
In clinical samples, FGF9 amplification was observed at a frequency of 8/145 (5.5%) and tended to be related to wild-type KRAS (7/96, 7.3%). Furthermore, FGF9 amplification was not observed in any of the samples from the 15 responders to anti-EGFR therapies but was observed in one sample from the seven non-responders with wild-type KRAS. In addition, the difference was not significant, pancreatic cancer patients with high levels of Akt2 expression tended to have a poorer response and a shorter progression-free survival period after treatment with an EGFR inhibitor than those with low expression levels.

研究分野：腫瘍免疫・腫瘍ゲノム解析

キーワード：EGFR阻害剤 大腸癌 膵癌 FGFRシグナル PI3Kシグナル

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) は細胞の成長や生存を促進するため、癌との関係も深く治療標的として薬剤の開発が進められてきた。その中で EGFR チロシンキナーゼ阻害剤は EGFR 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌に対して著効することが示されており、非小細胞肺癌における EGFR 遺伝子変異は EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の効果予測バイオマーカーとして認識されている (1)。一方で他の癌腫に対しても EGFR 阻害剤は使用されており、特に大腸癌ではセツキシマブやパニツムマブといった抗 EGFR 抗体や、肺癌では EGFR チロシンキナーゼ阻害剤のエルロチニブが臨床応用されている。大腸癌の場合には EGFR シグナルの下流に存在する RAS 遺伝子変異が抗 EGFR 抗体の効果無効を予測するバイオマーカーとして知られているが (2)、RAS 変異で患者選択をしても無効な患者も存在し、さらなるバイオマーカーが求められている。

2. 研究の目的

EGFR 阻害剤 (抗 EGFR 抗体並びに EGFR チロシンキナーゼ阻害剤) の感受性と Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法から得られた候補遺伝子との関係を解析し、消化器癌における EGFR 阻害剤の新たなバイオマーカーを見つける目的で本研究を計画した。

3. 研究の方法

EGFR 阻害剤の感受性に関する基礎的解析

我々は抗 EGFR 阻害療法が有効な細胞株を FGF9、MAP3K10、AKT2 を強制発現させた株を作成し、これらを利用して EGFR チロシンキナーゼ阻害剤、抗 EGFR 抗体の感受性に差があるかを *in vitro*, *in vivo* で解析し明らかにする。

大腸癌臨床検体を用いた解析

基礎解析の結果で抗 EGFR 抗体療法の感受性に差が見られた遺伝子について大腸癌手術検体で実際の増幅の頻度を検討し、さらに

セツキシマブ・パニツムマブの効果との相関関係を明らかにする。

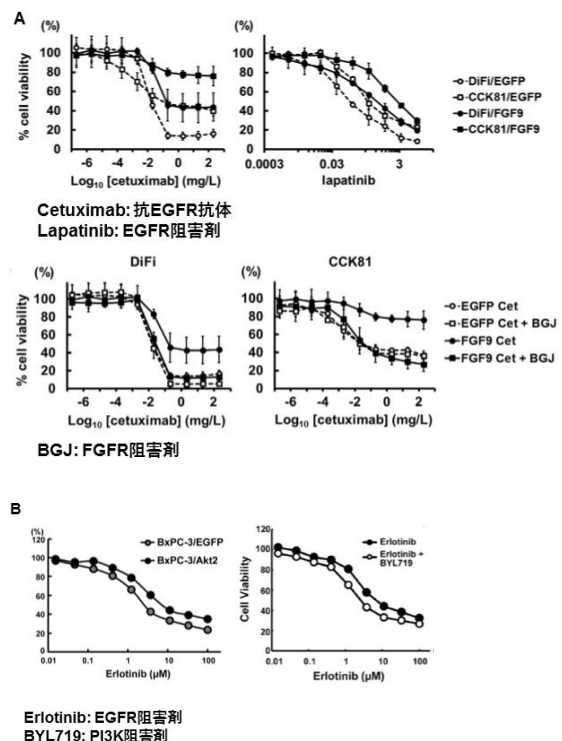
肺癌臨床検体を用いた解析

基礎解析の結果でエルロチニブ感受性に差が見られた遺伝子について肺癌生検検体で実際の増幅の頻度を、と同様に検討し、エルロチニブの効果との相関関係を明らかにする。

4. 研究成果

臨床検体の CGH 法解析から得られた FGF9 遺伝子や MAP3K10 遺伝子・AKT2 遺伝子の増幅について遺伝子強制発現株を作成したところ、FGF9 と AKT2 遺伝子については EGFR 阻害剤に耐性化し、耐性化が FGFR 阻害剤、PI3K 阻害剤でキャンセルされた (図 1)。一方で MAP3K10 遺伝子については複数の細胞株で実験を行ったが感受性含め表現型には変化を認めなかった。また FGF9 については *vivo* で血管新生への関与も示唆された。

図1



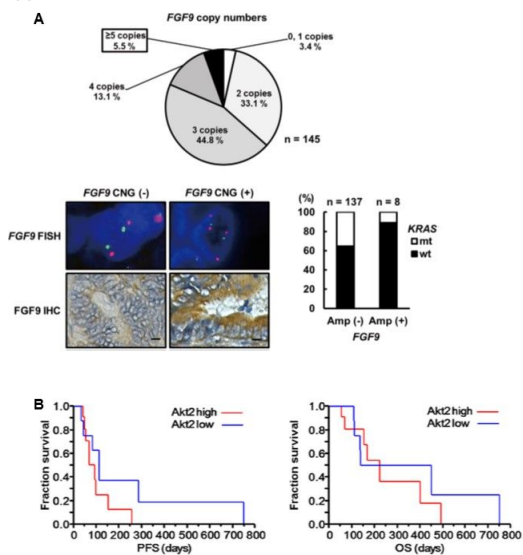
(A) 大腸癌の細胞株 (DIFI, CCK81) に FGF9 を強制発現し、EGFR 阻害剤の効果を検証したところ両方の株で耐性化したが、EGFR 阻害剤と併用することで耐性化は解除された。
 (B) 肺癌の細胞株 (BxPC-3) に Akt2 を強制発現したところ、EGFR 阻害剤は耐性化し PI3K 阻害剤の併用で耐性化は解除された。

新たな大腸癌手術検体コホートで FGF9 増幅を探索したところ、145 例中 8 例で認め、

KRAS 野生型に多い傾向にあった。また抗 EGFR 抗体を使用した別のコホートでも調べたところ、薬剤無効 7 例中 1 例で FGF9 増幅を認め、他の耐性に関わる KRAS や NRAS、BRAF、PIK3CA 遺伝子変異とは排他的であった。一方で著効例 15 例中では FGF9 増幅は認めなかった(図 2)。これらのことから KRAS 野生型の大腸癌の中で、ある一定の頻度で FGF9 が EGFR 阻害剤耐性へ関与しており、そういった症例には FGFR 阻害剤の併用が有望であることが示唆された(3)。

また進行膵癌 22 例で AKT2 発現と EGFR 阻害剤の効果を検討したところ高発現群では PFS も OS も短い傾向にあった(図 2)(4)。

図2



(A) 大腸癌の臨床検体で FGF9 遺伝子の増幅を調べたところ、145 例中で 8 例認め、KRAS 野生型群に多い傾向にあった。
(B) 膵癌の臨床検体で Akt2 の発現を調べたところ、低発現群が高発現群に比べて EGFR 阻害剤の無病増悪生存期間 (PFS) が長く、全生存期間 (OS) も長い傾向にあった。

<引用文献>

- 1 . Mok TS, et al. N Engl J Med 2009.
- 2 . Bokemeyer C, et al. Eur J Cancer 2012.
- 3 . Mizukami T and Togashi Y, et al. Mol Carcinog 2017.
- 4 .Banno E and Togashi Y, et al. Int J Oncol 2017.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 26 件)

1. Banno E, Togashi Y, de Velasco MA, Mizukami T, Nakamura Y, Terashima M, Sakai K, Fujita Y, Kamata K, Kitano M, Kudo M, Nishio K. Clinical significance of Akt2 in advanced pancreatic cancer treated with erlotinib. International Journal of Oncology 2017.
2. Mizukami T, Togashi Y, Naruki S, Banno E, Terashima M, De Velasco MA, Sakai K, Yoneshige A, Hayashi H, Fujita Y, Tomida S, Nakajima TE, Fujino T, Boku N, Ito A, Nakagawa K, Nishio K. Significance of FGF9 gene in resistance to anti-EGFR therapies targeting colorectal cancer: a subset of colorectal cancer patients with FGF9 upregulation may be resistant to anti-EGFR therapies. Molecular Carcinogenesis 56: 106-117, 2017.
3. Banno E, Togashi Y, Nakamura Y, Chiba M, Kobayashi Y, Hayashi H, Terashima M, de Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Mitsudomi T, Nishio K. Sensitivities to various EGFR-TKIs of uncommon EGFR mutations L861Q and S768I: what is the optimal EGFR-TKI? Cancer Science 107 1134-40, 2016
4. Nakamura Y, Togashi Y, Nakahara H, Tomida S, Banno E, Terashima M, Hayashi H, De Velasco MA, Sakai K, Fujita S, Okegawa T, Nutahara K, Hamada S, Nishio K. Afatinib against esophageal or head-and-neck squamous cell carcinoma: significance of activating oncogenic HER4 mutations in HNSCC. Molecular Cancer Therapeutics 15 1988-97, 2016.

5. Terashima M, Togashi Y, Sato K, Mizuuchi H, Sakai K, Suda K, Nakamura Y, Banno E, Hayashi H, De Velasco MA, Fujita Y, Tomida S, Mitsudomi T, Nishio K. Functional analyses of mutations in receptor tyrosine kinase genes in non-small cell lung cancer: double-edged sword of DDR2. *Clinical Cancer Research* 22: 3663-71, 2016.
6. Togashi Y, Mizuuchi H, Tomida S, Terashima M, Hayashi H, Nishio K, Mitsudomi T. MET gene exon 14 deletion created using the CRISPR/Cas9 system enhances cellular growth and sensitivity to a MET inhibitor. *Lung Cancer* 90: 590-7, 2015.
7. Yoshioka Y, Togashi Y, Chikugo T, Kogita A, Taguri M, Terashima M, Mizukami T, Hayashi H, Sakai K, De Velasco MA, Tomida S, Fujita Y, Tokoro T, Ito A, Okuno K, Nishio K. Clinicopathological and genetic differences between low-grade and high-grade colorectal mucinous adenocarcinoma. *Cancer* 121: 4359-68, 2015.
8. Kobayashi Y, Togashi Y, Yatabe Y, Mizuuchi H, Jangchul P, Kondo C, Shimoji M, Sato K, Suda K, Tomizawa K, Takemoto T, Hida, T, Nishio K, Mitsudomi T. EGFR exon 18 mutations in lung cancer: molecular predictors of augmented sensitivity to afatinib and neratinib as compared with first or third generation TKIs. *Clinical Cancer Research* 21: 5305-13, 2015.
9. Togashi Y, Mizuuchi H, Kobayashi Y, Hayashi H, Terashima M, Sakai K, Banno E, Mizukami T, Nakamura Y, de Velasco MA, Fujita Y, Tomida S, Mitsudomi T, Nishio K. An activating ALK gene mutation in ALK IHC-positive/FISH-negative non-small cell lung cancer. *Annals of Oncology* 26: 1800-1, 2015.
10. Togashi Y, Hayashi H, Oakamoto K, Fumita S, Terashima M, De Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Tomida S, Nakagawa K, Nishio K. Chronic nicotine exposure mediates resistance to EGFR-TKI in EGFR-mutated lung cancer via an EGFR signal. *Lung Cancer* 88: 16-23, 2015.
11. Togashi Y, Kogita A, Sakamoto H, Hayashi H, Terashima M, De Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Tomida S, Kitano M, Okuno K, Kudo M, Nishio K. Activin signal promotes cancer progression and is involved in cachexia in a subset of pancreatic cancer. *Cancer Letters* 356: 819-27, 2015.
12. Togashi Y, Hayashi H, Terashima M, De Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Tomida S, Nakagawa K, Nishio K. Inhibition of beta-catenin enhances the anticancer effect of irreversible EGFR-TKI in EGFR-mutated non-small cell lung cancer with a T790M mutation. *Journal of Thoracic Oncology* 10: 93-101, 2015.
13. Ueki N, Matsuo Y, Togashi Y, Kubo T, Shibuya K, Iizuka Y, Mizowaki T, Togashi K, Mishima M, Hiraoka M. Impact of pretreatment interstitial lung disease on radiation pneumonitis and survival after stereotactic body radiation therapy for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 10: 116-25, 2015.
14. Hayashi H, Arao T, Togashi Y, Kato H, Fujita Y, De Velasco MA, Kimura H, Matsumoto K, Tanaka K, Okamoto I, Ito

A, Yamada Y, Nakagawa K, Nishio K. The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer. *Oncogene* 34: 199-208, 2015.

(他英文 12 編全て査読あり)

[学会発表] (計 22 件)

1. 富樫庸介、他、Clinicopathological and genetic differences between low-grade and high-grade colorectal mucinous adenocarcinoma、第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2016 年 7 月 29 日神戸
2. 富樫庸介、他、Anticancer activities of various EGFR-TKIs against uncommon EGFR-mutated non-small cell lung cancer、第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2016 年 7 月 30 日神戸
3. 吉岡康多、富樫庸介、他、大腸粘液癌の分化度による臨床病理学的・分子生物学的な相違、第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016 年 4 月 15 日大阪
4. 千葉真人、富樫庸介、他、稀な EGFR 遺伝子の耐性二次変異 (L747S, D761 Y, T854A)における各種 EGFR-TKI の感受性、第 57 回日本肺癌学会総会 2016 年 12 月 20 日福岡
5. 竹内美子、富樫庸介、他、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌で細胞障害性 T リンパ球浸潤が減少する分子学的機序、第 57 回日本肺癌学会総会 2016 年 12 月 21 日福岡
6. Masato Terashima, Yosuke Togashi, et al. DDR2 E655K mutations proteins are targeted for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway and lose their functions. 第 75 回日本癌学会総会 2016 年 10 月 8 日横浜
7. Yu Nakamura, Yosuke Togashi, et al. Afatinib against HNSCC or ESCC: significance of activating oncogenic *HER4* mutations in HNSCC. 第 75 回日本癌学会総会 2016 年 10 月 7 日横浜
8. Yosuke Togashi, et al. Afatinib activity against head-and-neck or esophageal squamous cell carcinoma: significance of activating oncogenic *HER4* mutations in head-and-neck squamous cell carcinoma. ESMO Asia 2015 年 12 月 20 日シンガポール
9. 小林祥久、富樫庸介、他、EGFR exon18 変異肺癌の頻度と各世代 EGFR-TKI に対する奏効率の違い、第 56 回日本肺癌学会総会 2015 年 11 月 27 日横浜
10. 富樫庸介、他、非小細胞肺癌における受容体チロシンキナーゼ遺伝子変異の探索と機能解析・問題点、第 56 回日本肺癌学会総会 2015 年 11 月 27 日横浜
11. Yosuke Togashi, et al. An activating ALK gene mutation in ALK IHC-positive/FISH-negative non-small cell lung cancer. 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2015 年 7 月 17 日札幌
12. 富樫庸介、他、Activin signal in pancreatic cancer、第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2015 年 7 月 18 日札幌
13. 富樫庸介、Therapeutic Drug Monitoring of Erlotinib、第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2015 年 7 月 18 日札幌
14. 水上拓郎、富樫庸介、FGF9 gene amplification can induce resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer、第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2015 年 7 月 18 日札幌
15. 小林祥久、富樫庸介、他、Comparison of various EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) for tumors with EGFR exon 18 mutations、第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2015 年 7 月 18 日札幌
16. Yoshihisa Kobayashi, Yosuke Togashi, et al. EGFR exon 18 mutations in lung

- cancer: molecular predictors of sensitivity to afatinib or neratinib. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月9日名古屋
17. Masato Terashima, Yosuke Togashi, et al. Functional analyses of DDR2 mutations in non-small cell lung cancer. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月9日名古屋
18. Takuro Mizukami, Yosuke Togashi, et al. FGF9 gene amplification can induce resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. European Cancer Congress 2015年9月27日ウィーン
19. Hidetoshi Hayashi, Yosuke Togashi, et al. Receptor tyrosine kinase mutations in non-small cell lung cancer. European Cancer Congress 2015年9月28日ウィーン
20. Yosuke Togashi, et al. Clinicopathological and genetic differences between low-grade and high-grade colorectal mucinous adenocarcinoma. European Cancer Congress 2015年9月27日ウィーン
21. Takuro Mizukami, Yosuke Togashi, et al. FGF9 gene amplification can induce resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. AACR Annual Meeting 2015年4月20日フィラデルフィア
22. Yosuke Togashi, et al. Activin signal promotes cancer progression and is involved in cachexia in a subset of pancreatic cancer. AACR Annual Meeting 2015年4月20日フィラデルフィア
- 〔図書〕(計6件)
1. 佐藤隆美、他、富樫庸介分担執筆、南山堂、What's New in Oncology、2015、30-35
 2. 永井厚志、他、富樫庸介分担執筆、中外医学社、Annual Review 2015呼吸器、2015、133-140
 3. 富樫庸介、メディカルレビュー社、Tumor-educated plateletsによるliquid

- biopsyの可能性、がん分子標的治療、14巻、2016、357-62
4. 富樫庸介、西尾和人、メディカルレビュー社、世代別(第1、2、3)EGFR-TKIの耐性機構、がん分子標的薬治療、14巻、2016、237-43
 5. 西尾和人、富樫庸介、他、日本臨床社、PI3K/mTOR シグナル系と分子標的治療、日本臨床78巻、2015、1315-22
 6. 富樫庸介、西尾和人、日本臨床社、キナーゼ阻害剤とその耐性機構、日本臨床78巻、2015、1323-1329
- 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富樫庸介(TOGASHI Yosuke)
国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・研究員
研究者番号: 80758326