

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15936

研究課題名(和文) EGFR-C797S/T790M変異による多剤耐性の検出と克服の分子基盤研究

研究課題名(英文) Research for detecting and overcoming multidrug resistance caused by EGFR-C797S/T790M mutation

研究代表者

内堀 健 (UCHIBORI, Ken)

公益財団法人がん研究会・有明病院 呼吸器内科・医長

研究者番号：40633053

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)：血漿中のcfDNAをdroplet digital PCRを用いて高感度にEGFR変異を検出する方法を検討し、T790M後のosimertinib治療に対する抵抗性が出現した一部の症例でT790M/C797Sの出現が確認でき、画像より早期に薬剤耐性の兆しを認識できる手法と期待できる結果を得た。令和2年12月からは、C797S耐性変異陽性進行EGFR肺癌に対するブリガチニブ+パニツムマブ併用療法の多施設共同第I/II相試験(AMED革新がん研究)において、実際の症例登録が開始され進行中である。申請者も研究開発分担者として役割を果たすにあたって、上記の知見は大きな利点になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR阻害剤による肺癌治療は、患者ごとの最適化治療が急速に進歩しているとともに、耐性出現後の克服法の重要性が非常に大きくなっている。現在EGFR阻害剤として最も重要視されるのはosimertinibであるが、本研究によりosimertinib耐性を生じるC797S変異を血漿から検出可能であることを検出でき、CTなどによる標準的な効果判定よりも早期に耐性を予見できたことは大きな意味を持つ。すなわち、osimertinib後の治療開発を進めるにあたり、対象となる症例を簡便かつ正確に抽出できる手法の確立に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated a highly sensitive method for detecting EGFR mutations in plasma cfDNA using droplet digital PCR, and confirmed the appearance of T790M/C797S in some patients who developed resistance to osimertinib treatment after T790M. Moreover, we found that our ddPCR system is expected to be a method for recognizing signs of drug resistance earlier than imaging. In December 2020, a multi-center Phase I/II study of brigatinib plus panitumumab combination therapy for C797S-resistant mutation-positive advanced EGFR lung cancer (AMED Innovative Cancer Research) started and is now underway. We believe that the above findings will be of great benefit to the applicant in our role as an investigator.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR遺伝子変異 EGFR阻害剤 Osimertinib C797S変異 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌は、肺癌全体の85%程度を占めており、本邦においては30-40%に上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異が認められることがわかっている。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌症例に対してはEGFR チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)が開発されたことにより、それまでの標準治療であったプラチナ製剤中心の抗癌剤治療による予後が1年程度に限られていたところから、およそ3年程度に改善され、EGFR-TKIは非常に大きな役割を果たす治療薬として確立している。

第1、第2世代のEGFR-TKIの投与症例においては、およそ半数でT790M変異出現による獲得耐性が生じることで薬効が失われる。第3世代EGFR-TKIであるosimertinibは、T790M変異によって耐性となった肺癌症例に対して有効性が示されたため、2015年11月の米国での承認を皮切りに実臨床での使用が可能となり、我が国でも2016年5月より保険償還されている。

しかしながら、Osimertinibの共有結合部位である797番目のシステインがセリンに置換するC797Sが追加されてC797S/T790M(3重変異)を生じると、やはり耐性によって効果が失われる。C797S/T790M変異は現在使用可能なEGFR-TKI全てに対して高度に耐性であり、臨床導入を試みられている標的治療は現時点では存在しない。有効性の確立した治療法が存在しないC797S/T790M変異に対する治療法を開発することは、今後osimertinibの投与を受ける患者が増加していくことが確実な現状にあっては喫緊の課題であると考えられ、その克服法を研究することは非常に大きな意義を有すると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、高度耐性であるC797S/T790M変異に対してbrigainibと抗EGFR抗体の併用治療が有望な治療法候補であることを前臨床の実験により明らかにした。この治療を実臨床に導入していくための臨床試験を計画していく過程で、対象となる患者の頻度がどの程度であるかを把握し、いかにして迅速に診断するかという課題が浮上してくるため、C797S/T790Mを検出する方法の確立を本研究の目的の1つとした。digital PCRによるものと免疫組織化学染色によるものを目指しているが、後者によってこの変異検出を目指すことは独自性が高く、免疫染色が通常の診療レベルでも汎用性が高く創造性に優れていると考える。

3. 研究の方法

我々が発見したbrigatinib+抗EGFR抗体の併用治療を、C797S/T790M耐性変異症例へ迅速に投与することを目指すために、まずは我が国においてosimertinibに対して耐性となった症例からC797S/T790M陽性を検出する方法の確立を以下の様に進める。

(a) 血漿中のcell free DNAをdigital PCRを用いて高感度に検出する方法をvalidateし、実際の臨床検体(組織検体と血漿検体の両方)を用いて検出と一致について検証する。

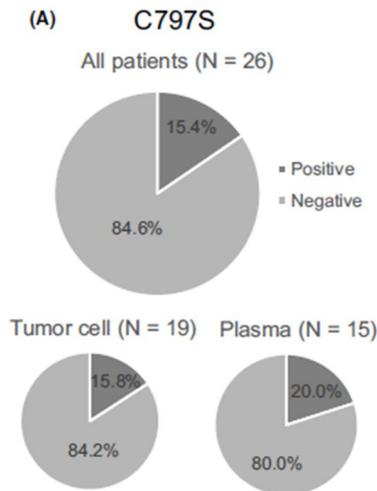
(b) EGFR変異蛋白(T790M、C797S、C797S/T790M)を認識できるモノクローナル抗体を作成する。具体的には、T790MおよびC797S周辺の配列をタンデムに複数回つないだ抗原をGST融合たんぱく質として産生させ、精製し、マウスに免疫、タイターの上昇を確認の上でミエロームとの融合を経てハイブリドーマの作製を行い特異的抗体の取得を目指す。

4. 研究成果

(1) C797S耐性変異の検出について

がん研有明病院にてT790M変異の出現によってEGFR-TKI耐性を生じたのちにOsimertinib治療が行われた症例を抽出し、Osimertinibが奏功後に獲得耐性で無効となった26例の耐性機構を解析した。血漿より抽出したcfDNAのdroplet digital PCR(ddPCR)解析から4例(15.4%)においてC797Sの出現が認められ、既報の出現率と合致したものと考えられる(図1A)。また、耐性時のサンプルとしてcfDNAと腫瘍細胞をペアとして採取可能であった9例を検討したところ、C797Sの一致率は88.9%であった。以上から、C797Sの検出法としてcfDNAを用いる有用性が示されたと考えられる(図1B)。

【図 1A】
Osimertinib 耐性での C797S 出現頻度

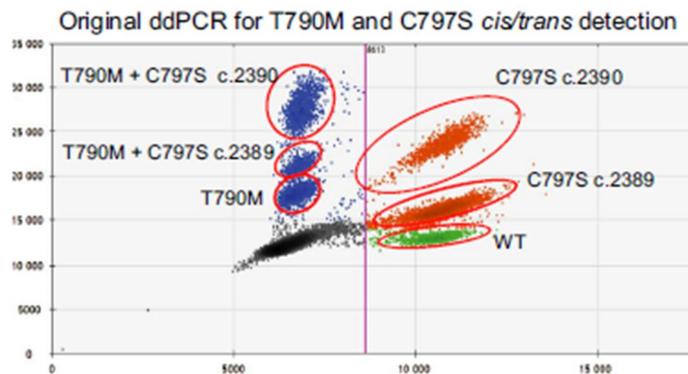


【図 1B】
腫瘍/血漿ペア検体での EGFR 変異の検出

Patient number	Tumor cell DNA			Plasma cfDNA		
	Active mut	T790M	C797S	Active mut	T790M	C797S
1	Red	Red	Blue	Red	Red	Blue
4	Red	Red	Blue	Red	Red	Blue
5	Red	Red	Blue	Red	Red	Blue
10	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue
13	Red	Red	Blue	Red	Red	Blue
17	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue
18	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue
21	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue
24	Red	Blue	Blue	Red	Blue	Blue

なお、旭川医大の佐々木らとの共同研究により、独自にデザインしたプライマーを用いて ddPCR の検証を行った。今回確立した測定系は、EGFR の活性化変異、T790M による耐性変異に加えて、Osimertinib 耐性をもたらす C797S 変異を検出可能とするものであるが、大きな特徴として C797S が T790M 変異の存在するアリアルと cis 位に存在するか trans 位に存在するかまで確認できることである(図 2)。上記の C797S が出現 4 例のうち 1 例では trans 位であることが証明された。

【図 2】 独自プライマーによる C797S の cis/trans 検出



T790M 変異と C797S 変異が cis 位、trans 位のどちらにあるかの識別は、そのいずれかによって克服可能な治療薬の候補が異なるため非常に重要な命題である。すなわち、後者で耐性に至った場合には、Osimertinib に第 1 世代 EGFR-TKI である gefitinib や erlotinib を併用することが有効であると基礎実験で示されているが、前者の cis 位で耐性に至った場合には既存の EGFR-TKI にはすべからず耐性であり、新たな治療戦略が必要となる。我々はこの C797S/T790M に対する Brigatinib + 抗 EGFR 抗体の併用療法の有効性についての前臨床のデータをすでに報告している。

このデータをもとに、令和 2 年 12 月からは、C797S 耐性変異陽性進行 EGFR 肺癌に対するブリガチニブ+パニツムマブ併用療法の多施設共同第 1/II 相試験 (AMED 革新がん研究) が開始されており、自らも研究分担者として参画し実際の症例登録が進行中である。将来的にこの併用療法が臨床導入されるに至った段階では、本研究に基づく cis 位の C797S/T790M 変異の検出は大きな意義を持つものと期待される。

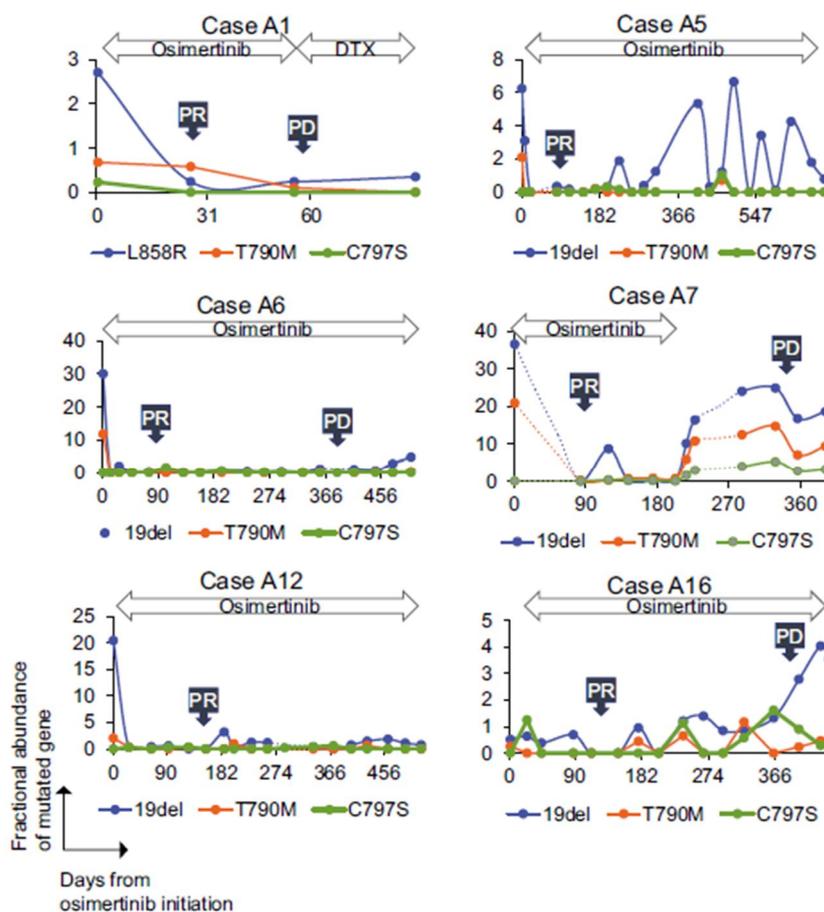
また、本研究では EGFR 変異蛋白 (T790M、C797S、C797S/T790M) を認識するモノクローナル抗体の作製も進めた。ハイブリドーマから抗体の取得までは完了し、immunoblotting により C797S 変異を特異的に認識できることを確認している。今後は、実際の EGFR 変異陽性症例から得られた FFPE 検体を用いて、免疫組織化学染色によって前述の変異 EGFR タンパクを検出するよう条件検討を重ねていく予定である。免疫染色による検出が可能になれば、上述の検証由来サンプル

による ddPCR よりもさらに安価で簡便に C797S 耐性変異を発見できることになり、実臨床における EGFR-TKI 耐性の評価法の発展に寄与すると考えられる。

(2) Osimertinib 治療中の cfDNA を用いた EGFR 遺伝子変異の追跡について

我々は、T790M 変異陽性 EGFR-TKI 耐性症例に対する Osimertinib 治療経過において、連続した血漿 cfDNA の採取を行い、上述の ddPCR を用いて解析した。奏功を得られた症例では、Osimertinib 開始時に認められた EGFR 活性化変異 (ex19 del または L858R) と T790M のコピー数が速やかに減少してほぼ検出不能レベルとなったのちに、画像的に病勢進行が確認される数か月前から再びコピー数が上昇してくる経過をたどっていることが確認された(図 3)。これは、これまでの実臨床においては感知できなかったような段階から osimertinib の効果減衰を予測できるという点で EGFR-TKI 治療のさらなる効率化に大きく貢献すると考えられる。特に caseA7、A16 においては耐性変異である C797S の出現が検知できており、本研究の主眼である C797S/T790M 陽性を検出する方法の確立に向けて、今回採用したような ddPCR 解析系が十分機能することが示された。

【図 3】 Osimertinib 治療中における血漿 cfDNA 中の EGFR 変異の推移(ddPCR 解析)

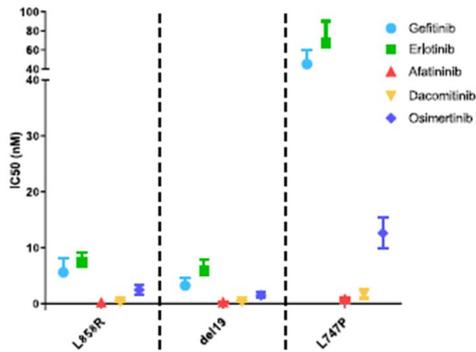


また、EGFR-TKI 耐性症例の解析を進めるなかで重要な知見を発見することができたので報告する。臨床検査で ex19 del と判定され EGFR 変異陽性肺癌として治療が行われていたが、実際には NGS 解析により L747P の point mutation であったと判明した症例を経験した。この L747P は EGFR キナーゼドメインにおける 3 から C helix に至るループ構造に位置しているアミノ酸置換であるため、746-750 が欠失する ex19 del とは本質的に異なる構造変化をもたらす。しかしながら、一般臨床で行われている検査 (EGFR Cobas Ver.2、Scorpion-ARMS) では、ex19 del として結果が報告されてしまうことを確認した。これらの検査は target PCR を基盤とした体系となっており、プライマーとの親和性によって L747 位の point mutation を含んだ配列を誤認するためと考えられる。

この変異自体は第 1 世代 EGFR-TKI に対して低感受性であることが少数報告されており、新規性は高くない。一方で、この変異が第 1 世代 EGFR-TKI のみならず第 3 世代である Osimertinib にもやや低感受性でありながら、第 2 世代である afatinib や dacomitini には一定の感受性を示すことを明らかにした点は新たな知見といえる(図 4A,B)。実際に当該変異を発見する基となった症例においても、gefitinib に耐性後に osimertinib が使用できなかったため (T90M 検出されず)、Afatinib を使用したところ著明な腫瘍縮小効果が得られた経過であった。

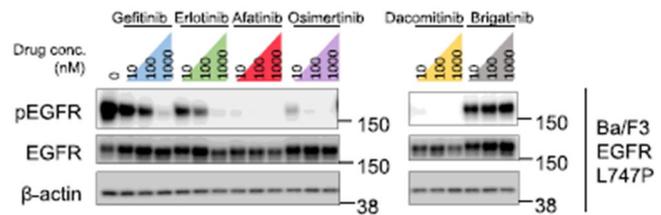
【図 4A】

EGFR 変異ごとの EGFR-TKI 感受性
(L858R, del19, L747P)



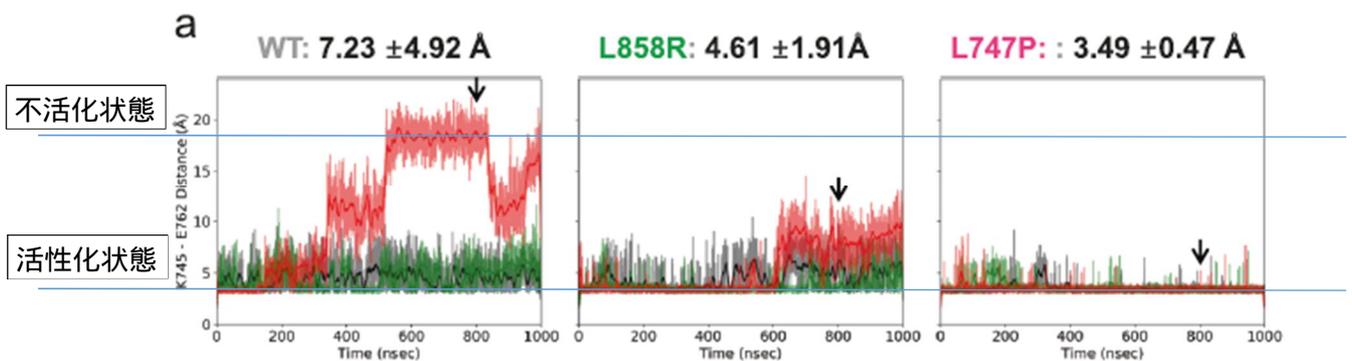
【図 4B】

L747P 変異に対する各種阻害剤の EGFR
リン酸化抑制効果



さらに、共同研究により *in silico* computational simulation において L747P のアミノ酸置換は C helix の構造的な膠着性を誘導していることを示しており、構造的な変化が機能的な変化をもたらす経緯を解明できたという点で非常に重要な発見であると考えている (図 5)。

【図 5】 EGFR 変異ごとにおける C helix の活性化/不活性化状態の推移



Ex19 del と誤認識されている L747P 症例の頻度はさほど高くないことが想定されるが、EGFR-TKI の効果が低い症例は一定の頻度で存在することを考慮すると、この知見は解決の一端を示していると想定され、今後治療不応性症例の原因として重要な知見を得られたと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ariyasu Ryo, Uchibori Ken, Sasaki Takaaki, Tsukahara Mika, Kiyotani Kazuma, Yoshida Ryohei, Ono Yusuke, Kitazono Satoru, Ninomiya Hironori, Ishikawa Yuichi, Mizukami Yusuke, Yanagitani Noriko, Fujita Naoya, Nishio Makoto, Katayama Ryohei	4. 巻 112
2. 論文標題 Monitoring epidermal growth factor receptor C797S mutation in Japanese non-small cell lung cancer patients with serial cell free DNA evaluation using digital droplet PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2371 ~ 2380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14879	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 -

1. 著者名 Yoshizawa Takahiro, Uchibori Ken, Araki Mitsugu, Matsumoto Shigeyuki, Ma Biao, Kanada Ryo, Seto Yosuke, Oh-hara Tomoko, Koike Sumie, Ariyasu Ryo, Kitazono Satoru, Ninomiya Hironori, Takeuchi Kengo, Yanagitani Noriko, Takagi Satoshi, Kishi Kazuma, Fujita Naoya, Okuno Yasushi, Nishio Makoto, Katayama Ryohei	4. 巻 5
2. 論文標題 Microsecond-timescale MD simulation of EGFR minor mutation predicts the structural flexibility of EGFR kinase core that reflects EGFR inhibitor sensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41698-021-00170-7	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内堀健、小楠真典、次富亮輔、眞鍋亮、坂本博昭、戸塚猛大、吉田寛、網野喜彬、有安亮、北園聡、柳谷典子、宝来威、片山量平、林理絵、Siew-Keen Low、西尾誠人
2. 発表標題 初回Osimertinib開始前の血漿中TP53変異はnegative biomarkerの可能性はある
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内堀 健
2. 発表標題 EGFR変異陽性肺癌における血中EGFR変異の経時的変化
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 内堀 健
2. 発表標題 初回Osimertinib治療中におけるNGSを用いた血漿cell free DNAの経時的解析
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020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
---------	---------