

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17763

研究課題名(和文) 網羅的生体情報を活用した肺がんゲノム治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of genomic therapy for lung cancer using comprehensive biological information

研究代表者

濱田 顕 (Hamada, Akira)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：80772954

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)：LUX-Lung 8 試験の二次解析で同定された、すべての臨床的意義が不明なHER2、HER4 遺伝子変異について、IL-3依存性細胞株である、マウスpro-B細胞株に導入し、人工的な腫瘍細胞モデルを作成し、腫瘍原性を検討した。その結果、HER2 E395K、G815R、R929W変異に腫瘍原性があることを確認し、これらの遺伝子変異に関しては、HER2阻害効果のあるTKIが有効であることを明らかにし、その結果をLung Cancer 誌に報告した。また、EGFRエクソン20挿入変異に対してFDAで新規に承認されたmobocertinibの二次耐性機序も、同様の腫瘍細胞モデルを用いて探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、次世代シーケンサを用いた遺伝子解析が広く用いられるようになり、既知の遺伝子異常だけでなく、臨床的意義が不明な遺伝子変異(VUS)も多数同定され、これらVUSの機能解析が求められている。本研究では、LUX-Lung 8 試験の二次解析で同定されたHER2、HER4のVUSの機能解析を、IL-3依存性細胞株である、マウスpro-B細胞株(Ba/F3細胞)に導入し、人工的な腫瘍細胞モデルを作成し評価した。その結果、3つのHER2遺伝子変異に対してHER2阻害効果のあるTKIが有効であることを明らかにし、これらの遺伝子変異を有する患者に対する治療の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：A secondary analysis of the LUX-Lung 8 randomized trial identified the variants of unknown significance (VUS) of HER2/HER4 mutations. The HER2 and HER4 mutations were transduced into the mouse pro-B cell line to determine changes in interleukin-3 (IL-3) dependence to evaluate the transforming ability of them. As a result, only the 3 HER2 mutations E395K, G815R, and R929W showed transforming ability, suggesting that these mutations may benefit from HER2-TKI treatment. These results were reported in the journal of Lung Cancer. We also explored on-target acquired resistance mechanisms (secondary mutations) to mobocertinib, which was recently approved by the U.S. Food and Drug Administration for patients with NSCLC having in-frame insertion in exon 20 of EGFR (X20ins.), using Ba/F3 models harboring X20ins..

研究分野：呼吸器外科学関連

キーワード：肺がん ゲノム 網羅的生体情報 VUS HER2 HER4 EGFR 分子標的治療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

既存の治療に不応となった患者に、新たな標的治療を同定することを目的として、遺伝子異常の網羅的解析が一部の患者で行われるようになったが、多数の遺伝子異常は同定されるものの、臨床的意義が不明な遺伝子変異 (variants of unknown significance: VUS) であることが多く、投与可能な薬が見つかる機会はあまり多くない。発見される各々の VUS の腫瘍原性や標的薬に関する情報が欠如していることが一因と考えられる。VUS 腫瘍原性を予測する公共サイト (Mutation Taster, PolyPhen2, Sorting Intolerant From Tolerant 等) はあるが、VUS 腫瘍原性や治療薬感受性に関する情報は不十分であり、これらを解明する簡便なプレクリニカルモデルの開発が求められている。また、EGFR 肺がんで代表されるように、標的治療薬により効果は示すものの、多くの症例で二次耐性を来すことが知られており、二次耐性機序を解明するプレクリニカルモデルの開発も必要と考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR・HER2・MET・ALK・ROS1・BRAF など肺がんでその活性化が報告されている遺伝子における VUS に着目し、レトロウイルスにより VUS を導入した人工的な腫瘍細胞モデルを用いて VUS 腫瘍原性と標的治療薬のスクリーニングを行って臨床的意義を明らかにすることを目的とした。また、既に臨床的意義が明らかな遺伝子変異に対する標的治療薬による二次耐性機序の解明も目的とした。

3. 研究の方法

(1) HER2、HER4 遺伝子の VUS の臨床的意義の解明

候補 VUS の同定

B/ 期の肺扁平上皮がん患者を対象とし、EGFR-TKI である afatinib と erlotinib の効果を比較検証した LUX-Lung 8 試験 (Soria ら、Lancet Oncol 2015) の遺伝子異常を解析した二次解析で (Goss ら、JAMA Oncol 2018) HER2、HER4 遺伝子の VUS を有する患者で afatinib の有効性が報告された。本研究ではこれらの VUS の機能解析を行うこととした。

VUS 腫瘍原性と標的治療薬スクリーニング

当研究室では、EGFR、HER2、MET 遺伝子変異を有するレトロウイルスを IL-3 依存性細胞株である、マウス pro-B 細胞株 (Ba/F3 細胞) に導入する人工的な腫瘍細胞モデルの作成に成功している (図 1)。本モデルは、IL-3 除去下での増殖能を検証することで導入した遺伝子異常の腫瘍原性を検証可能で、薬剤感受性実験にも使用可能である。本モデルを用いて、HER2、HER4 遺伝子の VUS を導入し、それぞれに有効な薬剤を探索した。標的治療薬の効果は MTT アッセイにより検討し、また、Western Blotting 解析により、蛋白レベルの有効性の評価も行った。

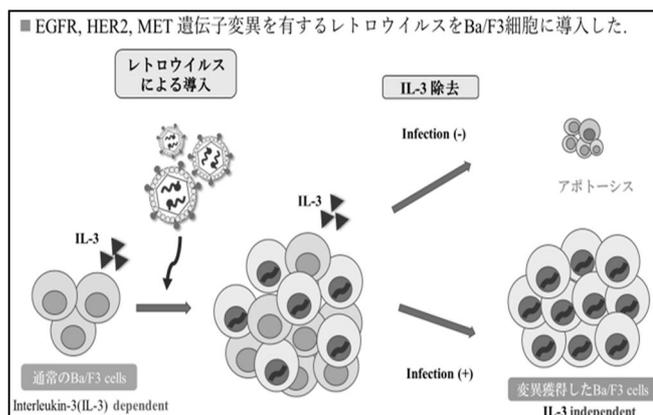


図 1: レトロウイルスを用いた人工的な腫瘍細胞モデル

(2) EGFR exon 20 挿入変異モデルに対する標的治療薬に対する獲得耐性機序の解明

近年、米国 FDA において、EGFR エクソン 20 挿入変異を伴う非小細胞肺癌患者を対象として特異的に設計された経口治療薬 mobocertinib (TAK-788) が、同対象に対する分子標的薬として承認された。当院では過去に、EGFR エクソン 20 挿入変異を伴う Ba/F3 細胞モデルに対する、tarloxotinib と poziotinib の二次耐性機序について解明し、報告している (Nishino, et al. Thoracic Cancer 2021) ことより、先行研究で樹立済みの EGFR エクソン 20 挿入変異を伴う Ba/F3 細胞株 (V769insASV、D770insSVD、H773insNPH、H773insH、A763insFQEA) を用いて、mobocertinib (TAK-788) の二次耐性機序を、点突然変異を高率に誘発する ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) に曝露させることで探索した。

4. 研究成果

(1) HER2、HER4 遺伝子の VUS の臨床的意義の解明

HER2/HER4 変異の腫瘍原性の評価

Lux-Lung8 試験で検出された HER2/HER4 変異の腫瘍原性を評価するために、10 種類の HER2 または 13 種類の HER4 変異を有する Ba/F3 細胞株の IL-3 除去下での増殖能を評価した。これら 23 種類の Ba/F3 細胞株のうち、HER2 変異 10 種類中の 7 種類の細胞株 (Q57R, G152A, S250C, E265K, P489L, R683L, P1037L) と、HER4 変異全 13 種類の細胞株で、IL-3 除去下で細胞増殖を示さなかった (図 2A、B)。この結果より、これらの HER2/HER4 変異はドライバー変異ではなく、パッセンジャー変異または非発癌性変異であると考えられた。一方で、HER2 E395K, G815R, R929W 変異を有する 3 種類の Ba/F3 細胞株は IL-3 非依存性に増殖し、その腫瘍原性が示された (図 2A)。HER2 変異を有する 10 種類の Ba/F3 細胞株を用いて、IL-3 の存在下または非存在下で、HER2 タンパクのリン酸化を評価した。腫瘍原性を示した HER2 E395K, G815R, R929W を発現する Ba/F3 細胞では、phospho-HER2 タンパク質の発現が確認されたが、他の HER2 変異では phospho-HER2 のバンドは確認されず、細胞増殖アッセイの結果と一致していた (図 2C)。

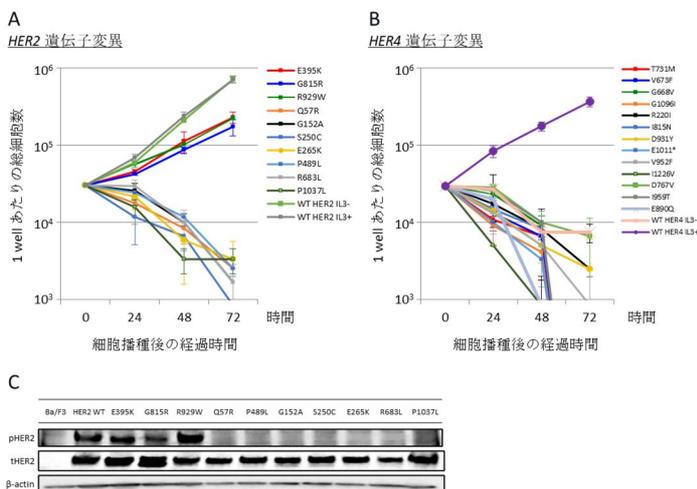


図 2 : HER2/HER4 遺伝子変異の腫瘍原性の評価

HER2 E395K, G815R, R929W 変異を有する Ba/F3 細胞株に対する薬剤感受性スクリーニング

HER2 E395K, G815R, R929W 変異を有する Ba/F3 細胞株について、EGFR または pan-HER ファミリーに対する TKI (erlotinib, afatinib, dacomitinib, neratinib, poziotinib, osimertinib) の薬剤感受性を MTT アッセイを用いて評価した。neratinib と poziotinib は 3 種類の細胞株すべてで、最も低い IC₅₀ 値 (最も高い効果) を示し、afatinib, dacomitinib, osimertinib がそれに続いた (図 3A、B)。erlotinib は、これらの HER2 変異を有する 3 種類の Ba/F3 細胞株に対して、IC₅₀ 値は高い値を示し、効果は低いと考えられた。これらの TKI は、IL-3 非存在下で、野生型 HER2 遺伝子を導入した Ba/F3 細胞株に対して異なる活性を示し、細胞増殖阻害効果は poziotinib と afatinib で最も高く、neratinib と dacomitinib がそれらに続いていた。HER2 E395K, G815R, R929W を有する Ba/F3 細胞株において、erlotinib, afatinib, osimertinib 曝露により、HER2 および Erk1/2 のリン酸化がどの程度阻害されるかについても評価した (図 3C)。erlotinib は、最高濃度 (1 μM) でも 3 種類の細胞株における HER2 および Erk1/2 のリン酸化を阻害しなかった。一方、afatinib と osimertinib は、各 Ba/F3 細胞株において用量依存的に HER2 および Erk1/2 のリン酸化を抑制した。さらに、afatinib は osimertinib よりも低い濃度 (0.1 μM) で、3 種類の Ba/F3 細胞株すべての HER2 および Erk1/2 のリン酸化を抑制した。

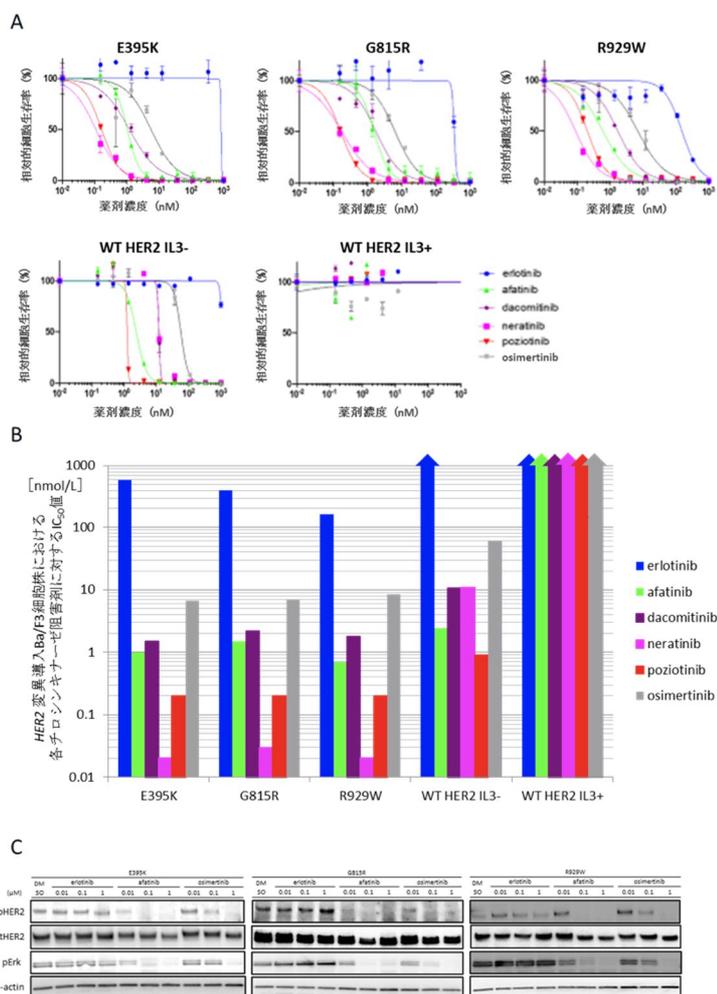


図 3 : HER2 変異を有する Ba/F3 細胞株の薬剤感受性の評価

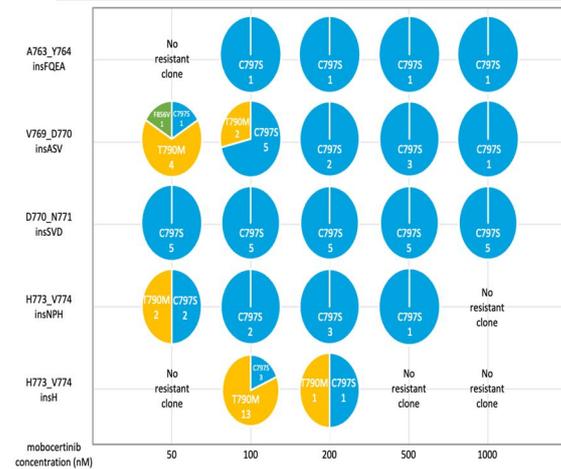
各 TKI の Sensitivity Index の算出

臨床的に達成可能な濃度は TKI によって異なるため、ヒトでの薬物活性の代替指標として Sensitivity Index (SI) を採用した。SI は、 IC_{50} を臨床試験での推奨用量における薬剤のトラフ濃度で割った値 ($IC_{50}/C_{trough} \times 100$) と定義した。図 4 に示すように、afatinib を含む第二世代および第三世代 EGFR-TKI は、SI を指標として高い有効性を示したが、erlotinib は有効性を示さなかった。

Sensitivity index	← 高い効果 → 低い効果					
	SI ≤ 2.5	2.5 < SI ≤ 5.0	5.0 < SI			
	erlotinib	afatinib	dacomitinib	neratinib	poziotinib	osimertinib
E395K	20.1	1.4	0.9	0.02	1.0	1.7
G815R	13.4	2.2	1.3	0.03	1.0	1.7
R929W	5.5	1.0	1.1	0.02	1.0	2.1
WT HER2 IL3-	30<	3.5	6.4	10.9	4.5	15.2

図 4 : Sensitivity Index の要約

(2) EGFR exon 20 挿入変異モデルに対する標的治療薬に対する獲得耐性機序の解明



EGFR exon 20 挿入変異を有する Ba/F3 細胞株を、点突然変異を高率に誘発する ENU に曝露させ、この細胞株に mobocertinib を 50-1000nM の濃度で投与することで、耐性を獲得した細胞を作成した。その結果、C797S、T790M 二次耐性変異の発現頻度が高く、バリエーションにより発現頻度が異なることに加え、F856V という新規耐性変異を同定し、これらの二次耐性機序には腫瘍原性があることを確認した。今後、二次耐性機序を克服する薬剤の探索を進めていく。

図 5 : EGFR exon 20 挿入変異モデルに対する ENU を用いた mobocertinib の耐性変異内訳

結論

Lux-Lung 8 試験の二次解析で検出された 10 種類の HER2 変異と 13 種類の HER4 変異のうち、HER2 E395K、G815R、R929W 変異の 3 種類のみが腫瘍原性を示した。このことから、Lux-Lung 8 試験の良好な結果を HER2 や HER4 変異の存在のみで説明することは困難であると考えられた。しかしながら本研究の結果、肺扁平上皮がんの一部は稀な HER2 変異によって引き起こされること、これらの変異を有する患者は第二世代、第三世代 pan-HER-TKI による治療が有益である可能性が示された。機能解析と合わせた包括的なゲノムプロファイリングは、肺扁平上皮がん患者の潜在的な治療標的を特定し、患者の利益を最大化するために有用であると考えられた。また、本モデルは他のドライバー変異に対する新規薬剤の二次耐性機序を解明するプレクリニカルモデルとしても有用であると考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Hamada Akira, Suda Kenichi, Fujino Toshio, Nishino Masaya, Ohara Shuta, Koga Takamasa, Kabasawa Takanobu, Chiba Masato, Shimoji Masaki, Endoh Makoto, Takemoto Toshiki, Soh Junichi, Yanagawa Naoki, Shiono Satoshi, Mitsudomi Tetsuya	4. 巻 3
2. 論文標題 Presence of a Ground-Glass Opacity Component Is the True Prognostic Determinant in Clinical Stage I NSCLC	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JTO Clinical and Research Reports	6. 最初と最後の頁 100321 ~ 100321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtocrr.2022.100321	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 Hamada Akira, Suda Kenichi, Koga Takamasa, Fujino Toshio, Nishino Masaya, Ohara Shuta, Chiba Masato, Shimoji Masaki, Takemoto Toshiki, Soh Junichi, Uchida Tetsuro, Mitsudomi Tetsuya	4. 巻 162
2. 論文標題 In vitro validation study of HER2 and HER4 mutations identified in an ad hoc secondary analysis of the LUX-Lung 8 randomized clinical trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 79 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2021.10.014	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Akira Hamada, Kenichi Suda, Shota Fukuda, Masaya Nishino, Shuta Ohara, Masato Chiba, Masaki Shimoji, Toshiki Takemoto, Junichi Soh, Yasuhiro Tsutani, Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 In Vitro Study of Mechanisms of Acquired Resistance for Mobocertinib in Cells with EGFR exon-20 insertion mutations
3. 学会等名 IASLC 2022 Asia Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akira Hamada, Kenichi Suda, Shuta Ohara, Masato Chiba, Masaki Shimoji, Makoto Endo, Toshiki Takemoto, Junichi Soh, Satoshi Shiono, Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 Presence of Ground Glass Opacity Component is True Determinant of Prognosis in Clinical Stage I Non-Small Cell Lung Cancer
3. 学会等名 2021 World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Hamada, Kenichi Suda, Toshio Fujino, Shuta Ohara, Junichi Soh, Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 In Vitro Study for Afatinib Efficacy in Lung Squamous Cell Carcinoma with HER2 Mutations Identified in LUX-Lung 8 Trial
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Hamada, Kenichi Suda, Toshio Fujino, Masaya Nishino, Takamasa Koga, Shuta Ohara, Masato Chiba, Toshiki Takemoto, Junichi Soh, Tetsuya Mitsudomi
2. 発表標題 In Vitro Validation Study for HER2 Mutations Identified in Secondary Analysis of the LUX-Lung 8 Randomized Clinical Trial
3. 学会等名 2020 World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2021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