

令和 6 年 4 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07100

研究課題名(和文) EGFR遺伝子変異陽性肺癌における抗体薬物複合体の作用機序に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the mechanism of action of antibody-drug conjugates in EGFR mutation-positive lung cancer

研究代表者

岩間 映二 (Iwama, Eiji)

九州大学・大学院医学研究院呼吸器内科学分野・准教授

研究者番号：40567343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において下記を明らかにした。1) EGFR変異陽性肺癌細胞株においてEGFR-HER2ヘテロダイマー形成の発現が高い。2) HER2増幅を認めない細胞ではHER2は速やかに細胞質内に取り込まれ、ほとんど全てがEGFRと共存していた。3) EGFR遺伝子変異陽性細胞では、内在化されたHER2は速やかにリソソームに輸送されていた。4) 抗HER2抗体薬物複合体であるトラスツズマブ・エムタンシン(T-DM1)は、EGFR遺伝子変異陽性肺癌に効果が高く、その感受性はオシメルチニブ耐性後の細胞株においても保たれていた。抗HER2抗体薬物複合体がEGFR遺伝子変異陽性肺癌に対する新たな治療戦略に成り得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR遺伝子変異陽性肺癌に対するEGFR-TKI耐性に関するこれまでの報告は、その細胞内シグナル伝達の解明、阻害に関するものが主体であり、変異型EGFRの細胞内動態と抗体薬物複合体の効果に着目した研究は認めなかった。本研究において、EGFR遺伝子変異陽性肺癌におけるEGFR-HER2ヘテロダイマーの細胞内動態を明らかにするとともに、HER2に対する抗体薬物複合体の作用機序を明らかにし学会、論文報告を行った。これらの結果はEGFR遺伝子変異陽性肺癌を含む様々ながん種に対する抗体薬物複合体開発の一助になると考えられ、学術的、社会的意義の高い研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that: 1) the expression of EGFR-HER2 heterodimer formation was higher in EGFR mutation-positive lung cancer cell lines than in EGFR wild-type cells; 2) in cells without HER2 amplification, almost all of the internalized HER2 in cells without HER2 amplification coexisted with EGFR; 3) internalized HER2 in EGFR mutation-positive cells was rapidly transported to lysosomes; 4) The anti-HER2 antibody-drug conjugate trastuzumab emtansine (T-DM1) was effective in EGFR mutation-positive lung cancers, sensitivity to T-DM1 was high and this sensitivity was maintained in cell lines after osimertinib resistance. These findings indicate that the formation of numerous HER2-EGFR heterodimers in EGFR mutation-positive lung cancers increases the sensitivity to T-DM1 by increasing EGFR-mediated uptake of HER2 into the cytoplasm and lysosomes, and that anti HER2 antibody-drug conjugates could be a new therapeutic strategy for EGFR mutation-positive lung cancer.

研究分野：腫瘍生物学

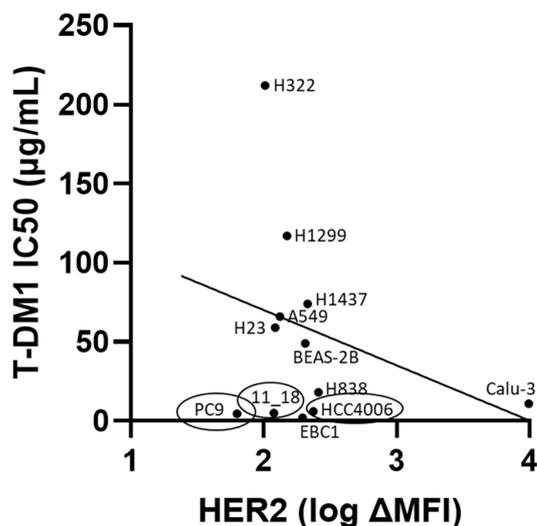
キーワード：抗体薬物複合体 非小細胞肺癌 EGFR遺伝子変異 ダイマー 耐性克服

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (EGFR) は ErbB ファミリー (ErbB1:EGFR, ErbB2:HER2, ErbB3:HER3, ErbB4:HER4) に属し、EGFR との結合 (ホモダイマー) だけでなく他の ErbB ファミリー (HER2, HER3, HER4) と結合 (ヘテロダイマー) することによって二量体を形成し、シグナル伝達を効率的に行っている。活性型遺伝子変異を有する EGFR はリガンド非依存性にダイマーを形成し、EGFR の恒常的リン酸化に伴うシグナル伝達を起こし、細胞の生存、増殖、転移、浸潤を促進する。EGFR 活性型遺伝子変異 (以下、EGFR 遺伝子変異) 陽性の非小細胞肺癌は EGFR シグナルに依存しており、このシグナルを遮断する EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TK) が著効を示す。第三世代 EGFR-TKI であるオシメルチニブは EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対し、奏効率 80%、無増悪生存期間は 19 ヶ月と顕著な治療効果を有するが、いずれ耐性となり、その耐性機序は様々であることが報告されている。第三世代 EGFR-TKI であるオシメルチニブや第一世代 EGFR-TKI であるゲフィチニブ、エルロチニブは EGFR の ATP 結合部位に競合的に結合し、EGFR のリン酸化を阻害し、シグナル伝達を遮断することでその効果を示すが、EGFR 以外の ErbB ファミリーに対する阻害効果は有さない。一方で、第二世代 EGFR-TKI であるアファチニブやダコミチニブは EGFR だけでなく他の ErbB ファミリーのキナーゼドメインに結合し、そのリン酸化を阻害する効果を有するため、より強力なシグナル伝達遮断効果が期待されたが、臨床試験における抗腫瘍効果に関しては第一世代 EGFR-TKI との効果の差は僅かであった。EGFR は他の ErbB ファミリーとヘテロダイマーを形成するため、EGFR を介したシグナル伝達において、他の ErbB ファミリー (HER2, HER3, HER4) の関与は重要と考えられ、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌においてその阻害が今後の治療ターゲットとして期待されるが、十分な結果は得られていないのが現状である。

抗 HER3 抗体とトポイソメラーゼ 阻害剤の抗体薬物複合体である U3-1402 が、EGFR-TKI に耐性となった EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対して良好な抗腫瘍効果を示したことが報告されており (ASCO 2019)、HER3 の発現は非小細胞肺癌の大多数に発現していることから、EGFR-TKI の耐性機序によらない効果が期待されている。一方、T-DM1 は、抗 HER2 抗体とチューブリン重合阻害剤の抗体薬物複合体であり、HER2 陽性 (HER2 過剰発現) 乳癌に対して適応を有している。T-DM1 の主たる作用機序として、がん細胞膜上の HER2 に T-DM1 の抗 HER2 抗体部位が結合し、HER2 が細胞内に内在化される際に共に細胞内に内在化され、リソソーム内で T-DM1 の分解が起こり、チューブリン重合阻害剤が抗 HER2 抗体から分離し、抗がん作用を示すことが知られている。我々は様々な肺癌細胞株における T-DM1 に対する感受性を調べたところ、EGFR 遺伝子野生型の細胞株では HER2 発現の程度と相関して感受性を認め一方で、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌細胞株においては HER2 発現量が低

(図 1) 各種細胞株における HER2 発現 (FACS) と T-DM1 の IC50 (PC-9, 11-18, HCC4006: EGFR 遺伝子変異陽性細胞株)



いにもかかわらず T-DM1 の感受性が高いことを見出した (図 1)。このように、ErbB ファミリーを標的とした抗体薬物複合体は *EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌に対する新たな治療薬として有望であるだけでなく、EGFR-TKI 耐性をきたした症例においても効果が期待できるが、なぜ *EGFR* 野生型ではなく、*EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌に効果を認めるのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、*EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌における EGFR-HER2 ヘテロダイマーの細胞内動態を明らかにするとともに、HER2 に対する抗体薬物複合体である T-DM1 の作用機序を明らかにし、*EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌に対する新たな治療戦略の礎とすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. *EGFR*-HER2 ヘテロダイマーの発現確認

我々は EGFR ホモダイマー形成を確認する方法として Proximity Ligation Assay (PLA 法: 受容体に対する抗体に試薬を結合させ、受容体同士が近づくと試薬間の反応が起こり蛍光を発する) を用いた。

2. HER2 内在化の確認

EGFR はリン酸化が起こると細胞内に内在化されることが報告されている。このことは、*EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌において恒常的な EGFR-HER2 ヘテロダイマー形成を介した HER2 の内在化が高頻度に行き起こり、EGFR-HER2 ヘテロダイマーの HER2 部位に T-DM1 が結合することで T-DM1 の内在化も高頻度に行き起こるため T-DM1 に対する感受性が高い可能性を示唆させる。蛍光標識したトラスツズマブを *EGFR* 遺伝子変異陽性または野生型細胞株へ投与し、蛍光顕微鏡を用いたタイムラプスでトラスツズマブの動向 (=HER2 の動向) を確認し、*EGFR* 遺伝子変異陽性細胞株において HER2 の内在化が亢進しているかどうかを確認した。また、EGFR-HER2 ヘテロダイマーとトラスツズマブの共在を蛍光顕微鏡で確認し、EGFR-HER2 ヘテロダイマーを介した HER2 抗体 (T-DM1) の内在化を確認した。

3. EGFR-TKI 耐性細胞株、変異型 *EGFR* 遺伝子導入細胞株に対する T-DM1 の効果の検討

オシメルチニブ耐性株に対する T-DM1 の効果を検討した。EGFR 野生型、低 HER2 発現、低 T-DM1 感受性の乳癌細胞株 MCF-7 に変異型 *EGFR* を遺伝子導入し、T-DM1 に対する感受性の亢進を検討した。

4. ヘテロダイマーのリソソームへの取り込みの確認

T-DM1 は細胞内に取り込まれた後、リソソームへ輸送され、リソソーム内のプロテアソームにより分解が起こり、トラスツズマブのリシン残基に結合していた DM1 が遊離することで抗がん作用を有するため、リソソームへの効率的な取り込みが重要である。*EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌細胞株における、EGFR-HER2 ヘテロダイマーを介した HER2 のリソソームへの取り込みの亢進について、リソソーム (LAMP1 抗体で検出) を用いて共染色し、蛍光顕微鏡を用いて共局在について検討を行った。

4. 研究成果

研究成果について、下記論文に報告を行った。

Tsutsumi H, **Iwama E (Corresponding author)**, Ibusuki R, Shimauchi A, Ota K, Yoneshima Y, Inoue H, Tanaka K, Nakanishi Y, Okamoto I. Mutant forms of EGFR promote HER2 trafficking through efficient formation of HER2-EGFR heterodimers. Lung Cancer. 2023 Jan;175:101-111.

1) HER2 は主に EGFR と二量体を形成し、HER2-EGFR ヘテロ二量体は細胞質内に存在している

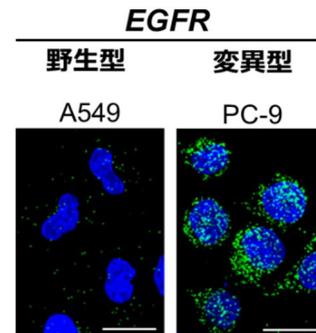
HER2 増幅を認めない非小細胞肺癌細胞株においては、EGFR 野生型の細胞株、変異型の細胞株に関わらず、HER2-HER2 ホモ二量体や、HER2-HER3 ヘテロ二量体はほとんど形成されず、HER2 はほとんどが EGFR と二量体を形成しており、細胞質内に存在していることを明らかにした。

2) 変異型 EGFR は野生型 EGFR と比較し、多くの HER2-EGFR ヘテロ二量体を形成する

1 細胞あたりの二量体の数を評価するために、細胞の底辺から頂点までの細胞断面を蛍光顕微鏡が有するセクションング法で撮影し、それを 2 次元に落とし込んだ Z プロジェクションイメージという画像を作成した。EGFR 遺伝子変異のない細胞株と比

(図 2) PLA 法を用いた HER2-EGFR ヘテロダイマーの検出

べて、変異陽性の細胞株で HER2-EGFR が多数検出された(図 2)。更に、EGFR 野生型・変異型の細胞株において、1 細胞あたりの二量体の数を定量化すると、EGFR 野生型の細胞株と比較して変異型細胞株で有意にその数が多いことが示された。MCF-7 細胞株に EGFR の野生型と、変異型である del19、L858R を安定発現させた細胞株を樹立し、これらの細胞株で同様の実験を行ったところ、やはり EGFR 野生型と比べて変異型の EGFR を発現させた細胞において、HER2-EGFR ヘテロ二量体の数が有意に多いことが示され、変異型 EGFR は HER2-EGFR ヘテロ二量体形成を促進することが明らかになった。



緑：HER2-EGFRヘテロ二量体
青：核
スケールバー：20 μm

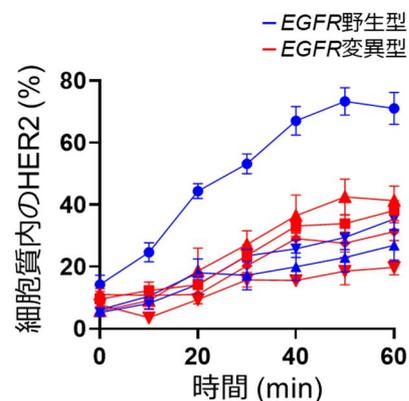
3) HER2 増幅を有さない細胞においては EGFR 遺伝子変異の有無にかかわらず HER2 は速やかに細胞質内へ内在化する。

抗 HER2 抗体であるトラスツズマブのアミノ酸残基に蛍光色素を結合させた抗体 (Tz-555) を作成し、標的細胞の細胞膜表面の HER2 に結合させ、HER2 の動態をライブセルイメージングで観察した。各タイムポイントにおける全体の HER2 シグナルの面積のうち細胞内の HER2 シグナルの割合を定量化した。EGFR 遺伝子変異の有無にかかわらず HER2 は速やかに細胞内へ内在化していることが明らかになった(図 3)。

(図 3) ライブセルイメージングによる HER2 の内在化評価

4) HER2 は HER2-EGFR ヘテロ二量体を介して内在化する

抗 HER2 抗体の Tz と、EGFR の抗体であるセツキシマブにそれぞれ蛍光標識を行い、同時に反応させ、ライブセルイメージングを行った。EGFR 遺伝子変異のない細胞、ある細胞いずれにおいても、細胞の中に取り込まれた HER2 のほとんどが、EGFR と共局在を示しながら細胞内を移動していることが分かり、HER2 は EGFR との二量体を介して内在化している可能性が考えられた。



5) EGFR 変異型細胞株では EGFR 野生型細胞株と比較し、リソソームへの HER2 の取り込みが増加する

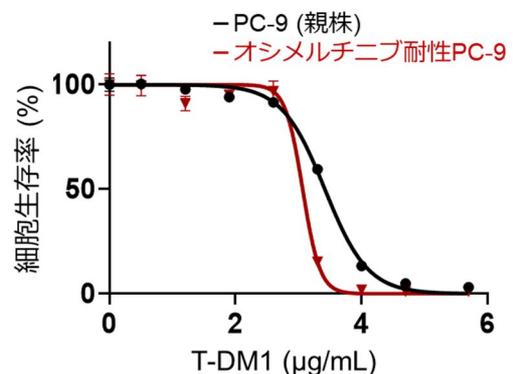
Tz-555 の内在化開始 2 時間後に細胞を固定し、リソソームマーカーである LAMP1 を染色した。

結果として、EGFR 遺伝子変異のない細胞においては、細胞内に取り込まれた Tz-555、つまり HER2 は紫の LAMP1 とはほとんど共局在を示していなかったのに対し、変異陽性の細胞株では、内在化した HER2 のほとんどがリソソームと共局在を示した。全体の HER2 のうち、LAMP1 と共局在している HER2 の共局在率を定量化すると、EGFR 遺伝子変異陽性の細胞において有意にその割合が高かった。さらに、外因性 EGFR をトランスフェクションした MCF7 においても同様に実験をおこなうと、EGFR 野生型の細胞株と比較して、変異型の細胞において有意に HER2 とリソソームの共局在率が高く、EGFR 遺伝子変異陽性細胞では HER2 が効率的にリソソームへ移行することが示された。

6) EGFR 変異型細胞は T-DM1 感受性が高く、EGFR-TKI 耐性後も T-DM1 の感受性は保たれる

EGFR をトランスフェクションした MCF7 においても、T-DM1 100ug/ml 使用時の細胞生存率は野生型 EGFR を発現する細胞よりも変異型を発現する細胞株で有意に低く、T-DM1 の感受性が高いことが示された。さらに、EGFR 遺伝子変異陽性細胞株の PC-9 に EGFR-TKI であるオシメルチニブを長期負荷することによりオシメルチニブ耐性株を作成したところ、PC-9 親株と同等の T-DM1 感受性を示した (図 4)。

(図 4) オシメルチニブ耐性細胞に対する T-DM1 の感受性評価



これまでの報告における、HER2 の動態は、HER2 増幅細胞においてのみ調べられており、主として HER2 ホモ二量体を形成し、HER2 が細胞膜に留まることが報告されていた。今回の実験において、非小細胞肺癌細胞株においては、HER2 は EGFR と二量体を形成し、速やかに内在化することを示した。HER2 と対照的に、EGFR は細胞内に内在化しやすいことが報告されており、その EGFR と二量体を形成することにより、EGFR を介して HER2 も速やかに内在化していると考えられた。EGFR 遺伝子変異陽性細胞では HER2-EGFR ヘテロ二量体形成が促進されたという点に関しては、変異に伴う EGFR の構造変化により EGFR ホモ二量体形成が促進される報告があるのと同様に、HER2-EGFR ヘテロ二量体形成についても促進される可能性があると考えられる。EGFR 遺伝子変異陽性細胞では HER2 とのヘテロダイマーが多く形成されること、HER2 が効率的にリソソームへ移行することが、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する抗 HER2 抗体薬物複合体の効果を高める原因と考えられた。

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 Tsutsumi Hirono, Iwama Eiji, Ibusuki Ritsu, Shimauchi Atsushi, Ota Keiichi, Yoneshima Yasuto, Inoue Hiroyuki, Tanaka Kentaro, Nakanishi Yoichi, Okamoto Isamu	4. 巻 175
2. 論文標題 Mutant forms of EGFR promote HER2 trafficking through efficient formation of HER2-EGFR heterodimers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 101 ~ 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2022.11.018	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hirono Tsutsumi, Eiji Iwama, Ritsu Ibusuki, Yasuto Yoneshima, Kentaro Tanaka, Isamu Okamoto
2. 発表標題 Mutant EGFR affects HER2 dynamics, providing a rationale for HER2-targeted therapy for EGFR-mutated lung cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
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
---------	---------