

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16037

研究課題名(和文)EGFR(上皮成長因子受容体)遺伝子変異陽性肺癌における遺伝学的機序の解明

研究課題名(英文)Whole-exome sequencing of familial non-small cell lung cancer patients with the EGFR gene mutations

研究代表者

東出 直樹(Tode, Naoki)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師

研究者番号：00732223

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):EGFR遺伝子変異陽性肺癌は、「アジア人、女性、非喫煙者」に多く、遺伝学的背景が示唆されている。その機序を明らかにすることを目的として、3家系の患者8人、家系内未発症者2人および健康者2人の計12人に対して、末梢血DNAを用いたエクソーム解析を行った。その中で、チロシンキナーゼ受容体の一つであるMETに新規遺伝子異常(N375K)があることに着目した。その結果、この遺伝子変異によりMETとそのリガンドである肝細胞増殖因子(HGF)との親和性が極端に低下することで、METがもたらす細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が抑制された。またこの遺伝子変異により、EGFRの下流シグナルも抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR遺伝子変異陽性肺癌は、チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)によって制御可能な癌と捉えられるようになった。一方で、肺腺癌の約25%がEGFR-TKIに自然耐性を示すとされ、かつ奏功症例においてもその大半が1年程度で耐性を獲得して再発することが知られており、実臨床の場において耐性化の克服が喫緊の課題となっている。今回、EGFR遺伝子変異陽性肺癌の家族例に対してゲノム解析を行うことで、その責任遺伝子異常の同定を試みた。今後さらに研究をすすめることで責任遺伝子が明らかとなれば、新しい治療標的を創出できるだけでなく、採血するだけの非侵襲的な検査で発症リスクの評価が可能となる。

研究成果の概要(英文):Incidence of lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations seems to depend on genetic background. To gain an insight into the genetic factors, we have performed whole exome sequencing of peripheral blood DNA from 8 patients with familial adenocarcinoma positive for EGFR gene mutations, 2 unaffected siblings and 2 unrelated healthy individuals.

In the present study, we identified a de novo MET mutation coding for N375K. We demonstrate that the mutated MET reduces the affinity for hepatocyte growth factor. The wild-type-transduced lung cancer H1299 cells increased the MET-mediated cellular activities including proliferation, migration and invasion, whereas the mutant-transduced cells did not. Consistently, MET-mediated activation of the HER2/PI3K/AKT signaling pathway was attenuated to some extent in H1299 cells expressing the mutated MET gene.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR遺伝子変異 肺癌 エクソンシーケンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌は本邦における死因の第1位であり、中でも肺癌は癌死の原因の第1位となっている。その中で、われわれの臨床試験 (N Engl J Med. 2010;362:2380-8) も一助となり、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異陽性肺癌は、EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) によって制御可能な癌と捉えられるようになった。一方で、肺腺癌の約25%がEGFR-TKIに自然耐性を示すとされ、かつ奏功症例においてもその大半が1年程度で耐性を獲得して再発することが知られており、実臨床の場において耐性化の克服が喫緊の課題となっている。耐性化のメカニズムは、近年次々と明らかになってきており、EGFR 遺伝子の2次的変異 (T790M) をはじめとして、MET や HER family などのEGFR 近傍の経路の活性化、上皮間葉転移、肺小細胞癌への transformation に免疫回避のシステムなど、実に多様なネットワークが存在する (Cancer Discovery . 2014;4:991-4)。それぞれに応じた治療薬の研究・開発が行われているものの、これらが複雑に相互作用していることも、EGFR-TKI 耐性化の克服をさらに難しいものとしている。そのため、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌のさらなる予後改善を目指すために、耐性化の克服とは別の視点でEGFR-TKI 治療における新たな治療標的を同定することが望まれている。

また、これまで肺癌の家族集積は稀であることから、ほとんどの肺癌は「単一遺伝疾患」ではなく、effect size の小さいいくつかの遺伝子多型や環境要因が複合した「多因子疾患」であると考えられてきた。実際に全ゲノム関連解析 (GWAS) や症例対象研究からこれまでに明らかにされた、数多くの遺伝子領域や感受性遺伝子は、オッズ比が1.1~2.0程度とeffect size の小さいものがほとんどであった。

しかし、肺癌の中でもEGFR 遺伝子変異陽性肺癌は、性別や人種によって差がみられ、「腺癌、アジア系人種、女性、非喫煙者」といった臨床背景をもつ患者に高頻度で生じていることが知られている。また、近年の分子遺伝学の進歩に伴い、肺癌に関連した体細胞変異が数多く同定されてきているが、KRAS 遺伝子変異や EML4-ALK 遺伝子変異などの他の体細胞変異に比べて、EGFR 遺伝子変異陽性の肺癌患者は2倍以上の肺癌家族歴を有する (Lung cancer. 2013;79:193-7) ことが言われている。

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌がこのように明らかな「人種差」、「性差」そして「家族歴」を有することは、その発生母地に比較的effect size の大きな何らかの遺伝学的素因があること、そしてそれは体細胞変異ではなく家族間に遺伝しうる生殖細胞レベルの遺伝子変異である可能性を示唆している。

### 2. 研究の目的

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌は、「アジア系人種、女性、非喫煙者」に多く、その発癌機構として遺伝学的背景が示唆されている。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の遺伝学的背景を再認識させられる症例を、最近われわれは相次いで経験した (J Thorac Oncol. 2008;3:311-3)。まずは、7人の兄弟姉妹のうち、4人の姉妹に肺癌が発症している家系Aで、うち3人の肺癌細胞でEGFR 遺伝子変異を確認している (図1)。点変異と欠失変異の二種類の遺伝子変異が姉妹内で混在していたことは、EGFR 遺伝子変異そのものが遺伝しているわけではなく、発癌を導く遺伝学的背景が家系内に伝承されていることを示唆している。続いて経験したのは、母娘の家族内発症例で、いずれもEGFR 遺伝子に点変異を有する肺癌であった (図2)。娘の発症年齢が43才と若年性肺癌であったことから、発癌の原因に遺伝学的背景が推察された。

その他に姉弟の家族内発症例とあわせて、3家系の患者8人、家系内未発症者2人および健常人2人の計12人に対し、末梢血DNAを用いてエクソーム解析 (全エクソームのシーケンシング) を行い、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の原因遺伝子異常を明らかにすることを目的とした。

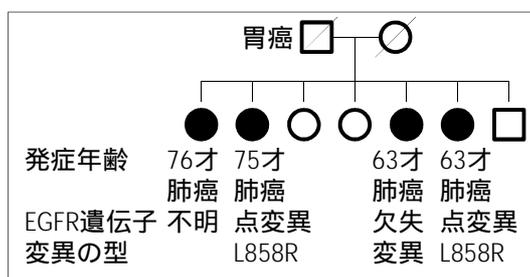


図1: 家系 A

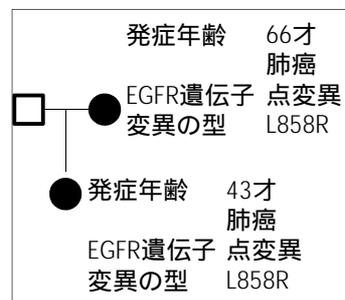


図2: 家系 B

### 3. 研究の方法

#### (1) エクソーム解析

EGFR 遺伝子変異陽性肺癌が集積している3家系患者8人のエクソーム解析を行う。遺伝子機能の変化する変異のうち、健常人にはなく家系内あるいは患者8人に共通する変異を同定する。

#### (2) 同定遺伝子変異の機能評価

同定された遺伝子Aの変異cDNAを発現するベクターを構築し、ヒト肺癌細胞株へ遺伝子導入

して細胞の機能評価を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 全エクソームシーケンス

SureSelect Human All Exon kit v4 を使用して、抽出した末梢血 DNA からエクソン部分のみを補足し濃縮を行い、HiSeq2000 により生成された約 100 塩基長のリードをヒトゲノムの参照配列 (UCSCChg19) にマッピングした。1 サンプル当たり平均約 162 万個のリードが生成され、そのうちの約 99% がリファレンスゲノム上にマッピングされた。マッピングされたリードのうち、30% は重複していたため除去され、そこからさらに 80% のリードのみが 51Mb のターゲット領域に存在していた。ターゲット領域の被覆度は平均約 148 で、被覆度 50 以上のターゲット領域は全体の 84% を占めていた。

1 サンプルあたり約 2 万 3 千個の SNVs が検出され、その内で dbSNP や 1000Genomes など既知のゲノム変異データベースに存在しない新規の遺伝子変異が 4319 個、さらにアミノ酸の変換を伴う遺伝子変異が 1997 個同定された。また、家系内健常者では見られない遺伝子変異が 148 個同定された。PolyPhen2 により、他の生物種とのホモログの配列情報から、変異があった箇所の配列保存性、化学的な特徴、タンパク質構造やドメイン情報をもとに解析した結果、タンパク質の機能に及ぼしうる変異は 15 個、またそのうちで dbSNP など既存のデータベースに今まで報告のない新規の遺伝子変異として MET と BCAS4 の点突然変異がそれぞれ同定された。

MET 遺伝子はがん遺伝子として知られ、近年 EGFR を含めた ERBB 受容体ファミリーと MET との様々な相互作用が、がん細胞のみならず正常細胞においても報告されていることから、次世代シーケンサーにより抽出された多くの遺伝子変異の中で、MET の 375 番目のアミノ酸の塩基配列が AAC (アスパラギン) から AAG (リシン) に変化する遺伝子変異 (N375K) に着目した (図 3)。

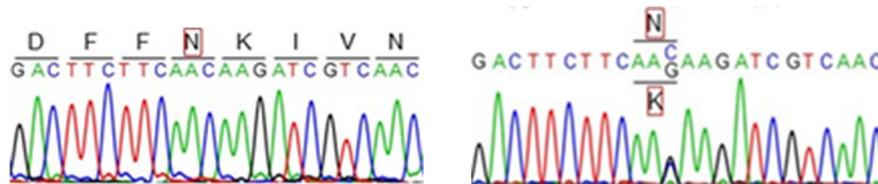


図 3: MET 野生型と変異型 (N375K)

##### (2) MET 遺伝子変異による HGF との親和性解析

MET のリガンドである肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) は、4 個のクリングルドメイン、SPH ドメインの 6 つのドメインから構成される。HGF と MET は 2 ヶ所の結合領域を持つことが知られており、HGF の N 末ドメイン～クリングルドメインの一部と MET の IPT ドメイン、もう一つは HGF の SPH ドメインと MET の SEMA ドメインである。HGF が MET に結合することでダイマー化が起こり、チロシン残基が自己リン酸化されて、PI3K/Akt 経路、MAPK/Erk 経路といった下流へとシグナル伝達が行われる。

MET 蛋白とそのリガンドである HGF 蛋白との親和性を HGF DuoSet ELISA kit (R&D Systems) を使用して ELISA 法により測定した。精製した各 MET-Fc 蛋白 (MET-WT, MET-N375K, MET-N375S) に PBS を加えて 1 µg/ml として、96 ウェルプレートに室温で一晩、固相化させた。ウェルを洗浄後に 1% BSA で 1 時間ブロッキングを行い、リコンビナント HGF を任意の濃度で添加して 2 時間静置した。洗浄した後、ビオチン化した抗ヒト HGF 抗体を添加して、Streptavidin-HRP にて標識した。マイクロプレート (ELISA) リーダーで 450nm の波長を測定し、570nm の波長で補正した。

その結果、MET の野生型に比べて、MET-N375K、MET-N375S とともに HGF との親和性の低下を認め (図 4)、MET と HGF との結合には MET の SEMA ドメインにある 375 番目のアスパラギン残基が重要であることが明らかとなった。また、MET の中和抗体を投与することにより、この親和性が低下することも確認した。

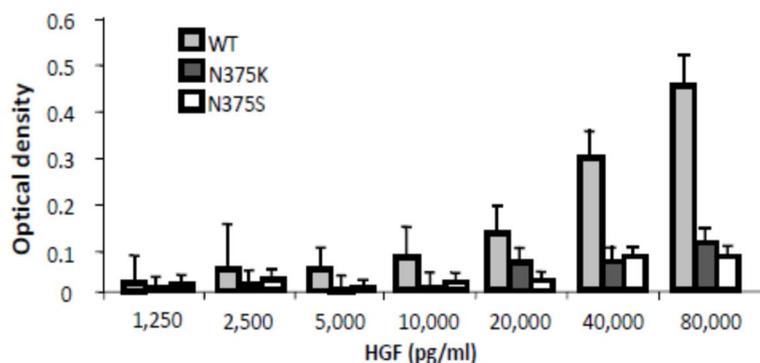


図 4: ELISA による MET と HGF の親和性解析

##### (3) MET 遺伝子変異の機能評価

MET がほとんど発現していない H1299 細胞株にレトロウイルスベクターを用いて、MET を遺伝子導入した。空ベクターのみを導入した細胞株 (null) を陰性対照として MET-WT ならびに MET-N375K 安定発現細胞株を作製した。

#### 細胞増殖アッセイ

MET-WT ならびに MET-N375K を安定的に発現した H1299 細胞株と陰性対照としてベクターのみを形質導入した H1299 細胞株を、100 $\mu$ l の培地中に  $3 \times 10^3$  細胞/ウェルの濃度で 96 ウェルプレートに播種して、一晚培養した。洗浄した後に、serum-free 培地で 24 時間培養することで細胞を血清飢餓状態とした。その後、培地を 1%FBS と 5ng/ml HGF を添加した RPMI 培地に交換して、2 日間あるいは 4 日間培養を続けた。Cell Titer 96 Aqueous One solution (Promega) を加えて 2 時間培養した後に、マイクロプレート (ELISA) リーダーで 490nm の波長を測定した。

図 5 に示すように、MET-N375K では MET を発現していない細胞株と同程度であったが、MET-WT では増殖能の亢進が認められた。

#### コロニー形成アッセイ

MET-WT ならびに MET-N375K を安定的に発現した H1299 細胞株と陰性対照としてベクターのみを形質導入した H1299 細胞株を、60mm ディッシュに  $1 \times 10^3$  細胞ずつ、5.0ng/ml HGF を添加した培地中に播種して、2 週間培養した。PBS で洗浄した後、クリスタルバイオレット染色を行い、形成されたコロニー数を計測した。

図 6 に示すように、MET-N375K では MET を発現していない細胞株と同程度であったが、MET-WT ではコロニー形成能の亢進が認められた。

#### 創傷治癒アッセイ

MET-WT ならびに MET-N375K を安定的に発現した H1299 細胞株と陰性対照としてベクターのみを形質導入した H1299 細胞株を、6 ウェルプレートに  $3 \times 10^5$  細胞ずつ播種して、一晚培養した。洗浄した後に、serum-free 培地で 24 時間培養することで細胞を血清飢餓状態とした。コンフルエントに達した細胞を 1.0ml ピペットチップの先端で直線的に擦過した後、剥がれた細胞片を PBS により洗浄した。培地を 1%FBS と 5ng/ml HGF を添加した RPMI 培地に交換して、48 時間培養を続けた。創傷形成時と比べて、48 時間後の創傷の閉鎖率を算出した。

図 7 に示すように、MET-N375K では MET を発現していない細胞株と同程度であったが、MET-WT では細胞の運動能、遊走能の亢進が認められた。

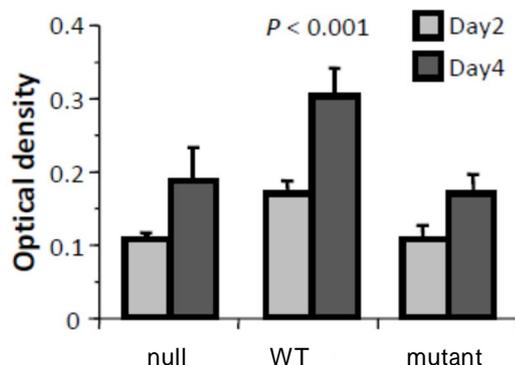


図 5: MTS assay

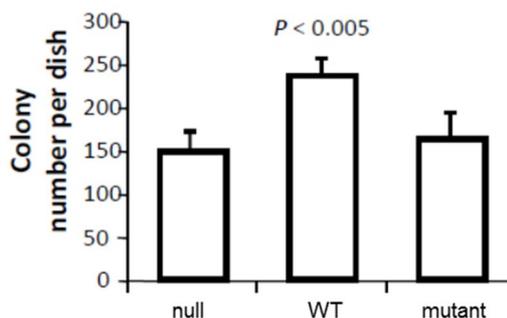


図 6: Colony formation assay

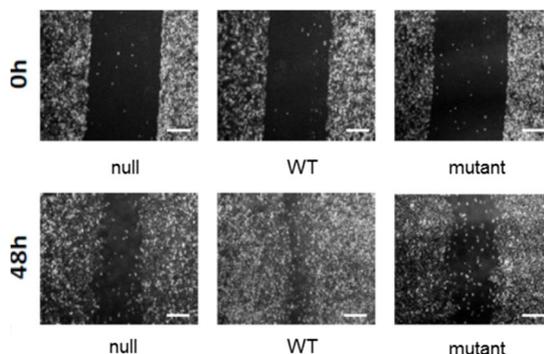


図 7: Wound healing assay

#### (4) MET-N375K がチロシンキナーゼ受容体の下流シグナルに与える影響

MET と EGFR を含めた ERBB に相互関係があることは広く知られている。しかし、各種がんや細胞株の違いによって、MET や ERBB の活性化の状態や発現自体が異なることもあり、その作用機序を含めて詳細は未だ明らかになっていない。肺癌細胞株において、MET-N375K がチロシンキナーゼ受容体の下流シグナルに与える影響をウェスタンブロッティングにより検討した。

EGFR 遺伝子変異がなく、MET の発現がほとんどない H1299 細胞株に MET-WT、MET-N375K を遺伝子導入し

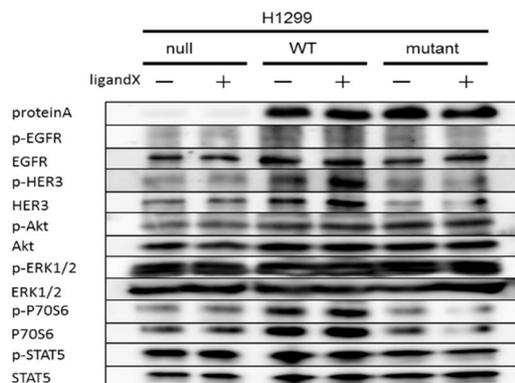


図 8: Western blotting

た。MET の状態に関わらず、PI3K/Akt 経路や MAPK/Erk 経路に影響はみられなかった。しかし、MET-WT を発現させた細胞株では、HER3、p70S6 のリン酸化の亢進、そして発現自体の亢進が認められたものの、MET-N375K では HER3、p70S6 のシグナルの増強が消失していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 21.Tode N, Kikuchi T, Sakakibara T, Hirano T, Inoue A, Ohkouchi S, Tamada T, Okazaki T, Koarai A, Sugiura H, Niihori T, Aoki Y, Nakayama K, Matsumoto K, Matsubara Y, Yamamoto M, Watanabe A, Nukiwa T, Ichinose M	4 . 巻 108
2 . 論文標題 Exome sequencing deciphers a germline MET mutation in familial epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer	5 . 発行年 2017年
3 . 雑誌名 Cancer Sci.	6 . 最初と最後の頁 1263-1270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----