

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860656

研究課題名(和文)「新規あるいは稀な」EGFR遺伝子変異を有する肺癌の薬剤感受性解析とその臨床応用

研究課題名(英文)Drug sensitivity of lung cancers harboring novel or rare EGFR mutations

研究代表者

安田 浩之 (Yasuda, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70365261

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)：肺癌は本邦の癌死因の1位を占める予後不良の疾患である。EGFR遺伝子は肺癌の代表的な癌遺伝子である。近年の報告で、EGFR遺伝子変異の80-90%を占めるExon19の欠失変異およびL858RがEGFRのチロシンキナーゼ阻害薬に対する薬剤感受性に関わる遺伝子変異であることが明らかになっている。しかし、相対的に頻度の少ないEGFR遺伝子変異については、薬剤感受性などの解析が充分になされていない。我々は相対的に頻度の少ないEGFR遺伝子変異群であるexon20の挿入遺伝子変異について、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬に対する薬剤感受性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is a leading cause of cancer related death in Japan. EGFR is one of the most common driver oncogenes in non-small cell lung cancer. The most common EGFR mutations, exon 19 deletion and L858R, account for about 80-90% of EGFR mutations in non-small cell lung cancer. For these classic EGFR mutations, sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors are well studied. However, for other relatively rare EGFR mutations, the sensitivity to EGFR tyrosine kinase inhibitors have not been clarified. In this project, we focused on EGFR exon 20 insertion mutations. We clarified the sensitivity of multiple EGFR exon 20 insertion mutations to EGFR tyrosine kinase inhibitors.

研究分野：癌生物学

キーワード：肺癌 EGFR遺伝子 薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、世界中で年間 100 万人以上の新規患者が発生する最も頻度の高い癌の一つであり、人類の健康の増進にとって大きな障害となっている。現在までに、肺癌の原因遺伝子の同定に関わる研究が世界中で活発に行われてきており、その中で数多くの肺癌の原因遺伝子が同定された。肺癌の原因遺伝子の中で、最も有名で頻度の高いものの一つが EGFR 遺伝子である。肺癌における EGFR 遺伝子変異については多くの研究がなされ、すでに多くの報告がされている。

EGFR 遺伝子変異のうち、exon19 の欠失型変異および exon21 point mutation(L858R)は肺癌における全 EGFR 遺伝子変異の 80-90%を占め、いわゆる「古典的」EGFR 遺伝子変異群である。

2004 年に肺癌の「古典的」EGFR 遺伝子変異が、EGFR-TKIs である gefitinib や erlotinib への感受性を示す予測因子であることが報告された。具体的には、これら遺伝子変異を認めない肺癌では EGFR-TKIs の効果(奏効率)は 10%前後であるが、遺伝子変異を有する肺癌での奏効率は 80%前後である。この報告以降、化学療法の必要な肺癌患者では、まず腫瘍組織を用いて EGFR 遺伝子変異の有無を調べ、EGFR 遺伝子変異を認めた場合、EGFR-TKIs が治療薬として選択されている。このように遺伝子変異のタイプ毎に薬剤への感受性が予測可能になることで、EGFR-TKIs によって治療効果を得やすい患者と得にくい患者が治療の前に判定でき、適切な EGFR-TKIs での治療が可能になっている。

しかし、残りの 10-20%の EGFR 遺伝子変異群に関しては、世界中で年間 3 - 5 万人以上の新規患者が発生しているにも関わらず、十分な研究がなされておらず詳細な感受性の解析データは存在しない。研究の進まない理由としては、その 10-20%の中に 50 種類以上に及ぶ遺伝子変異が存在すること、各変異が「古典的」遺伝子変異と比較して相対的に稀であることなどがあげられる。そのため実際にこれら「新奇あるいは希な」遺伝子変異を有する患者では、EGFR-TKIs への感受性が予測できず、適切な EGFR-TKIs を使った治療が行われていない。

2. 研究の目的

新規あるいは希な EGFR 遺伝子変異の中にも、EGFR-TKIs に感受性の遺伝子変異があるはずであるが、感受性のデータが存在しないため、それら遺伝子変異を有する患者では効果を示すはずの EGFR-TKIs による治療を受ける機会を失っている。実際我々は、希な EGFR 遺伝子変異の中から、EGFR-TKIs に感受性の遺伝子変異を同定した。我々は、この「忘れられた」遺伝子変異に以前より注目し研究を行ってきた。希な EGFR

遺伝子変異の中の一群の遺伝子変異である EGFR exon 20 の挿入型遺伝子変異の頻度や EGFR-TKIs への感受性を 2011 年に *Lancet Oncology* に報告した。

このような研究背景から、本研究で我々が考えている目的は以下の通りである。

- (1) 新規あるいは希な EGFR 遺伝子変異の EGFR-TKIs への感受性を *in vitro* で評価すること。
- (2) 得られた各 EGFR 遺伝子変異の感受性データの結果を公開し、報告することで、臨床の現場で、これら新規あるいは希な EGFR 遺伝子変異を有する肺癌患者が適切な EGFR-TKIs による治療が受けられるようになること。

3. 研究の方法

今までに EGFR-TKIs に対する感受性が明らかになっていない希な EGFR 遺伝子変異の erlotinib に対する感受性を総合的に評価するため以下の 4 つの手法での研究を行った。

- (1) EGFR 遺伝子変異を有する EGFR を恒常的に発現させた細胞株(Stable cell line)の作成

まず固形癌の遺伝子変異のデータベースである COSMIC database のデータをもとに、感受性を解析する遺伝子変異を決定する。その後 PCR 法を用いた site-directed mutagenesis により目的の EGFR 遺伝子変異を作成し、それを retrovirus vector (MigR1) に組み込みクローニングする。これを用いて retrovirus を作成し、マウスの pro B cell である Ba/F3 細胞に感染させる。これにより目的の変異を有する EGFR 蛋白を恒常的に発現する Ba/F3 stable cell line を作成する。Ba/F3 細胞は、癌遺伝子の機能を評価するためにすでに多くの研究で使われている細胞株である。また内在性の EGFR を発現していないため、我々が外因性に発現させた EGFR の機能を純粋に評価することが可能で、本研究計画を進めるにあたって最適な細胞株である。

ここで作成した細胞株を下記(2) - (4)の実験で使用する。

- (2) EGFR 発現細胞株の増殖能を抑制する erlotinib の濃度 (IC50 値) の決定

erlotinib が上記細胞株の増殖能に与える影響を評価するために MTS assay を行う。MTS assay には Promega 社の MTS solution を使用する。具体的には、各種 EGFR 遺伝子変異を有する細胞株を 96 well plate にまいた後、各種濃度の erlotinib と共に 3 日間培養する。3 日後 MTS solution を加え、発色レベルを評価することで、erlotinib の増殖能に与える影響を評価する。得られた数値からグラフを作成し IC50 値を決定する。

(3) EGFR の下流シグナルの検討

EGFR からのシグナルは、その下流にある PI3K 経路あるいは MAPK 経路に伝わっていく。EGFR-TKIs が有効である場合、EGFR から下流へのシグナルが阻害され、AKT あるいは ERK のリン酸化が抑制される。

これを用いて、erlotinib 投与後の AKT および ERK のリン酸化レベルを western blotting で評価する。

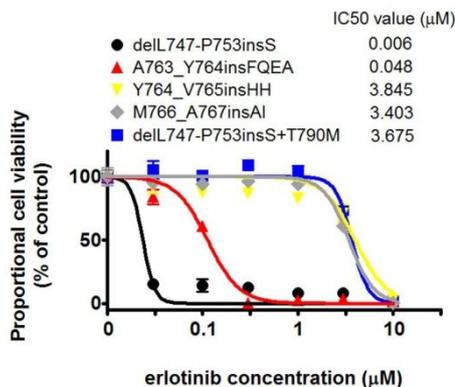
(4) erlotinib によるアポトーシスの検討

erlotinib が各種 EGFR 遺伝子変異を有する Ba/F3 細胞にアポトーシスを誘導するか否かを評価するために、western blotting を行い、proapoptotic protein である BIM の活性化、アポトーシスが起こることによって発生する cleaved PARP の出現の有無を評価する。

4. 研究成果

我々は、複数の相対的に稀な遺伝子変異を有する EGFR を恒常的に発現させた細胞株 (Stable cell line) の作成に成功した。

それら細胞株を用いて、erlotinib 投与下で MTS assay を行うとともに各 EGFR 遺伝子変異の erlotinib に対する IC50 値を計測し、薬剤感受性を明らかにした。下図がその結果である。その中で我々は EGFR A763_Y764insFQEA が EGFR-TKIs に感受性の遺伝子変異であることを世界で初めて報告した。



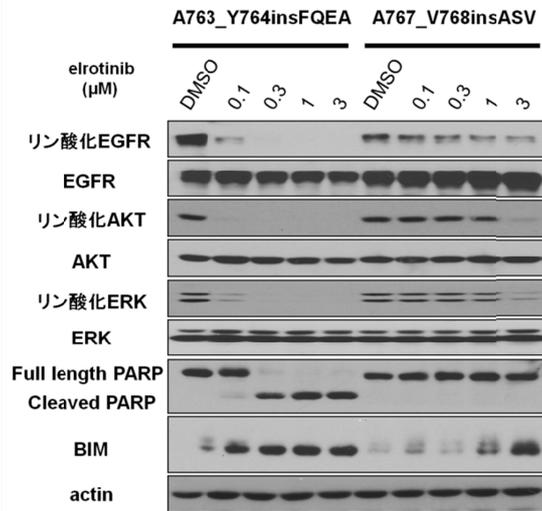
Yasuda H, et. al. *Sci Transl Med* 2013

同様の細胞株を用いて、erlotinib が EGFR の下流シグナルに与える影響、アポトーシスを誘導を起こすか否かについて Western blotting による検討も行った。

右上図はその結果であり、EGFR-TKIs 感受性の EGFR A763_Y764insFQEA で EGFR およびその下流シグナルをつかさどるタンパクである AKT、ERK のリン酸化レベルが低下し、アポトーシスに関わる BIM の蓄積や cleaved PARP の出現を認めた。

また、これら相対的に稀な EGFR 遺伝子変異がどのようにして EGFR タンパクを活性化するのかについてタンパク構造解析モデルを用いて明らかにした。

さらに、EGFR 遺伝子変異が EGFR-TKIs に対する薬剤感受性に与える影響を、酵素活性を



測定することにより明らかにした。

これらの結果は、2013 年に *Science Translational Medicine* (Yasuda H, et al. *Sci Transl Med* 2013) 誌に報告した。

また、同様の内容を、肺癌診療に携わる医師や、研究者が多く参加する日本呼吸器学会および日本肺癌学会において報告した。

現在、次世代シーケンサーなどのテクノロジーの進歩に伴い、癌細胞における体細胞遺伝子変異の同定が急速な勢いで進んでいる。これに伴い今後、多種類におよぶ相対的に稀な EGFR 遺伝子変異が同定されていくことが予想される。しかし、これら遺伝子変異が同定されるのみでは、その癌における生物学的な役割や、薬剤感受性は不明のままであり、それら相対的に稀な遺伝子変異を有する癌患者の予後を改善することはできない。

今後も、本研究同様の研究は癌患者の予後を改善するためには必要であると思われ、積極的に進めていく必要があると考える。

我々は現在も、相対的に稀な EGFR 遺伝子変異に注目し解析を続けている。

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 2 件)

(1) Suzuki T, Yasuda H, Funaishi K, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Tani T, Hamamoto J, Ohashi A, Naoki K, Betsuyaku T, Soejima K. Multiple roles of extracellular fibroblast growth factors in lung cancer cells. *Int J Oncol.* (査読あり)

2015 ;46(1):423-9.

doi:10.3892/ijo.2014.2718.

(2) Yasuda H, Park E, Yun CH, Sng NJ, Lucena-Araujo AR, Yeo WL, Huberman MS, Cohen DW, Nakayama S, Ishioka K, Yamaguchi N, Hanna M, Oxnard GR, Lathan CS, Moran T, Sequist LV, Chaft JE, Riely GJ, Arcila ME, Soo RA, Meyerson M, Eck MJ, Kobayashi SS, Costa DB. Structural, biochemical, and clinical characterization of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 20 insertion mutations in lung cancer. Sci Transl Med. (査読あり) 2013 18;5(216):216ra177.
doi: 10.1126/scitranslmed.3007205.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1)安田浩之, 副島研造, 猶木克彦, 石岡宏太, 小林進, 別役智子. 非小細胞肺癌における EGFRexon20 挿入型遺伝子変異についての基礎的および臨床的検討. 第 55 回日本肺癌学会総会 2014 年 11 月 14 日 .京都国際会館 京都 .

(2)Hiroyuki Yasuda, Kenzo Soejima, Kota Ishioka, Katsuhiko Naoki, Tomoko Betsuyaku, Susumu Kobayashi, Daniel B. Costa. Clinical, structural and biochemical characterization of EGFR exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer (NSCLC). 第 54 回日本呼吸器学会総会 2014 年 4 月 26 日 . グランキューブ 大阪 大阪 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者
安田 浩之 (YASUDA HIROYUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 70365261

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし