

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462181

研究課題名(和文) 上皮成長因子受容体変異陽性肺癌を対象としたTKI耐性機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism for EGFR-TKI resistance in lung cancer patients with mutation of epidermal growth factor receptor

研究代表者

杉尾 賢二 (Sugio, Kenji)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70235927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：5名のEGFR-TKI 耐性腫瘍の解析を行い、EGFR T790Mを2例、小細胞癌への転化を1例認めた。神経内分泌のマーカー(NCAM, Synaptophysin)の発現はTKI治療前の癌組織にごく少量認めた。TKI治療前後の癌組織のNGS解析にて、コピー数増加、コピー数低下を認めた。粘液産生性肺腺癌のNGS解析にて、K-RASとLKB1変異を検出した。コピー数多型(CNV)解析にて、FGFR3、NOTCH1、AKT1、LKB1の4遺伝子が、各々1 copyに減少していた。以上から、薬剤の耐性機序には、癌の多様性(heterogeneity)が、大きく関与していると推察された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is establishment of biomarker based medicine. We analyzed five samples of EGFR-TKI resistant materials, and detected EGFR T790M in two samples and SCLC transformation in one sample. In SCLC transformation cases, the expression of neuroendocrine marker such as NCAM and synaptophysin, was detected in small part of cancer tissue pre-treated by gefitinib, immunohistochemically. These data suggests that resistant mechanism for EGFR-TKI exist in early stage of lung cancer. NGS analysis showed gain of gene copy in 5q, 9p, 14q(AKT1), 17q(ERBB2), 19p, and loss of gene copy in 8q. In mucinous adenocarcinoma of the lung, next generation sequencing analysis showed mutation of LKB1(STK11) and K-RAS. The analysis for copy number variation (CNV) showed copy loss in FGFR3, NOTCH1, AKT1, and LKB1. In conclusion, cancer heterogeneity such as mutation burden is suggested to be associated with resistant mechanism for molecular targeted therapy.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 EGFR EGFR-TKI 分子標的 耐性 バイオマーカー STK11 癌の多様性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性型遺伝子変異症例には、そのチロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) が奏効するが、通常 1 年程度で獲得耐性がみられ、早急に克服すべき課題である。現在までに確認された獲得耐性因子としては、EGFR の T790M 二次的遺伝子変異、MET 遺伝子増幅、肝細胞増殖因子 (HGF) の過剰発現などがあるが、耐性症例全てに認められる異常ではなく、また耐性の程度、時期も異なる。また、2007 年に発見された EML4-ALK 融合遺伝子に対する TKI 治療でも耐性機序に、C1156Y や L1196M などの獲得耐性変異も報告されている。したがって、耐性機序の解明にはさらなる研究が必要であるとともに、耐性の克服に対して新しい薬剤の開発が重要な課題である。

(2) 分子標的薬治療で病状進行 (PD) となった後も、当該薬剤の投与を継続するいわゆる “Beyond PD” の治療法は注目され、研究代表者は、当時 EGFR-TKI 耐性に関連した 2 つの臨床試験 (九州肺癌研究機構: LOGIK) を推進中であった。この試験においては、TKI 治療前、画像的 PD (耐性) 時、ほぼ完全に耐性細胞のみの時点の 3 点で生体試料の収集が可能である。このような耐性過程での試料収集はこれまでになく、貴重な資料となる。また、実地臨床での EGFR-TKI 治療前後の生体試料も包括同意の上で収集され、当研究施設に保存されている。これらの試料から得られる遺伝子情報を解析し、TKI 耐性への詳細な機序を解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

臨床試験や実臨床から得られる生体試料の遺伝子情報を解析し、TKI 耐性への詳細な機序を解明することを目的とする。これらのゲノム情報により、既知のバイオマーカーの変化の推移、新たなバイオマーカーの探索を行い、基礎研究に還元し、ファーマコゲノミクスに基づき、分子標的薬の効果予測、耐性への対応をより正確に行い、バイオマーカーを指標にした Biomarker Based Medicine を確立し、より安全で適切・確実な薬物療法を含めた肺癌の集学的治療を構築することが大きな目標である。

## 3. 研究の方法

(1) 臨床試験および実地臨床で得られた、EGFR-TKI 治療前、EGFR-TKI 治療後に再燃が確認された時点 (耐性) で生検されたの生体試料を対象とする。EGFR-TKI 治療の自然耐性と獲得耐性の各々に対して、同一症例から経時的に得られた検体を用いて、次世代シーケンサーを用いたゲノミクス解析およびデータ解析を施行する。この比較解析によって、EGFR-TKI に対する耐性を規定する既知の因子や新たな耐性候補遺伝子の同定を試みる。

(2) EGFR-TKI 感受性と耐性機序の解析のため、当初予定していた九州肺癌研究機構 (LOGIK) で企画し進めていた “Beyond PD” 臨床試験については、同様の内容で行われていた国際的な臨床試験 (IMPRESS 試験) の結果、分子標的薬 (EGFR-TKI) に抗がん剤を上乗せする方法は、その効果が期待できないことが報告された。したがって、LOGIK で行われていた臨床試験は途中中止となり、そのため、その臨床試験の登録症例から生体試料を得るバイオマーカー付随研究そのものが困難となった。これらの理由で、当初予定していた EGFR-TKI 耐性の解析は実臨床から得られる生体試料を用いて行うこととなった。

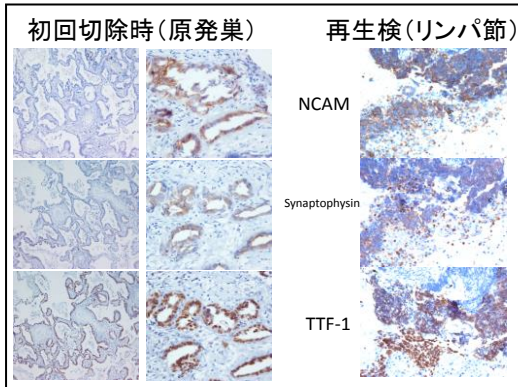
(3) 粘液産生性肺腺癌の発生に関与する遺伝子解析: 2010 年から 2014 年に外科切除された粘液産生性肺癌 15 例を対象とし、K-Ras の遺伝子変異 (Scorpion ARMS 法)、LKB1 の遺伝子変異 (direct sequencing) を解析した。このうち、説明同意が取得され、解析可能な症例においては、次世代シーケンサー (ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 を用いた target sequence) にて解析を行った。さらに、癌抑制遺伝子である LKB1 の広汎な deletion や、homozygous deletion を検出するため、MLPA 法を用いたコピー数解析を施行した。LKB1 の癌部における不活性化を解析するため、免疫組織化学的に LKB1 の蛋白発現について検討した。

## 4. 研究成果

(1) 実臨床において、EGFR 変異陽性患者に対して EGFR-TKI (gefitinib) が投与され、奏効した後に耐性となった 5 名の患者の再燃腫瘍の再生検 (re-biopsy) を行い、生体試料を得た。耐性前の TKI 感受性変異は、エクソン 19 欠失が 3 例、エクソン 21 L858R が 2 例であった。耐性後の試料における獲得耐性の機序は、EGFR エクソン 20 の T790M が 2 例、EGFR の獲得変異がなかった症例が 3 例あり、そのうち小細胞癌への転化が 1 例であった。

(2) 小細胞癌への転化症例の解析: 79 歳女性の IV 期肺腺癌に対し EGFR-TKI (gefitinib) 投与し 18 ヶ月で耐性となった症例。耐性となった気管分岐部下リンパ節から得られた生検試料の病理学的解析で、小細胞癌転化が認められた。免疫組織化学的に神経内分泌のマーカー (NCAM, Synaptophysin) を検索した結果、TKI 治療前の癌組織において、ごく少量の神経内分泌産生細胞を有していることを見出した (図 1)。すなわち耐性となる素因が早い時期から存在しており、このような原発癌の heterogeneity が、癌治療の耐性機序に関与していることを示した。

(図1 免疫組織化学解析)

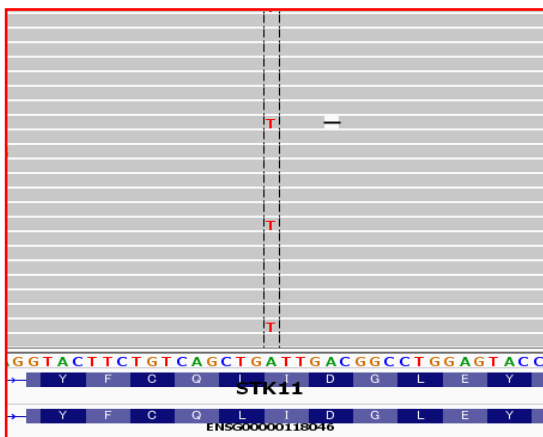


さらに、TKI 治療前と耐性後の癌組織を次世代シーケンサー (ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 を用いた target sequence) にて解析した結果、TP53 の変異率の増加を認め、コピー数の増加を 5q22.2-35.1, 9p24.1-p21.3, 14q32.33 (AKT1), 17q12 (ERBB2), 19p13.3-p13.11 に、コピー数の低下を 8q11.23 に認めた。

(3) 粘液産生性肺腺癌の発生に関与する遺伝子解析：

K-Ras G12D 変異が認められた症例について、次世代シーケンサーによる解析を行った結果、K-Ras 変異 (19.4%) に加え、LKB1 変異 (I161F, 14.6%) が検出された (図2)。その他の 48 のがん関連遺伝子に有意な変異は検出されなかった。正常組織を対照としコピー数多型 (CNV) 解析を行ったところ、FGFR3、NOTCH1、AKT1、LKB1 の 4 遺伝子においてコピー数の有意な相違を認め、それぞれ 1 copy に減少していると考えられた。特に、LKB1 を含む 19p13.3-11 では、16MB に及ぶ広範な欠失が推測された (表1)。さらに RB1 の位置する 13q14.2 のコピー数の低下が認められた。これらは、粘液産生性肺腺癌のうち Kras 遺伝子変異陽性例では CDKN2A/2B 遺伝子変異を伴うものが多いという報告に一致する。

(図2)



STK11 c.481A>T (exon 4)

Type	Gene Sym	CytoBand	Length	Copy Number
CNV	FGFR3	4p16.3 (1803551-1809006)	5.455kb	1
CNV	NOTCH1	9q34.3 (139390764-139399447)	8.683kb	1
CNV	AKT1	14q32.33 (105241433-105246583)	5.15kb	1
CNV	STK11 GNA11 JAK3	19p13.3p13.11 (1206977-17954225)	16747.248kb	1

表1 Ion Reporter 4.0 software による正常部-腫瘍部比較 (Copy number variation: CNV 解析)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- 1) Ishikawa K, Sakai T, Saito-Shono T, Miyawaki M, Osoegawa A, Sugio K, Ono A, Mori H, Nishida H, Yokoyama S, Okamoto O, Fujiwara S, Hatano Y. Pemetrexed-induced scleroderma-like conditions in the lower legs of a patient with non-small cell lung carcinoma. :J Dermatol, 2016, in press, 査読有, Doi:10.1111/1346-8138.13354
- 2) Osoegawa A, Kometani T, Fukuyama S, Hirai F, Seto T, Sugio K, Ichinose Y. Prognostic Factors for Survival after Resection of Pulmonary Metastases from Colorectal Carcinoma. :Ann Thorac Cardiovasc Surg, 22(1) 6-11, 2016, 査読有, Doi:10.5761/atcs.oa.14-00345
- 3) Ohba T, Toyokawa G, Kametani T, Nosaki K, Hirai F, Yamaguchi M, Hamatake M, Seto T, Ichinose Y, Sugio K. The mutations of EGFR and K-ras genes in resected stage I lung adenocarcinoma and their clinical significance. :Surg Today, 44(3) 478-486, 2014, 査読有, Doi:10.1007/s00595-013-0589-2
- 4) Ohba T, Toyokawa G, Osoegawa A, Hirai F, Yamaguchi M, Taguchi K, Seto T, Takenoyama M, Ichinose Y, Sugio K. Mutations of the EGFR, K-ras, EM L4-ALK, and BRAF genes in resected pathological stage I lung adenocarcinoma. :Surg Today, 2015, in press, 査読有, <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00595-015-1295-z>
- 5) Morodomi Y, Takenoyama M, Inamasu E, Toyozawa R, Kojo M, Toyokawa G, Sh

iraishi Y, Takenaka T, Hirai F, Yamaguchi M, Taguchi K, Seto T, Sugio K, Ichinose Y. Non-small cell lung cancer patients with EML4-ALK fusion gene are insensitive to cytotoxic chemotherapy. *Anticancer Res*, 34 (7) 3825-3830, 2014, 査読有, <http://ar.iiarjournals.org/content/34/7/3825.long>

[学会発表] (計 27 件)

- 1) 末次 隆行、福田 実、嶋田 緑、北崎 健、橋口 浩二、岸本 淳司、海老 規之、高山 浩一、杉尾 賢二、千場 博、中西 洋一、一瀬 幸人. UGT1A1\*27 遺伝子多型のイリノテカン治療に対する影響を検討する研究 LOGiK-1004-B, 第 56 回日本肺癌学会学術集会, 2015/11/28, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 2) 小副川 敦、内匠 陽平、安部 美幸、橋本 崇史、宮脇 美千代、杉尾 賢二. 肺扁平上皮癌における PD-L1 の発現に関する検討, 第 56 回日本肺癌学会学術集会, 2015/11/27, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 3) 橋本 崇史、安部 美幸、末廣 修治、小副川 敦、宮脇 美千代、杉尾 賢二. EGF R-TKI 耐性肺腺癌に対する Re-biopsy による耐性機序の検討, 第 56 回日本肺癌学会学術集会, 2015/11/27, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 4) 宮脇 美千代、安部 美幸、内匠 陽平、橋本 崇史、末廣 修治、小副川 敦、杉尾 賢二. EGFR minor mutation 陽性肺扁平上皮癌に対するゲフィチニブの治療経験, 第 56 回日本肺癌学会学術集会, 2015/11/27, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 5) 杉尾 賢二、多田 弘人. EGFR-TKI による非小細胞肺癌の術後補助療法, 第 56 回日本肺癌学会学術集会, 2015/11/26, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 6) Fukuda M, Suetsugu S, Shimada M, Kitazaki T, Hashiguchi K, Kishimoto J, Ebi N, Takayama K, Sugio K, Semba H, Nakanishi Y, Ichinose Y. Prospective Study of UGT1A1\*27 Gene Polymorphism for Irinotecan Therapy : Result of Lung Oncology Group in Kyushu (LOGiK1004B), 16<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, 2015/09/08, Colorado Convention Center (Denver, USA)
- 7) Takumi Y, Osoegawa A, Hashimoto T, Abe M, Suehiro S, Miyawaki M, Sugio K. The clinicopathological significance of PD-L1 expression in thymoma., 16<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, 2015/09/07, Colorado Convention Center (Denver, USA)
- 8) 小副川 敦、橋本 崇史、内匠 陽平、安部 美幸、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二. 小細胞癌転化を来した EGFR-TKI 治療後の獲得耐性肺腺癌の一例, 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2015/07/18, ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館(北海道札幌市)
- 9) 福田 実、末次 隆行、嶋田 緑、北崎 健、岸本 淳司、高山 浩一、杉尾 賢二、千場 博、中西 洋一、一瀬 幸人. Prospective study of UGT1A1\*27 polymorphism for irinotecan therapy: result of lung oncology group in Kyushu. (LOGiK1004B), 第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2015/07/17, ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館(北海道札幌市)
- 10) 橋本 崇史、小副川 敦、続木 彩加、安部 美幸、内匠 陽平、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二. EGFR 遺伝子変異陽性、EGFR-TKI 未治療肺腺癌における c-MET の発現の検討, 第 55 回日本肺癌学会九州支部学術集会・第 38 回日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会, 2015/02/28, 電気ビル共創館みらいホール他(福岡県福岡市)
- 11) 橋本 崇史、小副川 敦、安部 美幸、内匠 陽平、末廣 修治、宮脇 美千代、杉尾 賢二. EGFR 遺伝子変異の exon19 deletion と L858R point mutation における臨床病理学的差異の検討, 第 55 回日本肺癌学会学術集会, 2014/11/16, 国立京都国際会館(京都府京都市)
- 12) 宮脇 美千代、安部 美幸、内匠 陽平、橋本 崇史、小副川 敦、杉尾 賢二. いわゆる mucinous BAC の検討 ~特に IASLC/ATS/ETS mucinous AIS, MIA に関して, 第 55 回日本肺癌学会学術集会, 2014/11/14, 国立京都国際会館(京都府京都市)
- 13) 小副川 敦、宮脇 美千代、安部 美幸、内匠 陽平、橋本 崇史、杉尾 賢二. 粘液産生細気管支肺胞上皮癌より検出された新たな STK11 遺伝子変異, 第 55 回日本肺癌学会学術集会, 2014/11/14, 国立京都国際会館(京都府京都市)
- 14) Miyawaki M, Abe M, Takumi Y, Hashimoto T, Suehiro S, Osoegawa A, Sugio K. Indication of selective mediastinal lymph node dissection in clinical N0 patients with non-small cell lung cancer of the lower lobe., 6<sup>th</sup> IASLC Asia Pacific Lung Cancer Conference 2014 (APLCC), 2014/11/06, Shangri-La Hotel (Kuala Lumpur, Malaysia)
- 15) 宮脇 美千代、安部 美幸、内匠 陽平、橋本 崇史、末廣 修治、小副川 敦、杉尾 賢二. cT1-2N0M0 肺癌に対する選択的リンパ節廓清は妥当か?, 第 67 回日

- 本胸部外科学会定期学術集会, 2014/10/03, 福岡国際会議場/福岡サンパレス (福岡県福岡市)
- 16) 小副川 敦、宮脇 美千代、末廣 修治、橋本 崇史、内匠 陽平、安部 美幸、杉尾 賢二. 非小細胞肺癌細胞株、乳癌細胞株におけるラパマイシンとオラパリブの相乗効果に関する研究, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014/09/25, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 17) 小副川 敦、宮脇 美千代、内匠 陽平、橋本 崇史、杉尾 賢二. Lepidic metastasis が疑われた粘液産生性細気管支肺癌上皮癌の遺伝子解析, 第31回 日本呼吸器外科学会総会, 2014/05/30, ホテル日航東京 (東京都港区)
- 18) 橋本 崇史、内匠 陽平、小副川 敦、宮脇 美千代、杉尾 賢二. PET 陰性肺癌、PET 陽性非悪性新生物の検討, 第 31 回 日本呼吸器外科学会総会, 2014/05/29, ホテル日航東京(東京都港区)
- 19) 姫路 大輔、大場 太郎、海老 規之、中垣 憲明、田口 健一、鍋島 一樹、岸本 淳司、杉尾 賢二、千場 博. EGFR 遺伝子変異陽性の非腺癌非小細胞肺癌に対する EGFR-TKI 治療効果の検討:LOGIK1104, 第 54 回 日本呼吸器学会学術講演会, 2014/04/26, 大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル(大阪府大阪市)
- 20) Osoegawa A, Gills JJ, Kawabata K, Sugio K, Phillip D. Rapamycin sensitizes cancer cells to growth inhibition by the PARP inhibitor olaparib., AACR Annual meeting 2014, 2014/04/07, San Diego Convention Center (San Diego, USA)
- 21) 小副川 敦、宮脇 美千代、杉尾 賢二、岡本 龍郎、前原 喜彦、Phillip D. 肺癌及び乳癌細胞株における、ラパマイシンと PARP 阻害剤オラパリブの相乗効果に関する検討, 第 114 回 日本外科学会定期学術集会, 2014/04/03, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)
- 22) 辛島 高志、小副川 敦、安部 美幸、内匠 陽平、橋本 崇史、末廣 修治、杉尾 賢二. 肺腺癌における driver gene mutation (EML4-ALK 逆位、EGFR 変異) の解析, 第 54 回 日本肺癌学会九州支部学術集会・第 37 回 日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会, 2014/03/01, ホルトホール大分 (大分県大分市)
- 23) Osoegawa A, Toyokawa G, Ohba T, Miyawaki M, Yamaguchi M, Taguchi K, Seto T, Takenoyama M, Ichinose Y, Sugio K. Non-small cell lung cancer with double driver mutations., AACR-IASLC Joint Conference on The Molecular Origins of Lung Cancer, 2014/01/08, San Diego Convention Center (San Diego, USA)
- 24) 大場 太郎、海老 規之、中垣 憲明、姫路 大輔、柏原 光介、井上 孝治、綿谷 洋、川崎 雅之、三角 幸広、田口 健一、鍋島 一樹、岸本 淳司、杉尾 賢二、一瀬 幸人. EGFR 変異陽性の非腺癌非小細胞肺癌に対する EGFR-TKI 治療の検討(他施設共同後向き観察研究:LOGOK1104), 第 54 回 日本肺癌学会総会, 2013/11/21, ホテルニューオータニ(東京都千代田区)
- 25) Sugio K, Ohba T, Ebi N, Nakagaki N, Himeji D, Kashiwabara K, Inoue K, Wataya H, Kawasaki M, Misumi Y, Taguchi K, Nabeshima K, Kishimoto J, Ichinose Y. Adenocarcinoma non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations to EGFR-TKI : a retrospective multicenter study (LOGIK1104), 15<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, 2013/10/29, Sydney Convention and Exhibition Centre (Sydney, Australia)
- 26) Sugio K, Miyawaki M, Osoegawa A, Hashimoto T, Takumi Y, Suehiro S. Prognostic impact of visceral pleural invasion in resected tumors of non-small cell lung cancer., 15<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, 2013/10/29, Sydney Convention and Exhibition Centre (Sydney, Australia)
- 27) 海老 規之、大場 太郎、中垣 憲明、姫路 大輔、田口 健一、鍋島 一樹、岸本 淳司、杉尾 賢二、一瀬 幸人. EGFR 遺伝子変異陽性の非腺癌非小細胞肺癌に対する EGFR-TKI 治療効果の検討(他施設共同後向き観察研究) LOGIK1104, 第 11 回 日本臨床腫瘍学会学術集会, 2013/08/29, 仙台国際センター、東北大学百周年記念会館川内萩ホール(宮城県仙台市)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [その他]
- ホームページ等
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
杉尾 賢二 (Sugio Kenji)  
大分大学・医学部呼吸器・乳腺外科学講座・教授  
研究者番号 : 70235927
- (2) 研究分担者  
宮脇 美千代 (Miyawaki Michiyo)

大分大学・医学部呼吸器・乳腺外科学講  
座・講師  
研究者番号：30404388

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：