

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18462

研究課題名(和文) 肺癌の個別化治療：HER2 遺伝子変異毎の治療戦略開発

研究課題名(英文) The personalized therapy for lung cancers according several HER2 mutation

研究代表者

富沢 健二 (TOMIZAWA, Kenji)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10420100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、新規HER2阻害剤として、poziotinibが開発され、臨床試験の結果は期待の高いものであった。HER2遺伝子変異をBa/F3細胞株に導入し、poziotinibの有効性を他の8つのチロシンキナーゼ阻害剤と比較した。sensitivity index (SI)を人体に対して推奨されているトラフ濃度でIC90を割った値と定義。poziotinibを曝露して耐性株を作成し、二次変異を検索した。最多の変異であるA775\_G776insYVMA(YVMA)に対して、poziotinibのSIのみが10以下であった。19のpoziotinib耐性株を作成しHER2二次変異のC805Sを検出した。

研究成果の概要(英文)：Recently, a novel HER2 inhibitor, poziotinib has been developed and clinical trial results are being expected. We introduced HER2 mutations into Ba/F3 cells. Poziotinib activity was compared with 8 TKIs. We defined sensitivity index (SI) as an IC90 divided by trough concentration of a given drug at the recommended dose for humans in the literature. In addition, we created resistant clones by exposing poziotinib and HER2 secondary mutations were searched. For most common A775\_G776insYVMA(YVMA), poziotinib was the only drug that had SI of less than 10. We established 19 poziotinib-resistant clones, all of which harbored C805S secondary mutation of the HER2 gene.

研究分野：呼吸器外科 遺伝子研究

キーワード：肺癌 HER2遺伝子変異 薬剤感受性 耐性2次変異

## 1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌(Non-small cell lung cancer; NSCLC)の治療においては遺伝子異常に基づく個別化治療が臨床応用されており、EGFR(epidermal growth factor receptor)変異や ALK(anaplastic lymphoma kinase) 転座を有する NSCLC に対しては、それぞれのキナーゼ阻害剤が1次治療として用いられている<sup>1)</sup>。HER2(Human Epidermal growth factor Receptor2) 遺伝子変異は NSCLC のうち約 2~4%に検出され<sup>2,3)</sup>、HER2 に対する抗体やキナーゼ阻害剤を用いた臨床試験も複数行われてきたが、その臨床効果は乏しく、HER2 変異肺癌に効果的なキナーゼ阻害剤の開発が求められている<sup>4)</sup>。

## 2. 研究の目的

原発性肺癌における HER2 変異は主に Exon 20 挿入変異として生じ、3種類のバリエーション(A775\_G776insYVMA、G776del insVC、P780\_Y781insGSP)がそれらの93%を占める。本研究では、この3種類の HER2 変異バリエーションに対して有効な薬剤を invitro で探索すること、及びその後予測される耐性機序を調べることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 現時点で報告されている HER2 変異ヒト肺癌の細胞株は H1781(G776del insVC)のみである。このような実験でしばしば用いられている Ba/F3 細胞の系を使った。Ba/F3 はマウスの B 細胞系の腫瘍細胞株であるがその増殖はインターロイキン 3(IL3)に依存している。したがって、ドライバー癌遺伝子と思われる癌遺伝子を導入して IL3 非依存性に増殖できれば、その遺伝子はドライバー癌遺伝子であるという有力な証左となる。さらにその細胞に種々の阻害剤を投与することで、感受性の試験、耐性の検討が可能である。まず G776del insVC 変異を導入した Ba/F3 細胞を樹立し、HER2 の抑制作用が知られている9種のキナーゼ阻害剤(erlotinib, afatinib,

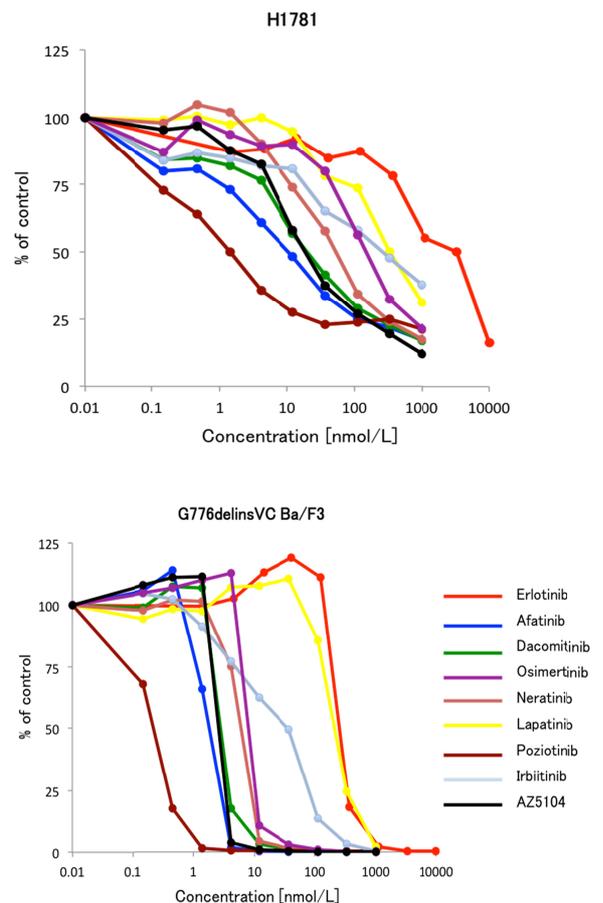
dacomitinib, osimertinib, lapatinib, neratinib, irbinitinib, poziotinib, AZ5104)を用いて両者に対する増殖阻害作用を比較した。

(2) 他の HER2 変異バリエーションについても Ba/F3 細胞に変異を導入し、同様の9剤の細胞増殖阻害効果を検討した。

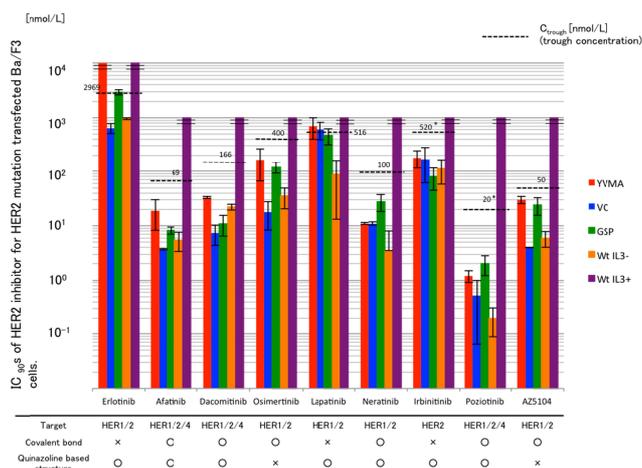
(3) 最も治療効果の高かった HER2 阻害剤で長期的に治療を行った場合、その後どのような獲得耐性を生じるかを検討するため、遺伝子変異を誘導する ENU(N-ethyl-N-nitrosourea)で処理した後、キナーゼ阻害剤に長期暴露し、耐性株を樹立した。HER2 遺伝子のキナーゼドメインをシーケンスし、耐性変異の検出を試みた。

## 4. 研究成果

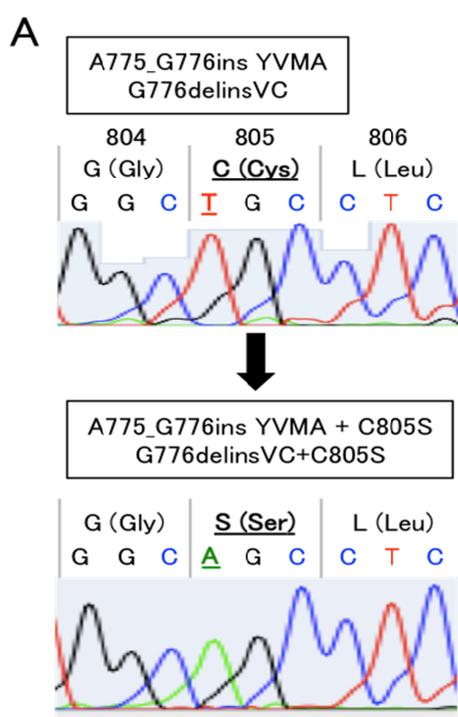
(1) まず、G776del insVC を導入した Ba/F3 細胞と H1781 に対して上記の9種の TKI で増殖阻害試験を行い、薬剤感受性の傾向が類似していることを確認した(下図)。



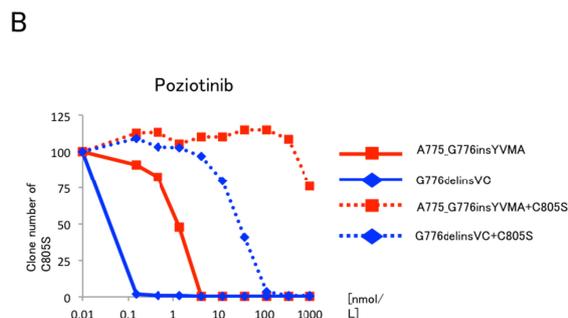
(2) 続いて残りの HER2 変異と野生型 (WT)HER2 を Ba/F3 細胞に導入し、それらの自己増殖能を確認した。これらの遺伝子導入 Ba/F3 細胞に対しても同様の 9 剤を用いて増殖阻害試験を行った (下図)。A775\_G776ins YVMA、G776delinsVC、P780\_Y781insGSP のいずれのバリエーションに対しても poziotinib が強い細胞増殖抑制作用を示した。



さらに A775\_G776insYVMA または G776delinsVC を導入した Ba/F3 細胞に対して ENU による mutagenesis を行い、poziotinib に対して獲得耐性をもたらす二次変異を探索した結果、全ての耐性株において、不可逆的 TKI との共有結合に関わる部位の二次変異である C805S を認めた (下図 A)。



なお、この変異は EGFR 遺伝子に対する第 3 世代 EGFR-TKI オシメルチニブの耐性機序としてしばしばみられる C797S とアミノ酸配列上相同である。この cysteine と薬物のアクリルアミド基が共有結合をつくるためこの変異によって耐性化すると考えられる。C805S 変異を有するクローンに対して増殖阻害試験を行い、poziotinib への耐性を確認した (下図 B)。



< 引用文献 >

- Herbst et al, The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 2018;553:446-454.
- Stephens et al, intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 2004;431:525-526.
- Shigematsu et al, Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer research* 2005;65:1642-1646.
- Arcila et al, Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2012;18:4910-4918.
- Mazieres et al, Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: results from the European EUHER2 cohort. *Ann Oncol* 2016;27:281-286.

5 . 主な発表論文等

[学会発表] (1件)

Takamasa Koga, Activity of novel HER2 inhibitor, poziotinib, for various mutations in exon 20 of the HER2 gene present in adenocarcinoma of the lung and mechanism of acquired resistance.

世界肺癌学会、2018年

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

富沢 健二 (Tomizawa Kenji)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10420100