様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　４ 年　　５ 月 ２０ 日現在

機関番号：２４６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ０７７２１

研究課題名（和文）クリニカルシーケンスにて同定される新規遺伝子変異の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel gene mutation identified in clinical sequencing

研究代表者
武田　真幸（Takeda, Masayuki）

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：２０５１０９２８

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）：遺伝子パネルには薬物療法の有効性、確定診断及び予後予測に係る既知の遺伝子が含まれ、遺伝子変異、欠失、挿入、遺伝子融合、コピー数異常等の情報を一度に明らかにすることが可能である。クリニカルシーケンスに於いて、知識データベース上に記載の無い遺伝子変異(variant of uncertain significance: VUS)が散見される。今回、これらVUSについて、立体構造を予測可能なソフトを用い、機能変化を予測した。EGFR遺伝子変異の共変異により、耐性変異の出現を予測することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ドライバー遺伝子陽性肺癌において、遺伝子変異別の複数の分子標的薬が承認されているが、それぞれのドライバー遺伝子陽性症例に於いて、分子標的薬の治療効果に症例間格差があり、また耐性機序も異なる。我々は遺伝子パネル検査を用い、各症例に於ける治療前の組織を用い、Co-mutationの有無及びその機能を評価することで、耐性化の機序が異なることを見出した。このようなデータは、今後耐性遺伝子の出現の予測や耐性克服の研究にもつながる。

研究成果の概要（英文）：The gene panel contains genes known to predict efficacy of drug therapy, definitive diagnosis, and prognosis, and can reveal information on gene mutations, deletions, insertions, gene fusions, copy number abnormalities, etc., all at once. In clinical sequencing, variants of uncertain significance (VUS), which are not listed in the knowledge database, are often found. In this study, we used software that can predict the 3D structure of these VUSs to predict the functional changes in them, and were able to predict the emergence of resistance mutations by co-mutation of EGFR gene mutations.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：遺伝子パネル　ドライバー遺伝子　肺癌

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

近年の分子生物学の進歩により、がん細胞の悪性形質獲得に関連のある複数の遺伝子が同定されるようになった。非小細胞肺癌於いては、ALK、ROS1、BRAF や RET 等の希少ドライバー遺伝子、乳癌/胃癌に於いては HER2 に対する薬剤開発が進んでいる。「１遺伝子変異１診断薬」の原則では、ドライバー遺伝子数の増加に伴い解析に必要な腫瘍量及び測定時間が増加する為、生検等の微小腫瘍組織からも複数遺伝子を同時に測定可能なマルチ遺伝子診断薬の臨床導入が求められている。近畿大学では、次世代シーケンサー（NGS）を用いたクリニカルシーケンスを 2013 年から開始し、希少がん遺伝子変異の同定及び遺伝子変異に基づく分子標的薬の導入に成功している。一方、NGS 解析により機能未知の遺伝子変異が複数同定され、薬剤感受性についての機能解析が喫緊の課題である。

２．研究の目的

クリニカルシーケンスにより薬剤感受性に関与する Actionable 遺伝子変異が複数同定され、適合する分子標的薬の導入が生存延長に寄与することが示唆された。ゲノム変異に意義づけを行うための知識データベースである COSMIC, OncoKB, ClinVar などを基に遺伝子変異の意味付けを試みるも、STK1, MET, SMAD4, ERBB4, FBXW7, AKT1, DDR2 等機能未知遺伝子変異も複数同定された。遺伝子変異に伴う立体構造変化を計算機上でシミュレーションすることは可能であるが、分子標的薬の感受性に寄与するかは予測困難な場合も多い。我々は、今後の臨床応用を考慮し、既承認薬ダサチニブの標的タンパクである DDR2 に着目し、クリニカルシーケンスで新規に同定された機能未知 DDR2 W251R, L604P 変異の機能解析を実施した。HEK293 細胞株にこれらの遺伝子変異を導入するも細胞増殖促進は認められず、DDR2 阻害剤であるダサチニブに抗腫瘍効果を示さない為、既知の Hotspot 変異と異なり、Non-Actionable 遺伝子変異と考えられた(Takeda M, et al. Annals of oncology,26: 2477-82,2015)。

クリニカルシーケンスに於いて、知識データベース上に記載の無い遺伝子変異(variant of uncertain significance: VUS)が散見され、それらの遺伝子変異の生物学的意義は不明である。機能未知遺伝子変異に着目し、その変異が分子標的薬の標的となりうる Actionable な変異であるか、薬剤耐性に関わる変化かどうかを証明することは新たな治療開発に繋がる。本研究は、分子標的薬の感受性の違いが共発現する遺伝子異常によるとの仮説のもと、診断時腫瘍の遺伝子解析を実施し、ドライバー遺伝子異常以外の新たな分子異常を同定することで、分子標的薬の治療効果を改善させうる治療標的かどうか基礎的検討を行い、新たな治療ストラテジーを構築することを目的とする。

３．研究の方法

がん遺伝子スクリーニングシステムでは、FFPE からのマルチプレックス解析の実施
成功率は 95%と良好な結果を得ており、院内機器測定の為、サンプルの運搬時間を短縮でき、解析結果まで 2～4 週間で実施している。2013 年 7 月から開始し、現在まで 800 例の解析実績があり、遺伝子変異情報・治療効果・予後等含めたデータベースを構築している。本研究では、データーベースより機能未知遺伝子変異の形質転換能や薬剤感受性について検討する。
知識データーベースを用いた薬剤感受性に寄与する遺伝子変異の有無の検討非同義遺伝子変異は、以下の手法を用いてフィルタリングを実施する。HapMap (dbSNP)の日本人アレル頻度情報

と 1000 人ゲノムプロジェクトの東アジア人アレル頻度情報や Exome Aggregation Consortium（ExAC)データベースを利用することで、somatic mutation か SNP の判別が可能である。Somatic mutation である場合、CIVIC，OnkoKB，COSMIC 等の知識データーベースを用いて薬剤感受性に寄与する既知の遺伝子変異か否かを検討する。

４．研究成果

上皮成長因子受容体遺伝子（EGFR）の T790M 二次変異は、第一世代または第二世代の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に対する獲得耐性の最も一般的な機序であり EGFR-TKI 治療前の EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌（NSCLC）における遺伝子変異プロファイルと EGFR-TKI 治療後の T790M 状態との関連性を検討した。治療前の腫瘍組織が利用可能な EGFR 変異陽性 NSCLC 患者計 57 名を評価し、EGFR-TKI 治療前に得られた腫瘍組織の遺伝子変異プロファイルは、包括的ながん遺伝子パネル（409 遺伝子）を用いた次世代シーケンサーで評価した。PolyPhen-2 ソフトウェアを用いて、潜在的に有害な非同義変異の数を予測した。T790M を介した耐性と T790M 非依存性耐性を発症した患者の間で、EGFR-TKI 治療中の無増悪生存期間に有意な差は認められなかったが、治療前の腫瘍組織における機能構造変化を伴う非同義変異の予測数は、T790M を介した耐性を獲得した患者では、T790M 非依存性耐性を獲得した患者よりも有意に低かった（P=0.049)。これらの結果より、EGFR-TKI 投与前の腫瘍組織における変異の共存は、EGFR 変異型 NKI の患者における T790M 依存性または T790M 非依存性 TKI 耐性の発現に関与する細胞クローンの出現に寄与している可能性が示唆された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　2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 Takeda M, Takahama T, Sakai K, Shimizu S, Watanabe S, Kawakami H, Tanaka K, Sato C, Hayashi H, Nonagase Y, Yonesaka K, Takegawa N, Okuno T, Yoshida T, Fumita S, Suzuki S, Haratani K, Saigoh K, Ito A, Mitsudomi T, Handa H, Fukuoka K, Nakagawa K, Nishio K.	４．巻 26(4)
２．論文標題 Clinical Application of the FoundationOne CDx Assay to Therapeutic Decision-Making for Patients with Advanced Solid Tumors	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Oncologist	６．最初と最後の頁 e588-e596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/onco.13639.	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 －

１．著者名 Takeda M, Sakai K, Hayashi H, Tanaka K, Haratani K, Takahama T, Kato R, Yonesaka K, Nishio K, Nakagawa K.	４．巻 139
２．論文標題 Impact of coexisting gene mutations in EGFR-mutated non-small cell lung cancer before treatment on EGFR T790M mutation status after EGFR-TKIs.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Lung Cancer	６．最初と最後の頁 28,34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2019.10.028.	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 Isomoto Kohsuke、Haratani Koji、Watanabe Satomi、Takeda Masayuki、Iwasa Tsutomu、Nakagawa Kazuhiko	４．巻 40
２．論文標題 Successful treatment of a case of hormone receptor?positive metastatic extramammary Paget disease with tamoxifen	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Investigational New Drugs	６．最初と最後の頁 194～197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10637-021-01168-5	査読の有無 無
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 Otani Tomoyuki、Kanemura Hiroaki、Kimura Masatomo、Mitani Seiichiro、Takeda Masayuki、Matsuki Mitsuru、Matsumura Noriomi、Satou Takao、Nakagawa Kazuhiko、Ito Akihiko	４．巻 JAN, 5
２．論文標題 Yolk Sac Tumor in a Recurrence of Colonic Adenocarcinoma With Shared Mutations in <i>APC</i> and <i>TP53</i> Genes: A Case Report	５．発行年 2022年
３．雑誌名 International Journal of Surgical Pathology	６．最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/10668969211069963	査読の有無 無
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 Yoshii Yumi、Okazaki Shunsuke、Takeda Masayuki	4．巻 11
2．論文標題 Current Status of Next-Generation Sequencing-Based Cancer Genome Profiling Tests in Japan and Prospects for Liquid Biopsy	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Life	6．最初と最後の頁 796～796
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life11080796	査読の有無 無
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 －

〔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 Takeda Masayuki, Takahama Takayuki, Sakai Kazuko, Shimizu Shigeki, Watanabe Satomi, Kawakami Hisato, Tanaka Kaoru, Fukuoka Kazuya, Nakagawa Kazuhiko, Nishio Kazuto
2．発表標題 Clinical Application of the FoundationOne Assay to Therapeutic Decision-Making for Patients with Advanced Solid Tumors
3．学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4．発表年 2021年

1．発表者名 武田真幸,坂井和子,林秀敏,田中薫,原谷浩司,高濱隆幸,加藤了資,米阪仁雄,西尾和人,中川和彦
2．発表標題 Impact of Co-Mutations in EGFR-Mutated NSCLC Before EGFR-TKIs on T790M Mutation Status After TKIs
3．学会等名 日本肺癌学会
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
研究分担者	西尾　和人 (Nishio Kazuto) (10208134)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	

６．研究組織（つづき）

	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
研究分担者	坂井　和子 (Sakai Kazuko) (20580559)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	

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