

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15581

研究課題名（和文）薬剤耐性としての遺伝子増幅の機序解明と臨床応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of gene amplification as drug resistance and its clinical application.

研究代表者

小林 祥久（Kobayashi, Yoshihisa）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30734628

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：EGFR遺伝子変異腺がんにはEGFR阻害剤が著効するが、一度効いても必ず耐性を獲得してしまう。本研究ではCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を薬剤耐性研究に応用した。ゲノム編集で様々な融合遺伝子モデルを作成し薬剤耐性機序として機能することを確認した。融合遺伝子による耐性を克服する治療薬を見出し、さらにその治療法に対してがんが様々な遺伝子増幅を獲得することを見つけた（Kobayashi et al. Nature Communications 2022）。これらは今後融合遺伝子・遺伝子増幅に関する研究を継続する上での有用なモデル・基盤データとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんは最も死亡者数の多いがん種で、日本だけで年間7万人以上にのぼる。EGFR遺伝子変異は日本人肺腺がんの半数にみられ、このタイプにはEGFR阻害剤が標準治療となっているが、次第に耐性を獲得することが問題である。本研究成果は、融合遺伝子によって薬剤耐性となった患者に有効な新たな治療戦略の開発に有用である。また、融合遺伝子・遺伝子増幅に関する今後の生物学的な研究への貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：EGFR mutant lung adenocarcinomas respond to EGFR inhibitors, but eventually develop resistance. In this study, we applied CRISPR-Cas9 genome editing technology to investigate drug resistance. We created various fusion gene models through genome editing and confirmed their function as mechanisms of drug resistance. We identified therapeutic agents to overcome resistance caused by fusion genes and further discovered that cancer acquires various gene amplifications against this treatment (Kobayashi et al., Nature Communications 2022). These findings provide valuable models and foundational data for ongoing research on fusion and gene amplifications.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：EGFR 薬剤耐性 融合遺伝子

1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子の活性型変異は、日本人を含むアジア人の半数および欧米人の約 20%で見られる。進行期および術後再発の EGFR 変異肺癌には EGFR チロシンキナーゼ阻害剤オシメルチニブが標準治療となっている。しかし、一度効いても約 1~2 年で薬剤耐性を獲得してしまうことが問題である。

薬剤耐性のメカニズムとして、①EGFR 遺伝子の二次変異によって薬剤が結合できなくなるもの、②他の発がん遺伝子の変異・遺伝子増幅・融合遺伝子からの発がんシグナル、③腺がんから他の病理組織型への転換などが報告されているが、これらの機序に対する克服法はまだ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は、薬剤耐性機序としての「②他の発がん遺伝子の変異・遺伝子増幅・融合遺伝子からの発がんシグナル」のうち、特に融合遺伝子と遺伝子増幅に注目する。ゲノム編集によって作成した遺伝子増幅モデルに加えて、融合遺伝子モデルを作成することで融合遺伝子を治療標的とした新たな治療法の開発を目指す。

具体的には、臨床検体の解析から得られた融合遺伝子候補の中で薬剤耐性を引き起こす可能性のあるものを特定し、その機能と薬剤耐性メカニズムを細胞実験とあわせて包括的に解析する。さらに、融合遺伝子を獲得したがん細胞において、元々の EGFR 変異シグナルと融合遺伝子からの発がんシグナルの相互作用及び併用療法に対するさらなる薬剤耐性機序を解析する。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体から抽出した DNA・RNA の解析

504 人の EGFR 遺伝子変異を持つ肺癌患者の DNA 検体を次世代シーケンサーで解析したところ、104 種類の融合遺伝子候補が検出された。この中から薬剤耐性の原因となる可能性のある融合遺伝子を特定するために、治療効果に関する臨床情報を収集した。さらに、RNA 検体を RNA シークエンスすることで融合遺伝子のバリデーションを行った。

(2) CRISPR ゲノム編集細胞モデルの構築

候補となる融合遺伝子が薬剤耐性として機能するかどうかを評価するために、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、EGFR 変異肺癌細胞株から融合遺伝子モデルを作成した。この細胞モデルを用いて、融合遺伝子を克服するために有効な薬剤のスクリーニング及びその併用療法に対するさらなる薬剤耐性機序を評価した。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性の原因となる融合遺伝子の特定

104 種類の融合遺伝子候補の中で治療標的になりやすいという観点から発がん遺伝子を含む融合遺伝子 37 個についてさらに解析を進めた。①実際の患者治療経過、②新規発がん融合遺伝子の発見に成功した実績のある RNA シークエンス、③CRISPR-Cas9 ゲノム編集細胞モデルを使った実験データの 3 つのアプローチを統合することで各融合遺伝子の役割を調べたところ、薬剤耐性としての機能をもつ融合遺伝子は一部でしかないことが判明した。

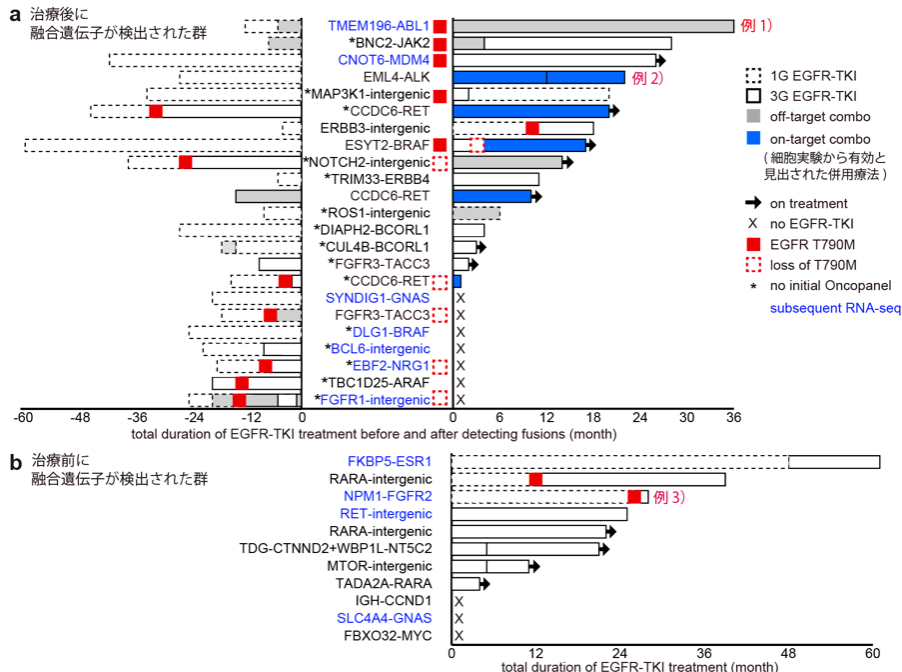


図 1 発がん遺伝子を含む融合遺伝子が検出された患者の治療経過

(2) 融合遺伝子の克服に有効な併用療法とさらなる耐性機序の克服法

EGFR 遺伝子変異のある肺癌患者が薬剤耐性として融合遺伝子を獲得した状況を模して、CRISPR ゲノム編集技術を応用することで EGFR 遺伝子変異のある肺癌細胞株から ESYT2-BRAF などの融合遺伝子を作成した。これらのモデルは確かに EGFR 阻害剤に耐性となることを確認し、薬剤スクリーニングによってそれぞれの融合遺伝子に効く薬を同定した。

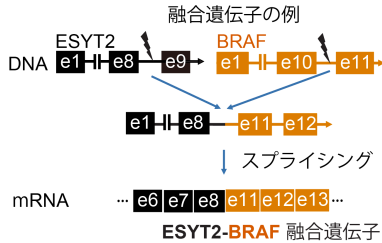


図 2 CRISPR ゲノム編集による ESYT2-BRAF 融合遺伝子の作成

さらに、がんはあらゆる治療に対してさらなる薬剤耐性を獲得してしまうため、融合遺伝子に効く薬剤と EGFR 阻害剤の併用療法で長期間細胞モデルを培養することで薬剤耐性株を樹立し、その耐性機序を解析した。

興味深いことに、がんは

- ① 融合遺伝子側の耐性機序 (Fusion Side)
- ② EGFR 遺伝子側の耐性機序 (EGFR side)
- ③ 共通のシグナル経路の耐性機序 (Down stream)
- ④ 新規耐性機序 (Other)

など様々な原因で耐性となることがわかった。このことから、元々の EGFR 変異からの発がんシグナルと融合遺伝子からの発がんシグナルが複雑に相互作用していることが推測される。さらなる細胞実験により、これらの様々な耐性機序を克服するために有効な薬剤もそれぞれ同定した。例えば、併用療法に対する耐性機序として ESYT2-BRAF 融合遺伝子の遺伝子増幅が起こった際は、もはや EGFR 阻害剤を必要とせず、新規 BRAF 阻害剤と MEK 阻害剤の併用が有効であることを見出した。また、ESYT2-BRAF 以外にも様々な遺伝子増幅が耐性機序として出現した (1)。

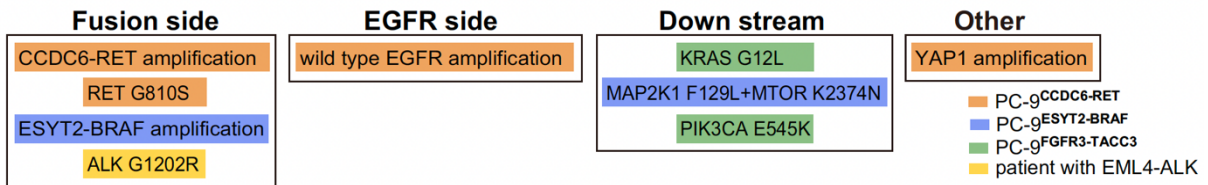


図 3 融合遺伝子に効く薬剤と EGFR 阻害剤の併用療法に対するさらなる薬剤耐性機序

<引用文献>

1. Kobayashi Y, Oxnard GR, Cohen EF, Mahadevan NR, Alessi JV, Hung YP, Bertram AA, Heppner DE, Ribeiro MF, Sacardo KP, Saddi R, de Macedo MP, Blasco RB, Li J, Kurppa KJ, Nguyen T, Voligny E, Ananda G, Chiarle R, Katz A, Tolstorukov MY, Sholl LM, Jänne PA. Genomic and biological study of fusion genes as resistance mechanisms to EGFR inhibitors. Nature Communications 2022;13(1):5614.

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Y, Oxnard GR, Cohen EF, Mahadevan NR, Alessi JV, Hung YP, Bertram AA, Heppner DE, Ribeiro MF, Sacardo KP, Saddi R, de Macedo MP, Blasco RB, Li J, Kurppa KJ, Nguyen T, Voligny E, Ananda G, Chiarle R, Katz A, Tolstorukov MY, Sholl LM, Janne PA.	4. 巻 13
2. 論文標題 Genomic and biological study of fusion genes as resistance mechanisms to EGFR inhibitors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-33210-2.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 祥久
2. 発表標題 Application of CRISPR-Cas9 to the study of resistant mechanisms to EGFR inhibitors
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihisa Kobayashi
2. 発表標題 Novel treatment approach for targeting RAS Q61 mutant cancers.
3. 学会等名 The 40th Sapporo International Cancer Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihisa Kobayashi
2. 発表標題 Novel RAS Q61 therapy targeting the splicing vulnerability.
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------