

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18K15214
 研究課題名(和文) HER2遺伝子変異陽性肺癌の分子生物学的特性とリキッドバイオプシーに関する研究

研究課題名(英文) A study of molecular biology and liquid biopsy for non-small cell lung cancer positive for HER2 mutations

研究代表者
 岩間 映二 (Iwama, Eiji)
 九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40567343
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異陽性細胞株においてはHER2の発現が少なくても抗体薬物複合体であるトラスツマブ・エムタンシン(T-DM1)の効果が強い傾向にあった。HER2-HER2ホモダイマーは細胞表面上に、HER2-EGFR、HER2-HER3ヘテロダイマーは細胞内に局在しており、HER2-EGFRヘテロダイマーを介したHER2の内化、T-DM1の治療効果が考えられた。EGFR遺伝子変異陽性症例における血漿中のEGFR遺伝子変異の存在や消失、アレール数の増加の有無はEGFR-TKI治療の効果予測因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、HER2を標的とした分子標的治療薬がHER2高発現の腫瘍以外にも効果を有することが明らかとなり、更なる研究によって治療選択肢の拡大につながる可能性がある。現在、新規研究として「EGFR遺伝子変異陽性肺癌における抗体薬物複合体の作用機序に関する研究」を推進中である。2021年3月ゲノム医療の一環として次世代シーケンサーを用いたリキッドバイオプシー検査が承認され、今後リキッドバイオプシーが日常臨床で使用されるようになる。このような背景において、本研究で示した分子標的治療薬の予後予測におけるリキッドバイオプシーの有用性は重要な意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Trastuzumab emtansine, antibody-drug conjugate, was effective for EGFR mutated-cancer cell lines even though the expression of HER2 was low in the cell lines. Homodimer of HER2-HER2 was localized at the cell surface and heterodimers of HER2-EGFR or HER2-HER3 were located within cells, indicating that HER2 was internalized into cytoplasm via HER2-EGFR heterodimer in EGFR-mutated cell lines. Presence or increase or disappearance of the EGFR activating mutations in plasma was prognostic factors for EGFR-TKI treatment.

研究分野：肺癌

キーワード：HER2 抗体薬物複合体 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌においては、*EGFR* 遺伝子変異、*ALK* 融合遺伝子変異、*ROS-1* 融合遺伝子変異といったドライバー遺伝子変異が同定され、各々に対するチロシンキナーゼ阻害剤 (TKIs) が著効を示すことが報告されている。その効果は従来の細胞障害性薬剤による化学療法を凌駕し、日常臨床におけるキードラッグとなっている。HER2(ERBB2)は Erb ファミリーに属し、ホモダイマーや、他の ErbB ファミリーである ERBB1(EGFR), ERBB3, ERBB4 とヘテロダイマーを形成、細胞内シグナルを活性化し、細胞の増殖、生存、浸潤、転移に関わっている。乳癌や胃癌においては、HER2 陽性 (HER2 タンパク過剰発現、*HER2* 遺伝子増幅) 症例に対して、HER2 を標的とした HER2-TKI (ラパチニブ)、抗 HER2 抗体 (トラスツズマブ、ペルツズマブ) の有効性が報告されている。非小細胞肺癌においても数十%に HER2 陽性症例 (HER2 タンパク過剰発現 6-35%, 遺伝子増幅 10-20%) が存在し、HER2 を標的とした治療が検討されてきたが、その効果は乏しく日常臨床で用いられるに至っていない。一方、非小細胞肺癌の 2-4%に *HER2* 遺伝子変異陽性症例が存在し、リガンド非依存性の二量体結合や、それによる下流シグナルの活性化をもたらすことが報告されており、*EGFR* 遺伝子変異等と同様、ドライバー遺伝子変異と考えられている。しかしながら、*HER2* 遺伝子変異陽性症例に対しても HER2-TKIs であるアフチニブやダコミチニブによる治療効果は奏効率 10%以下と非常に乏しいことが報告されている。その理由として、*HER2* 遺伝子変異の約 80%を占める exon 20 の codon775 への 12 塩基重複挿入変異 (A775_G776 insertion YVMA) においては、778 番目のグリシンがメチオニンに変換することで TKI 結合部位が閉ざされた状態になり、TKI の結合が阻害されることが報告されている (Kosaka T, Cancer Res. 2017)。抗 HER2 抗体とチューブリン重合阻害剤複合体であるトラスツズマブ・エムタンシ (T-DM1) は、HER2 陽性の進行乳癌に対して有効な薬剤として日常臨床において広く用いられている。T-DM1 は HER2 陽性の非小細胞肺癌に対しては有効性が乏しい (奏効率 20%) もの、*HER2* 遺伝子変異陽性症例に対しては奏効率が 44%と良好であり、さらに *HER2* 遺伝子変異陽性の大部分を占める Exon 20 insertion 変異に限れば、奏効率は 60%と非常に良好であることが報告されている (Li BT, ASCO 2017)。しかしながら、同遺伝子変異に関する分子生物学的研究は乏しい。

また、従来、非小細胞肺癌における *EGFR* 遺伝子変異を始めとしたドライバー遺伝子変異検査は、腫瘍組織を利用して行われてきたが、腫瘍が生検困難な場所にある場合、患者の状態が悪い場合などは組織採取が不可能であり、遺伝子検査を行うことが出来なかった。このため、末梢血中に遊離してきた腫瘍由来の DNA (cfDNA) の体細胞変異を検出するリキッドバイオプシー研究が国内外で行われ、*EGFR* 遺伝子変異に関しては cfDNA からの検出が日常臨床で利用可能となっており、薬剤選択に利用されている。

2. 研究の目的

本研究では次の 2 つの項目を目的とする。

- 1) *HER2* 遺伝子変異に関する T-DM1 の作用機序を明らかにする。
- 2) cfDNA からの非侵襲的なりキッドバイオプシーの有用性を検討する。

3. 研究の方法

1. 各細胞株における T-DM1 の感受性の検討

HER2 遺伝子変異のタイプは多種多様なものが報告されているが、exon 20 insertion 変異の A775_G776 insertion YVMA が約 80%を占めている。これまでの少数例を対象とした T-DM1 の臨床試験ではこの変異に対する効果が期待される。HER2 exon20 挿入変異陽性細胞株である H1781、HER2 発現の少ない肺癌細胞株である H23 に HER2 exon20 挿入変異を強制発現させた安定細胞株 (H23-HER2mut)、EGFR 遺伝子変異陽性細胞株、EGFR と HER2 とともに野生型である細胞株に対して HER2 の抗体薬物複合体である T-DM1 (トラスツズマブエムタンシン) を負荷し、MTS assay にてその感受性を確認する。

2. PLA 法を用いた HER2 ホモダイマーやヘテロダイマーの検出方法の確立

HER2はErbBファミリーに属し、ホモダイマーを形成するだけでなく、他のErbBであるEGFR, ErbB3, ErbB4とヘテロダイマーを形成する。乳癌においてはHER2とErbB3のヘテロダイマーが腫瘍の生存に重要であることが分かっており、その結合を阻害する治療戦略(ペルツズマブ)が奏効を示すが、肺癌で認められている遺伝子変異陽性のHER2が野生型のHER2と比較して、他のErbBファミリーと強くヘテロダイマーを形成するかどうか、それによって活性化するかどうかを報告したものは無い。我々はダイマー形成を確認する方法としてProximity Ligation Assay (PLA法: 受容体に対する抗体に試薬を結合させ、受容体同士が近づくと試薬間の反応が起こり蛍光を発する)の有用性を報告している(Ota K. Oncotarget 2017)。PLA法を用いてHER2ホモダイマーやヘテロダイマーを検出する方法を確立するとともに、ダイマーとT-DM1の効果の関係について検討を行う。

3. HER2遺伝子変異の高感度かつ定量的検出法の確立とリキッドバイオプシーの有用性の検討

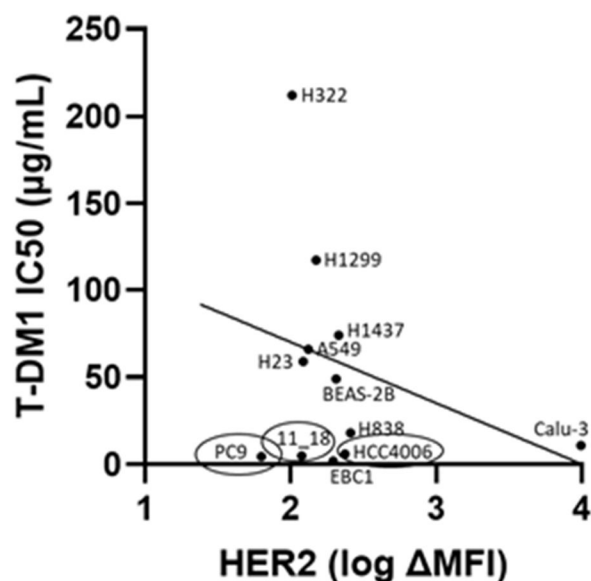
我々は cfDNA 中の EGFR 遺伝子変異のモニタリングを行い、定量的な変化が治療効果と関連することを報告している (Iwama E. Ann Oncol. 2017)。HER2 遺伝子変異を有する症例における血漿検体を用いて dPCR による HER2 遺伝子変異の検出および治療経過中のモニタリングを行う。

4. 研究成果

1. EGFR 遺伝子変異陽性細胞は HER2 抗体薬物複合体に対して感受性を有する。

EGFR 遺伝子野生型の細胞株では HER2 発現の程度と相関して感受性を認め、一方で、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞株においては HER2 発現量が低いにもかかわらず T-DM1 の感受性が高いことを見出した(図1)。このように、ErbB ファミリーを標的とした抗体薬物複合体は EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する新たな治療薬として有望であるだけでなく、EGFR-TKI 耐性をきたした症例においても効果が期待できる。現在、新規研究として「EGFR 遺伝子変異陽性肺癌における抗体薬物複合体の作用機序に関する研究」を推進中である。

(図1)各種細胞株における HER2 発現(FACS) と T-DM1 の IC50 (PC-9, 11-18, HCC4006: EGFR 遺伝子変異陽性細胞株)



2. HER2 ホモダイマーと HER2 ヘテロダイマーは細胞における局在が異なる。

PLA 法を用いて HER2 ホモダイマーと HER2 ヘテロダイマーの局在を調べたところ、HER2-HER2 ホモダイマーは細胞表面上に、HER2-EGFR、HER2-HER3 ヘテロダイマーは細胞内に局在しており、HER2-EGFR ヘテロダイマーを介した HER2 の内在化、T-DM1 の治療効果との関連が示唆された。

3.HER2 遺伝子変異検出方法の確立とリキッドバイオプシーの有用性の検討

現在、次世代シーケンサーを用いた高感度かつ網羅的な遺伝子異常の検出が可能になっており、さらには腫瘍細胞だけでなく血漿からもその検出が可能になり保険適応となっている。このような背景のため、本題に関しては積極的な研究は行えなかった。一方で、我々は *EGFR* 遺伝子変異陽性症例における血漿中の *EGFR* 遺伝子変異の存在や消失、アレル数の増加の有無は EGFR-TKI 治療の効果予測因子であることを示し、報告を行った (Iwama E. Cancer. 2019)。2021 年 3 月ゲノム医療の一環として次世代シーケンサーを用いたリキッドバイオプシー検査が承認され、今後リキッドバイオプシーが日常臨床で使用されるようになる。このような背景において、我々が示した分子標的治療薬の予後予測におけるリキッドバイオプシーの有用性は重要な意義を有する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yonesaka K, Iwama E, Hayashi H, Suzuki S, Kato R, Watanabe S, Takahama T, Tanizaki J, Tanaka K, Takeda M, Sakai K, Azuma K, Chiba Y, Atagi S, Nishio K, Okamoto I, Nakagawa K.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Heregulin expression and its clinical implication for patients with EGFR-mutant non-small cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 19501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55939-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwama Eiji, Sakai Kazuko, Hidaka Noriko, Inoue Koji, Fujii Akiko, Nakagaki Noriaki, Ota Keiichi, Toyozawa Ryo, Azuma Koichi, Nakatomi Keita, Harada Taishi, Hisasue Junko, Sakata Shinya, Shimose Takayuki, Kishimoto Junji, Nakanishi Yoichi, Nishio Kazuto, Okamoto Isamu	4. 巻 126
2. 論文標題 Longitudinal monitoring of somatic genetic alterations in circulating cell free DNA during treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer	6. 最初と最後の頁 219 ~ 227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cncr.32481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otsubo K, Sakai K, Takeshita M, Harada D, Azuma K, Ota K, Akamatsu H, Goto K, Horiike A, Kurata T, Nakagaki N, Nosaki K, Iwama E, Nakanishi Y, Nishio K, Okamoto I.	4. 巻 24(8)
2. 論文標題 Genetic Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer at Development of Resistance to First- or Second-Generation EGFR-TKIs by CAPP-Seq Analysis of Circulating Tumor DNA.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncologist	6. 最初と最後の頁 1022, 1026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1634/theoncologist.2019-0101.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eiji Iwama	4. 巻 109
2. 論文標題 Exploration of resistance mechanisms for epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors based on plasma analysis by digital polymerase chain reaction and next-generation sequencing.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3921-3933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13820.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩間映二、坂井和子、中西洋一、西尾和人、岡本勇
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性肺癌治療における大規模前向きリキッドバイオプシー研究
3. 学会等名 第116 回日本内科学会講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩間映二、坂井和子、西尾和人、岡本勇
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性肺癌治療における前向きリキッドバイオプシー研究
3. 学会等名 がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------