

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462133

研究課題名(和文) EGFR germline変異による遺伝性肺癌の臨床および分子生物学的研究

研究課題名(英文) Clinical and molecular biological study of hereditary lung cancer caused by EGFR germline mutation

研究代表者

大塚 弘毅 (Ohtsuka, Kouki)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：70439165

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)：EGFR V843I germline変異遺伝性肺癌症候群にてNGSを実施し、EGFR以外の発癌遺伝子リスクが無く、予後不良な発端者の腫瘍にはEGFR L858Rに加えてTP53 R248W somatic変異が有り、手術後経過良好な家族の肺癌にはV843I + L858Rのみ有することを明らかにした。V843I + L858R変異導入細胞の増殖能、腫瘍形成能、EGFRシグナル伝達経路活性化を確認した。V843I + L858R蛋白とEGFR-TKIsの動的3次元ドッキングシミュレーションにて既存のEGFR-TKIsは無効であることが予測され、肺癌培養細胞を用いた薬剤感受性試験でも同様の結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We performed NGS in hereditary lung cancer syndrome caused by EGFR V843I germline mutation, and revealed there is no carcinogenesis risk by cancer-related genes mutations other than EGFR and tumor of a proband with poor prognosis include TP53 R248W somatic mutation in addition to EGFR L858R, lung cancers of family members with good postoperative course have only EGFR V843I and L858R mutations. We confirmed the proliferative capacity, tumorigenicity and activation of the EGFR signaling pathway of the cell line transfected with EGFR V843I and L858R mutations. Dynamic 3D docking simulation of EGFR V843I and L858R mutant protein and EGFR-TKIs was performed and it was predicted that existing EGFR-TKIs were ineffective. Similar results were obtained in the drug susceptibility test using the cultured lung cancer cell line established from the proband.

研究分野：腫瘍学

キーワード：EGFR V843I germline変異 遺伝性肺癌症候群 次世代シーケンス 全ゲノムシーケンス 遺伝子改変マウス 遺伝子変異導入細胞 プロテオミクス 分子シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

肺癌は難治がんのひとつであり、多くの症例は既存の治療で再発し、予後不良である。肺癌発生の新しい理解によって、肺癌の有望な予防法や治療法を開発することは非常に重要な課題である。乳癌では、BRCA germline (生殖細胞系、先天性) 変異による遺伝性乳癌の研究が進んでいる。日本においても、その予防的手術や早期発見、早期手術は非常に重要になっている。一方、肺癌においては、乳癌のような遺伝性の研究が乏しいのが現状である。しかしながら、我々は複数の肺癌多発家系を経験し、肺癌においても遺伝性の研究が重要であると考えた。

東洋人(日本人)に多く認められる L858R などの EGFR (上皮増殖因子受容体) 遺伝子の somatic (体細胞性、後天性) 変異を有する肺癌は、イレッサ(gefitinib)やタルセバ(erlotinib)の EGFR-TKI (チロシンキナーゼ阻害剤) に感受性である (N Engl J Med. 2004;350(21):2129-39.)。近年ゲノム研究の進歩によって、肺癌の原因として、喫煙や APOBEC3B 活性化の関与が推測されているが、それらでは説明できない原因の関与の可能性が指摘されている (Nature. 2013;500(7463):415-21.)。EGFR somatic 変異肺癌は、非喫煙者、女性、東洋人に多く発生すると言われているが、その発生メカニズムについては未だ明らかになっていない。最近、EGFR somatic 変異肺癌患者には、肺癌の家族歴が多く認められることが報告された (Lung Cancer. 2013;81(2):162-6.)。この報告にみられるように、EGFR 変異と肺癌の家族内多発との関連が注目されるようになってきたが、我々は肺癌の遺伝性の原因として EGFR 変異に着目し、その研究に取り組んできた。

EGFR-TKI に耐性になると、耐性変異である EGFR T790M somatic 変異が出現し (N Engl J Med. 2005;352(8):786-92.)、さらにこの T790M の germline 変異は肺癌多発家系に認められると複数報告されている (Nat Genet. 2005;37(12):1315-6., J Thorac Oncol. 2009;4(1):139 - 141., J Thorac Oncol. 2011;6(2):395 - 396., Clin Cancer Res. 2011;16(2):755-763.)。米国のダナファーマーがん研究所では、T790M germline 変異による遺伝性肺癌症候群の臨床研究を 2012 年度より開始しており、着実に症例を集積している (臨床試験登録番号 NCT01754025)。我々は約 500 症例の肺癌 EGFR 遺伝子検査を行うなかで、EGFR V843I germline 変異が、遺伝性肺腺癌の原因変異である可能性を発見し報告した。この変異をもつキャリアは高率に肺腺癌を発症し、発生した腫瘍には必ず L858R somatic 変異が発生しており、V843I germline + L858R somatic 変異肺癌は EGFR-TKI に耐性であることを見出した。このことは、T790M germline 変異と類似であり、EGFR germline 変異による遺伝性肺癌症候群を解明するう

えで非常に重要な報告である (J Clin Oncol. 2011;29(8):e191-2.)。EGFR V843I germline 変異による遺伝性肺癌症候群は、現在までに、我々の報告を含めて世界で 3 家系が報告されている (Ann Thorac Surg. 2008;85(4):1430-2. Lung Cancer. 2013;80(1):81-4.)。EGFR, R831C, R776G, R776H germline 変異による遺伝性肺癌症候群の報告もあるが、それぞれ 1 家系ずつの報告である (J Clin Oncol. 2010 Dec 1;28(34):e701-3., BMC Cancer. 2011;11:172., J Clin Oncol. 2013;31(10):e161-4.)。従って、EGFR germline 変異による遺伝性肺癌症候群は、それぞれ複数の家系が報告されている EGFR T790M と V843I の 2 つの germline 変異にまず集中して研究することが重要であると考えられる。特に V843I 変異に関しては、日本から 2 家系の報告があり、本変異に関しては日本での十分な研究が重要であると考えられる。

EGFR V843I germline 変異による遺伝性肺癌症候群の詳細な臨床解析の結果、手術不能進行肺癌で発見された症例は、EGFR-TKI はじめ抗癌剤治療に無効で予後不良であった。同家系内の根治手術を施行し得た症例は長期無再発生存しており、本家系の肺癌は早期発見、早期手術が有効である可能性が高いと考えた。臨床情報の詳細な解析および包括的に遺伝子を調べることにより、EGFR V843I, T790M germline 変異による遺伝性肺癌症候群肺癌の早期発見、早期手術、予後予測のために有用な新たな情報を得ることができると考える。

また我々は NIH-3T3 細胞に EGFR V843I 変異を導入し、さらに C57BL/6J マウスに EGFR V843I germline 変異を導入した遺伝子改変マウス (トランスジェニックマウス) を作製した。遺伝子変異導入細胞やトランスジェニックマウスによる発癌実験によって EGFR V843I germline 変異が肺癌発生の原因になることを証明することが可能であると考えられる。

さらに我々は東京工業大学と産業技術総合研究所との共同研究で、蛋白 3 次元コンピューターシミュレーションを行っている。V843I および V843I と共存する L858R 変異 EGFR 蛋白と様々な分子標的薬とのドッキングシミュレーションを行い、予防や治療の候補薬を検討している。シミュレーションで見出された候補薬に関して、患者から樹立した肺癌培養細胞で薬剤感受性試験や分子生物学的解析を行うことによって、EGFR germline 変異遺伝性肺癌症候群に対する予防薬や治療薬を見出すことが可能であると考えられる。

以上より、EGFR V843I germline 変異による遺伝性肺癌症候群において、詳細な臨床および遺伝子学的解析、発癌実験や蛋白機能解析、分子生物学的解析を行うことによって、本症候群肺癌患者の治療や予後予測のみならず、本 germline 変異を有するキャリアの肺癌予防法、早期発見や早期手術のために有

用な基礎的な知見を得ることが可能であると考へ、本研究を立案した。本研究によって、V843I germline 変異による遺伝性肺癌症候群の解明につながるものと期待できる。さらに EGFR germline 変異家系の肺癌は EGFR somatic 変異を発生しており、未だ解明されていない EGFR somatic 変異肺癌の発生メカニズムのヒントを掴むことができるのではないかと強く期待している。

2. 研究の目的

EGFR V843I germline 変異による遺伝性肺癌症候群の詳細な臨床および遺伝子学的な特徴を把握し、早期発見、早期手術の重要性や予後予測因子を明らかにする。本 germline 変異を導入した NIH-3T3 細胞や C57BL/6J マウスに発癌性があることを確認する。コンピューターシミュレーションで、本変異を有する肺癌の予防薬や治療薬の候補を見出し、患者から樹立した肺癌培養細胞でそれらの候補薬の効果を感受性試験や分子生物学的解析で確認することにより、本症候群の予防法や治療法の基礎的な知見を得る。

3. 研究の方法

(1)EGFR germline 変異遺伝性肺癌症候群の臨床および遺伝子学的解析

当施設で経験した本症候群の患者の腫瘍組織、血液あるいは正常組織の DNA を用いて、次世代シーケンスの全エクソンシーケンスやターゲットシーケンスを行うで EGFR V843I germline 変異はじめ遺伝子変異を包括的に調べる。

本症候群の肺癌患者である親族の腫瘍組織および血液あるいは正常組織、健康人である親族の血液あるいは正常組織から DNA を抽出して、患者と同様に遺伝子変異を調べる。

本症候群の家系において、性別、喫煙歴、職業歴、居住歴、家族歴、病理診断、手術や EGFR-TKI などの治療成績といった患者および親族の詳細な臨床情報を取得して、本遺伝性肺癌症候群の詳細な臨床および遺伝子学的な特徴を見いだす。

(2)EGFR germline 変異による肺癌発癌性の解明

EGFR V843I germline 変異を有する遺伝子改変マウス(トランスジェニックマウス)を作製する。

同じ変異を持つマウスどうしを交配させ、変異マウスを繁殖させる。生まれたマウスの尾の一部を採取し PCR およびダイレクトシーケンスにて導入遺伝子変異の有無を確認する。

変異マウスが死亡するまで飼育する。死亡時には解剖を行い腫瘍の発生の有無を確認する。腫瘍が発生していれば腫瘍を採取して、凍結保存およびホルマリン固定する。

ホルマリン固定した腫瘍は、病理にてパラフィン切片を作成、腫瘍の病理診断を行う。

腫瘍の凍結検体を用いて、ダイレクトシーケンスで遺伝子解析する。

トランスジェニックマウス作製に用いた C57BL/6J マウスの野性型も同時に死亡するまで飼育する。死亡後の処理はトランスジェニックマウスと同様に行い、変異型と野性型の腫瘍の発生を比較する。

(3)EGFR germline 変異細胞の機能解析

NIH-3T3 細胞を用いて、V843I および V843I と共存する L858R EGFR 遺伝子変異導入細胞を作製する。

EGFR V843I germline 変異遺伝性肺癌症候群の肺癌症例から肺癌培養細胞を樹立する。

EGFR 変異導入細胞の増殖能を MTS 法で調べる。変異導入細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能をみる。また EGFR 以下のシグナル伝達経路(EGFR, AKT, ERK, STAT5, STAT3)の活性化を各蛋白抗リン酸化抗体によるフローサイトメトリおよびウエスタンブロットティングにより調べる。

樹立した肺癌培養細胞から蛋白を抽出して、受容体、下流シグナルのリン酸化アレイおよび LC/MS によるプロテオミクスを行う。

(4)EGFR germline 変異遺伝性肺癌症候群の予防法、治療法の開発

3次元 EGFR 蛋白コンピューターシミュレーションにより、V843I および V843I と共存する L858R EGFR 変異蛋白と各種分子標的薬のドッキングシミュレーションを行い、本変異に対する予防薬および治療薬の候補を見出す。

樹立肺癌培養細胞で、コンピューターシミュレーションで候補に挙げた分子標的治療薬について薬剤感受性試験(MTS法)にて感受性を調べ、本遺伝性肺癌症候群の予防薬や治療薬の基礎的な知見を見出す。

4. 研究成果

(1)EGFR germline 変異遺伝性肺癌症候群の臨床および遺伝子学的解析

EGFR V843I germline 変異遺伝性肺癌症候群の患者の腫瘍組織、血液の DNA を用いて、全ゲノムシーケンスを行い、EGFR V843I 以外の癌関連遺伝子変異リスクを有しないこと、腫瘍には EGFR L858R に加えて TP53 R248W somatic 変異を有することを明らかにした。また手術後の経過が良好な家族の肺癌のターゲットシーケンスでは、EGFR V843I と L858R 変異のみを認めた。

(2)EGFR germline 変異による肺癌発癌性の解明

自然発生がんが少ないとされ発がん実験に頻用される C57BL6/J マウスに EGFR V843I 変異を導入したトランスジェニックマウスにおいてがんの発生を認めたが、コントロールとして飼育していた野性型マウスにおい

ても少なからずがんの発生を認め、遺伝子変異導入マウスにおける発がんが EGFR V843I 遺伝子変異の影響なのか自然発がんなのか鑑別する必要性が生じた。野生型マウスの自然発がんの発生状況についての報告が乏しいため、野生型マウスの自然発がんの状況を把握するために、82 匹の野生型マウスにおける自然発生腫瘍を検討した。その結果、計 24 匹に自然発生腫瘍（悪性リンパ腫 22 匹、肉腫 2 匹、肺癌 1 匹、肛門癌 1 匹）を確認した。

(3)EGFR germline 変異細胞の機能解析

NIH-3T3 細胞を用いて、V843I と共存する L858R EGFR 遺伝子変異導入細胞を作製し、V843I 変異導入細胞の増殖能、腫瘍形成能を確認した。また EGFR 以下のシグナル伝達経路（EGFR、ERK1/2、STAT5）の活性化を確認した。EGFR V843I germline 変異遺伝性肺癌症候群の肺癌症例から肺癌培養細胞を樹立し、樹立した肺癌培養細胞から蛋白を抽出して、LC/MS によるプロテオミクスを行った。免疫チェックポイント阻害剤による治療の可能性を求めて、その標的となる PD-L1 などの免疫チェックポイント分子群の発現を検討したが明らかな発現を認めなかった。

(4)EGFR germline 変異遺伝性肺癌症候群の予防法、治療法の開発

動的 3 次元 EGFR 蛋白コンピューターシミュレーションにより、V843I およびその変異と共存する L858R EGFR 変異蛋白と各種分子標的薬の動的ドッキングシミュレーションを行い、既存の EGFR 阻害剤の多くは無効であることが予測された。樹立肺癌培養細胞を用いた MTS 法による薬剤感受性試験でも同様の結果が得られた。

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 1 件)

Matsushima S, Ohtsuka K, Ohnishi H, Fujiwara M, Nakamura H, Morii T, Kishino T, Goto H, Watanabe T. V843I, a lung cancer predisposing EGFR mutation, is responsible for resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. J Thorac Oncol. 2014;9(9):1377-84.doi:10.1097/JTO.000000000000241. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Kouki Ohtsuka, Matsushima Satsuki, Hiroaki Ohnishi, Takashi Watanabe:Whole genome sequencing of family members with EGFR V843I mutation predisposed to lung adenocarcinoma.The29thWASPaLM, Kyoto, Nov, 2017.

大塚弘毅、大西宏明、松島早月、渡邊

卓:EGFR V843I germline 変異をもつ遺伝性肺癌症例における Whole Genome Sequencing 解析.日本臨床検査医学会総会,神戸,2016 年 9 月.

大西宏明、大塚弘毅、松島早月、渡邊卓:蛋白質立体構造解析と分子動力学に基づく EGFR 分子標的薬の効果予測.日本臨床検査医学会総会,神戸,2016 年 9 月.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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〕

ホームページ等

http://www.aist.go.jp/digbook/annual_report/h27/pageindices/index696.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

大塚 弘毅 (OHTSUKA, Kouki)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号: 70439165

(2)研究分担者

渡邊 卓 (WATANABE, Takashi)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 00191768

藤原 正親 (FUJIWARA, Masachika)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号: 20407026

横山 琢磨 (YOKOYAMA, Takuma)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号: 50439197

松島早月 (MATSUSHIMA, Satsuki)
杏林大学・医学部・実験助手
研究者番号 : 80231596

大西 宏明 (OHNISHI, Hiroaki)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号 : 80291326

(3)連携研究者
()
研究者番号 :

(4)研究協力者
()