

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09296

研究課題名（和文）肺癌EGFR compound mutationにおけるアレル特異性と薬剤感受性

研究課題名（英文）Allele specificity and drug sensitivity of EGFR compound mutations in lung cancer.

研究代表者

横井 左奈（Sana, Yokoi）

千葉県がんセンター（研究所）・遺伝子診断部・部長

研究者番号：30372452

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、肺腺がんにもランダムなEGFR複合変異を有する症例を見出した。この複合変異は、体細胞由来の活性化型のEGFRコモン・バリエーションと生殖細胞系列由来のアンコモン・バリエーションの組み合わせであった。この複合変異を有する肺がん症例は、EGFR活性化型変異を有するにもかかわらず、チロシンキナーゼ阻害薬の感受性は低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR遺伝子変異には、一定の頻度で生殖細胞系列由来のものがあり、肺がん易罹患性やチロシンキナーゼ阻害薬の感受性に影響すると考えられた。しかしそれらの変異は、保険償還されたPCR検査では検出できないため、見逃されている。この研究は、肺がんハイリスク者の同定と精密な検診による早期発見や治療薬選択にとって重要な意義がある。

研究成果の概要（英文）：We found lung adenocarcinoma cases with non-random EGFR compound mutation. The compound mutation was a combination of an activating EGFR common variant of somatic origin and an uncommon variant of germline origin. Lung cancer cases with this compound mutation were less sensitive to tyrosine kinase inhibitors, despite having an EGFR activating mutation.

研究分野：肺がん、分子遺伝学

キーワード：肺がん EGFR

## 1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌では、一塩基置換、小さな挿入や欠失、コピー数異常、染色体転座など、さまざまなゲノム異常が報告されている。2000年初頭から、非小細胞肺癌の治療法は悪性細胞の特定の分子経路を標的とする薬剤によって開発されてきた。一部の進行した非小細胞肺癌において、チロシンキナーゼ、特に上皮成長因子受容体(EGFR)の活性化が同定されたことにより、分子標的薬の開発につながった。EGFRの変異の約90%はエクソン19の欠失とエクソン21のL858R変異であり、「コモン・バリエーション」と呼ばれている。これらのコモン・バリエーションは、EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)に対する感受性と関連することが示されている。EGFR-TKIが世界に先駆けて日本で最初に承認されたのは、日本人集団におけるEGFRコモン・バリエーションの頻度が高かったためである。

その他にも、E709、G719X、S768I、P848L、L861Q、エクソン20の挿入など、エクソン18-21にわたる変異が報告されており、これらは「アンコモン・バリエーション」と呼ばれている。EGFRの変異は多彩であり、上記にはないアンコモン・バリエーションも存在すると思われる。また、コモン・バリエーションとアンコモン・バリエーションが併存する複合変異が一部の症例で報告され最近注目されているが、その意義は明らかにされていない点も多い。

EGFR変異のほとんどは、体細胞変異として腫瘍組織で起こることが知られている。これらの変異はアジア人に多い。生殖細胞系列のEGFR変異は極めてまれであるが、肺癌を発症しやすい複数の生殖細胞系列のEGFR変異が報告されている。中でもT790Mは最も頻繁に報告されており、そのほとんどが白人である。生殖細胞系列のT790Mは欧米諸国では非小細胞肺癌患者の0.34%を占めるが、中国では0.0078%にすぎない。

## 2. 研究の目的

本研究では、1,389人の患者から得られた1,503の腫瘍の臨床データとEGFRのシーケンスデータから、EGFRの複合変異を有する肺癌症例における変異のアレル特異性およびTKIの治療効果を解析した。

## 3. 研究の方法

### 対象

2007年4月から2017年8月までに千葉県がんセンターで診断された非小細胞肺癌患者を対象とした。肺癌の病期分類は、画像検査によるTNM分類と生検による病理組織学的診断により行った。診断日、年齢、性別、喫煙状況、病理組織所見などの患者の臨床データを収集した。喫煙状況は、現在および過去の喫煙歴を含む喫煙者と、喫煙経験のない非喫煙者の2つに分類した。肺癌組織の定義は、WHO分類第5版に基づいて行った。

本研究は千葉県がんセンターの倫理審査委員会の承認を得た。

### TKIの有効性の評価

一部の症例はTKI治療を受けた。TKIとしてゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ、オシメルチニブが各症例の状態に応じて使用された。最良総合効果は、RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)ガイドライン(バージョン1.1)に従って、完全奏効(CR)、部分奏効(PR)、病勢安定(SD)、病勢進行(PD)に分類した。

### EGFRシーケンス解析

腫瘍検体は、外科的切除または生検(気管支鏡下生検、胸腔穿刺、腰椎穿刺)のいずれかにより採取した。各腫瘍検体からAllPrep DNA/RNA/miRNA Universal kit(QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出した。生殖細胞系列の解析には、血液検体からゲノムDNAを精製するためにMaxwell RSC Blood DNA KitおよびMaxwell RSC instrument(Promega)を用いた。

EGFRのエクソン18-21は、標準的なPCRプロトコールによって別々に増幅した。PCR産物を精製し、サンガー法またはNGS法による塩基配列解析に供した。サンガー法では、PCR産物をAgencourt CleanSEQ magnetic beads(BECKMAN COULTER)で精製し、電気泳動後、3500xL Dx Genetic Analyzerまたは3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystems)で蛍光を検出した。順方向と逆方向の両方向から配列を読み、結果はVariant Reporter Software(Applied Biosystems)で可視化した。次世代シーケンス解析(NGS)法では、Illumina DNA prep kit(Illumina)を用いて、メーカーの指示に従い、若干の修正を加えながらライブラリーを調製し、MiSeqプラットフォーム(Illumina)を用いてペアエンドシーケンスを行った。リードマッピングとバリエーションコールは院内のワークフローを用いて行った。

## 4. 研究成果

### 対象症例の特徴

本研究では、1,389人の患者から得られた合計1,503の非小細胞肺癌検体が解析された。患

者の内訳は、男性 906 例、女性 483 例、喫煙者 979 例、非喫煙者 410 例であった。女性患者は喫煙者 148 人、非喫煙者 335 人、男性患者は喫煙者 831 人、非喫煙者 75 人であった。

#### EGFR 変異の頻度

EGFR 変異は全検体の 32% に認められ、女性、非喫煙者、腺癌に強い偏りがあった。これまでの報告と一致して、EGFR 変異の大部分はエクソン 19 と 21 に同定された(それぞれ 37% と 48%)。

エクソン 21 のコモン・バリエーションの大部分は L858R であった。検出されたアンコモン・バリエーションの 1 つは、保険償還された PCR 検査では検出されないものであったが、8 人の患者由来の 10 個の腫瘍という予想外に高い頻度で観察した。このうち、複数の肺がんを発症した症例において、このアンコモン・バリエーションは共通して検出されたため、我々はこのバリエーションが生殖細胞系列由来であることを疑った。

#### EGFR アンコモン・バリエーションの由来の確認

本研究で最も高頻度に観察されたアンコモン・バリエーションが、生殖細胞由来か体細胞由来かを調べるため、患者の血液検体から増幅した EGFR 遺伝子の塩基配列を決定した。驚いたことに、検査した全患者(8 人中 7 人)において、このアンコモン・バリエーションはヘテロ接合体として生殖細胞系列に同定された。この結果は、全患者 1,389 人のうち少なくとも 7 人がヘテロ接合体のこのアンコモン・バリエーションを有していることを示している。これは対立遺伝子頻度 0.25% に相当し、日本人の一般集団におけるアレル頻度と比較して有意に高かった。このことは、非小細胞肺癌患者においてこのアンコモン・バリエーションが濃縮していることを示唆し、このアンコモン・バリエーションが遺伝性肺がんの原因である可能性があるという考えを支持するものである。

#### EGFR 複合変異のアレル特異性

我々はこのアンコモン・バリエーションを有する 10 個の腫瘍の特徴を調べた。10 個の腫瘍はすべて EGFR コモン・バリエーションと併存しており、8 個は L858R、残りはエクソン 19 の欠失であった。この研究における EGFR 変異腫瘍の割合は 32% であったが、このアンコモン・バリエーション保因者が肺がん組織にコモン・バリエーションを併存する割合は 100% であった。これらの二次的に生じた体細胞性の EGFR コモン・バリエーションがどの対立遺伝子に生じたかを決定するために、PCR 産物をプラスミドベクターにクローニングし、いくつかのクローンの塩基配列を決定した。エクソン 19 の欠失については、cDNA を PCR の鋳型として用いた。結果は、L858R を保有するクローンはすべて同一アレル上にこのアンコモン・バリエーションを有しており、これら 2 つの変異が同じ対立遺伝子(シス位)に生じたことを示している。1 例を除く全員がこのアンコモン・バリエーションのシス位に二次性の体細胞性のコモン・バリエーションを持っていることがわかった。

#### このアンコモン・バリエーションを有する症例の TKI 感受性

このアンコモン・バリエーション保因者は非保因者に比べて若年で非小細胞肺癌を発症した(平均 60.2 vs 67.6、中央値 62 vs 69、 $p = 0.019$ )。大腸がんを含む複数のがんを発症した患者もいた。ほとんどの患者が切除可能な腫瘍であったため、TKI による治療を受けた患者は多くなかった。TKI の最良総合効果は、体細胞性の EGFR コモン・バリエーションがこのアンコモン・バリエーションとトランス位に生じた症例では CR であったが、シス位に生じた症例では PD であった。

#### 【結論】

本研究では、EGFR の生殖細胞系列に特定のアンコモン・バリエーションを有する症例が非小細胞肺癌患者に高度に集積していることを見出した。このことは、このアンコモン・バリエーションが遺伝性肺がんを引き起こすという考えを強く支持するものである。また、このアンコモン・バリエーションを保有する肺がんの多くは、シス位に EGFR 遺伝子の二次的な体細胞コモン・バリエーションを有していた。さらに、我々の結果は、このアンコモン・バリエーションがシス位に生じた二次的な EGFR コモン・バリエーションに対する TKI の感受性に影響することを示唆している。

今回の研究から EGFR 遺伝子変異には、一定の頻度で生殖細胞系列由来のものがあり、肺がん易罹患性やチロシンキナーゼ阻害薬の感受性に影響する可能性があることが明らかになった。このアンコモン・バリエーションは、保険償還された PCR 検査では検出できないため、見逃されていると思われる。この研究は、肺がんハイリスク者の同定と精密な検診による早期発見や治療薬選択にとって重要な意義があると考えられる。

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 0件）

1. 著者名 横井左奈, 松井由紀子, 兼松宗太郎, 岩田剛和, 飯笹俊彦	4. 巻 40
2. 論文標題 肺癌におけるEGFRエクソン21に見出されたレアバリエント	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本遺伝カウンセリング学会誌	6. 最初と最後の頁 122-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔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 横井左奈, 松井由紀子, 兼松宗太郎, 岩田剛和, 飯笹俊彦
2. 発表標題 肺癌におけるEGFRエクソン21に見出されたレアバリエント
3. 学会等名 第26回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井左奈, 松井由紀子, 兼松宗太郎, 岩田剛和, 飯笹俊彦
2. 発表標題 肺癌におけるEGFRエクソン21に見出された複合変異
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
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	飯笹 俊彦  (Iizasa Toshihiko)  (10272303)	千葉県がんセンター(研究所)・その他部局等・病院長    (82504)	

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	岩田 剛和  (Iwata Takekazu)  (30586681)	千葉県がんセンター（研究所）・呼吸器外科・部長     (82504)	

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