

学位論文審査結果の報告書

氏 名 坂野 恵里

生 年 月 日 (昭和)平成 55年 8月13日

本 籍 (国 籍) 三重県

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第1241号

学位授与の条件
(博士の学位) 学位規程第5条該当

論 文 題 目

Sensitivities to various epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors of uncommon *epidermal growth factor receptor* mutations L861Q and S768I: What is the optimal epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor?

まれなEGFR遺伝子変異L861QおよびS768I陽性非小細胞性肺癌に対する最適なEGFR阻害剤の選択


学位論文受理日 2017年 11月 1日


学位論文審査終了日 2018年 1月 18日

審 査 委 員 (主 査) 岡田 斉 

(副主査) 奥野 清隆 

(副主査) 中川 和彦 

(副 査) 

指 導 教 員 西尾 和人 

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

非小細胞性肺癌における上皮成長因子受容体 (*EGFR*) 変異は、exon 19 欠失と exon 21 L858R 点変異が 85% 近くを占めており、それ以外の変異はまれな変異、uncommon mutation とされている。これらのまれな変異について、どの *EGFR* 阻害剤が適切かについては十分な情報がない。今回、まれな *EGFR* 変異の L861Q および S768I に対し適切な *EGFR* 阻害剤を検討した。

【方法】

マウスのリンパ球細胞である Ba/F3 cell line を使用し、Retrovirus method を用いて通常変異である L858R、まれな変異である L861Q および S768I の強制発現株 (Ba/F3-L858R, Ba/F3-L861Q および Ba/F3-S768I) を作製した。各々の細胞株に対して、第一世代から第三世代までの *EGFR* 阻害剤 (erlotinib, afatinib, osimertinib) を使用し、薬剤感受性を細胞増殖抑制試験にて、*EGFR* の抑制効果を Western Blot 法にて検討した。また、これらのまれな変異を持つ食道癌細胞株 (KYSE270, KYSE450) を用いて同様の実験を行い確認した。

【結果】

細胞増殖抑制試験において、Ba/F3-L861Q、Ba/F3-S768I はともに erlotinib には感受性が低く、afatinib に対して最も感受性が高かった。Osimertinib については、Ba/F3-L861Q は Ba/F3-L858R に近い効果を示したが、Ba/F3-S768I は十分な効果を認めなかった。また、Western Blot 法では、各々の細胞株で afatinib による *EGFR* リン酸化抑制効果が最も強かった。Osimertinib は Ba/F3-L861Q に対しては Ba/F3-L858R と同様のリン酸化抑制効果を認めたが、Ba/F3-S768I に対するリン酸化抑制効果は不十分であった。食道癌細胞株でも同様の傾向を認め、L861Q 変異を持つ KYSE270 では、afatinib と osimertinib でアポトーシス関連因子である cleaved-caspase3 の上昇を認めたが、S768I 変異をもつ KYSE450 では afatinib でのみ上昇していた。以上、癌細胞株での結果は、Ba/F3 cell line での結果と合致していた。

【考察】

EGFR L861Q、S768I 変異における、erlotinib, afatinib, osimertinib の薬剤感受性の違いは、各々の *EGFR* リン酸化抑制効果の違いを反映しているものと考えられた。

【結論】

EGFR L861Q および S768I 変異を有する非小細胞性肺癌に対しては、afatinib が最も有効である。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2016年7月14日 公 表 (DOI: 10.1111/cas.12980)	博士学位論文 Cancer Science 第107巻 第8号 1134-1140頁 2016年7月14日 発 行
	Sensitivities to various epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors of uncommon <i>epidermal growth factor receptor</i> mutations L861Q and S768I: What is the optimal epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor?	
	全 文	

論文審査結果の要旨

1) 論文内容の要旨

【目的】

非小細胞肺癌における上皮成長因子受容体(EGFR)変異は、exon 19 deletionとexon 21 L858R point mutationが85%近くを占めており、それ以外の変異はまれな変異、uncommon mutationとされている。これらのまれな変異に対するEGFR阻害剤(EGFR-TKI)の有効性については十分な情報がない。本研究では、まれなEGFR変異のL861QおよびS768Iに対するEGFR-TKIの効果を評価し、これらの変異に最適なEGFR-TKIを検討した。

【方法】

マウスのBリンパ球前駆細胞であるBa/F3細胞を使用し、retrovirusを用いて通常変異であるL858R、まれな変異であるL861QおよびS768Iの強制発現株(Ba/F3-L858R, Ba/F3-L861Q および Ba/F3-S768I)を作製した。各々の細胞株に対して、第一世代から第三世代までのEGFR-TKI(erlotinib, afatinib, osimertinib)を使用し、薬剤感受性を細胞増殖抑制試験にて、EGFRリン酸化抑制効果をウエスタンブロット法にて評価した。また、これらのまれな変異を持つ食道がん細胞株(KYSE270, KYSE450)を用いて同様の実験を行い確認した。

【結果】

Ba/F3-L861QおよびBa/F3-S768Iはウエスタンブロットにてリン酸化EGFR、EGFRともにBa/F3-L858Rと同程度の発現上昇を認め、L861QおよびS768I変異はがん遺伝子としての活性を持つことを確認した。細胞増殖抑制試験において、Ba/F3-L861Q、Ba/F3-S768Iはともにerlotinibには感受性が低く、afatinibに対して最も感受性が高かった。Osimertinibについては、Ba/F3-L861QはBa/F3-L858Rに近い効果を示したが、Ba/F3-S768Iは十分な効果を認めなかった。また、ウエスタンブロット法では、すべての細胞株でafatinibによるEGFRリン酸化抑制効果が最も強かった。OsimertinibはBa/F3-L861Qに対してはBa/F3-L858Rと同様のリン酸化抑制効果を認めたが、Ba/F3-S768Iに対するリン酸化抑制効果は不十分であった。食道がん細胞株を用いた細胞増殖抑制試験およびウエスタンブロットでもBa/F3細胞と同様の傾向を認めた。L861Q変異を持つKYSE270では、afatinibとosimertinibでアポトーシス関連因子であるcleaved caspase3の上昇を認めたが、S768I変異をもつKYSE450ではafatinibでのみ上昇していた。以上、がん細胞株での結果は、Ba/F3細胞の結果とでの結果と整合性のあるものであった。

【考察】

EGFR L861Q、S768I変異における、erlotinib, afatinib, osimertinibの薬剤感受性の違いは、各々のEGFRリン酸化抑制効果の違いと同様の傾向を示した。

【結論】

本研究のようなBa/F3細胞を用いたin vitro studyは臨床において最適なEGFR-TKI選択の際の一助となる。EGFR L861QおよびS768I変異を有する非小細胞性肺癌に対しては、afatinibが最も有効であると考えられる。

本論文は、まれな遺伝子変異であるEGFR L861Q、S768Iに対してEGFR-TKIであるafatinibが有効である可能性を論じたものである。これまで、主要なEGFR遺伝子変異であるexon 19 deletionおよびL858Rに対するEGFR-TKIの有効性が報告されてきたが、まれな遺伝子変異であるEGFR L861Q、S768Iに対する最適なEGFR-TKIは明らかにされていない。坂野氏は、EGFR遺伝子変異強制発現株およびEGFR遺伝子変異を発現するヒト由来のがん細胞株を用いて各種EGFR-TKIに対するEGFR L861Q、S768Iの感受性に差が認められることを明らかにした。本論文は、EGFR遺伝子変異に対するEGFR-TKIの有効性をそれぞれの遺伝子変異導入細胞株を用いて比較検討し、まれな遺伝子変異であるEGFR L861Q、S768I陽性非小細胞肺癌に対するafatinibの有効性を示した独創性の高い研究論文である。

2) 審査結果の要旨

坂野恵里氏の博士学位論文に対する最終審査は、平成29年12月18日の午後5時から第9講義室で実施された。まず、本研究を行うに至った背景、臨床的観点からの疑問を解明するための方法が提示され、*in vitro*の実験結果とその考察が発表された。それに対して、副主査である奥野教授、中川教授、主査である岡田がいくつかの疑問点を質した。奥野教授からは、*in vitro*実験でのafatinibの効果と標的タンパク質であるEGFRへの結合効率との関係、まれな遺伝子変異であるL861QおよびS768Iに対するafatinibの臨床的な有効性についての情報の有無、コンピューターシミュレーションによる構造解析により、多様な遺伝子変異に対する各EGFR-TKIの有効性の違いを識別可能か、などの質問がなされた。中川教授からは、数多く存在するEGFR遺伝子変異の中からL861QおよびS768Iに着目した理由、afatinibと同じく第二世代EGFR-TKIであるdacomitinibとの差異についての質問がなされた。また、各世代のEGFR-TKIの比較におけるベースラインの決定方法についての指摘を受けた。岡田からは、遺伝子変異L861QおよびS768I陽性肺癌の臨床病理学的特徴、EGFRから細胞内に伝達される特徴的なシグナル伝達経路についての質問がなされた。これらの質問に対して、坂野氏は具体的な実験結果や過去に報告された研究内容、最新の知見を引用しながら的確に応答した。また、論文内容から、まれなEGFR遺伝子変異であるL861QおよびS768Iを有する非小細胞肺癌にはafatinibが有効であることが確認された。

従って、主査・副主査は合議の上、提出された学位論文が確かに坂野氏の研究結果であること、学位授与にふさわしい研究計画の立案と問題を見出し解決に導く分析能力を確認し、最終試験を合格と判定した。

3) 最終試験の結果：

合格

4) 学位授与の可否：

可