

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19989

研究課題名(和文) EGFR肺癌と第二世代キナーゼ阻害剤:獲得耐性の網羅的解析と個別化治療の新展開

研究課題名(英文) EGFR mutant lung cancer and second generation tyrosine kinase inhibitor:
acquired resistance and personalized medicine

研究代表者

小林 祥久 (KOBAYASHI, Yoshihisa)

近畿大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30734628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異のある肺癌にはEGFRチロシンキナーゼが劇的に効くが、必ずしも全ての変異に有効ではないこと、一旦効いても必ず耐性を獲得することが問題である。

我々は、従来の第1世代EGFR阻害剤では効かないエクソン18の変異に第2世代のアファチニブが効くことを示した。次に、アファチニブ耐性機序としての新規EGFR L792F変異を発見し、他にT790MとC797S変異が起こること、そしてこれらの耐性克服法を明らかにした。さらに、L792Fに有効な別の第2世代阻害剤ダコミチニブの獲得耐性機序としてT790MとC797Sを見出し、それらに有効な薬剤を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) is a standard treatment for patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutant lung cancer. However, not all EGFR mutations are sensitive to conventional EGFR-TKIs. Additionally, lung cancers inevitably acquire resistance to these TKIs despite the marked initial response.

We found that lung cancers harboring exon 18 mutations were not sensitive to conventional first generation EGFR-TKIs but are sensitive to second generation TKI afatinib. Next, a novel EGFR L792F secondary mutation, in addition to T790M and C797S, was discovered in afatinib-resistant cells. L792F appeared to exhibit sensitivity to other second generation TKI dacomitinib. Dacomitinib induced T790M or C797S secondary mutations as mechanisms of acquired resistance and these mutations were sensitive to currently available TKIs.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 アファチニブ ダコミチニブ L792F 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本の肺がん死亡は年間7万人以上である。肺腺がんの40%に上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異があり、このタイプにはEGFRチロシンキナーゼ阻害剤が劇的に効く。しかし、従来の臨床試験の対象は代表的な2種類の変異(エクソン19欠失とエクソン21 L858R)のみで、残り13%を占める多くの変異の治療法は確立していない。

(2) 我々は、EGFR遺伝子変異のある肺がんに対してEGFR変異の種類毎に複数のEGFR阻害剤を使い分ける個別化治療を提唱してきた。特に、従来の第1世代EGFR阻害剤では効かないエクソン18の変異に第2世代のアファチニブが効くことを示した(Kobayashi et al. Clin Cancer Res 2015)。

(3) しかし、EGFR阻害剤が一旦効いても約1年で必ず耐性を獲得して効かなくなることが問題である。

2. 研究の目的

代表的なEGFR変異(エクソン19欠失とエクソン21 L858R)に加えてエクソン18のG719A、エクソン18欠失変異を遺伝子導入した肺がん細胞モデルからアファチニブ耐性株を樹立し、その耐性機序とその克服法を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) EGFR変異をもつ細胞モデルの作成

レトロウイルスベクターを使って上記4種類のEGFR変異をマウスプロB細胞であるBa/F3細胞に遺伝子導入した。

(2) 薬剤耐性株の樹立

まず、低濃度のアファチニブ存在下に培養して、段階的に濃度を上げていき100nM耐性株を樹立した。

次に、短時間で大量のアファチニブ耐性クローンを作成するため点突然変異を起こしやすくする発がん物質(ENU)をBa/F3細胞に投与した後、最初から最終到達濃度のアファチニブ存在下で培養した。

(3) 耐性機序としてのEGFR二次変異を解析

耐性株からRNAを抽出してcDNA化し、EGFRのキナーゼ領域であるエクソン18~21をサンガーシークエンス法で解析した。

(4) 耐性機序を克服するために有効な薬剤

耐性機序としてEGFR二次変異をBa/F3細胞に遺伝子導入して、薬剤感受性試験を行った。

4. 研究成果

(1) アファチニブ耐性機序として新規L792F変異の発見

4種類のEGFR遺伝子を導入した細胞をENUなしで長期間アファチニブに暴露し続けて耐性細胞を樹立すると、従来のT790M変異だけでなく新規L792F変異が見つかった。

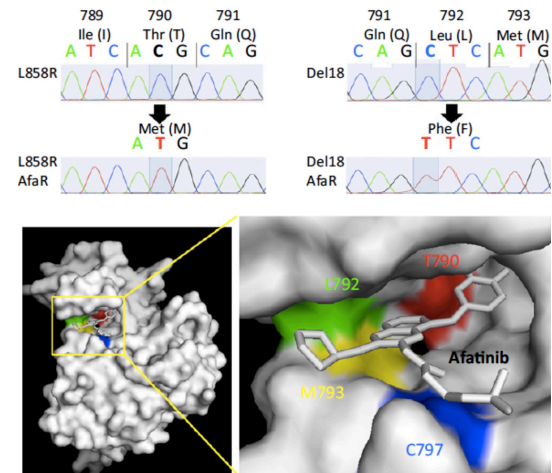


図1. 新規EGFR L792F変異

次に、この新規変異が起こりうる頻度を明らかにするために、ENUを用いて84個のアファチニブ耐性クローンを樹立した。その結果、12%でC797SまたはL792Fを獲得し、残りはすべてT790Mであった。

	Del19	L858R	G719A	Del18
Chronic exposure until 100 nmol/L	T790M	T790M	T790M	L792F
ENU mutagenesis with 100 nmol/L	9	10	9	2/8
ENU mutagenesis with 10 nmol/L	8	2/8	1/7	2/5
ENU mutagenesis with 1 nmol/L	10			
ENU mutagenesis with 0.1 nmol/L	No mutations (n=5)			

図2. アファチニブ耐性二次変異の頻度

(2) アファチニブ耐性克服法

各世代EGFR阻害剤に対する耐性変異の強弱関係を調べると、アファチニブに対する耐性の強さはL792F、C797S、T790Mの順に強くなることがわかった。また、L792Fには第2世代ダコミチニブが、C797Sには第1世代エルロチニブが有効であることがわかった(Kobayashi et al. Mol Cancer Ther 2017 表紙とハイライトに採用)。

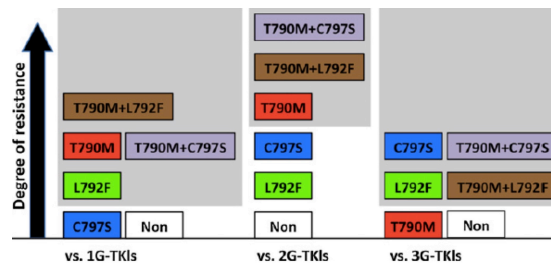


図3. EGFR耐性二次変異の強弱関係

(3) L792F 変異に有効なダコミチニブの耐性
新規 L792F 変異に効くダコミチニブは、従来の第 1 世代よりも無増悪生存期間を有意に延長し注目されているため、さらにダコミチニブ耐性機序の研究も行った。171 個のダコミチニブ耐性クローンを樹立して解析した結果、T790M 以外に C797S も起こりうるということがわかった。そしてこれらには第 3、第 1 世代阻害剤がそれぞれ有効であった (Kobayashi et al. J Thorac Oncol)。

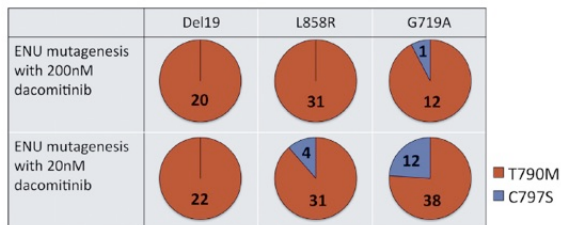


図 4. ダコミチニブ耐性二次変異の頻度

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 4 件)

- ① Kobayashi Y, Fujino T, Nishino M, Koga T, Chiba M, Sesumi Y, Ohara S, Shimoji M, Tomizawa K, Takemoto T, Mitsudomi T. EGFR T790M and C797S mutations as mechanisms of acquired resistance to dacomitinib. *Journal of Thoracic Oncology*. epub ahead of print on Feb 8, 2018.
doi: 10.1016/j.jtho.2018.01.009. 査読あり
- ② Kobayashi Y, Azuma K, Nagai H, Kim YH, Togashi Y, Sesumi Y, Chiba M, Shimoji M, Sato K, Tomizawa K, Takemoto T, Nishio K, and Mitsudomi T. Characterization of EGFR T790M, L792F, and C797S mutations as mechanisms of acquired resistance to afatinib in lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* (2017) 16: 357-364.
doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0407. 査読あり
- ③ 小林祥久、光富徹哉: ALK 遺伝子転座陽性例への薬物療法-治療開始からラストラインまで。臨床腫瘍プラクティス、2017 年、13 巻、16-20. 査読なし
- ④ Kobayashi Y, Mitsudomi T. Not all EGFR mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Science* (2016) 107: 1179-1186.
doi: 10.1111/cas.12996. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kobayashi Y. Molecular targeted therapy for EGFR mutant lung cancer: mutation-specific drug selection. The Satellite Symposium of Biological Session of Japan Nucleic Acid Therapeutics, 2017 年 11 月 18 日、甲南大学先端生命工学研究所 (兵庫県・神戸市)
- ② Kobayashi Y, Fujino T, Nishino M, Ohara S, Sesumi Y, Chiba M, Shimoji M, Tomizawa K, Takemoto T, Mitsudomi T. Mechanisms of acquired resistance to dacomitinib in cell models. World Conference on Lung Cancer, 2017 年 10 月 18 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ③ 小林祥久、東 公一、永井 宏樹、金 永学、富樫 庸介、瀬角 裕一、西野 将矢、佐藤 克明、千葉 真人、下治 正樹、富沢 健二、武本 智樹、西尾 和人、光富 徹哉。アファチニブ獲得耐性機序としての EGFR 二次変異 T790M、L792F、C797S の特徴。第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016 年 12 月 20 日、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)
- ④ Kobayashi Y, Azuma K, Nagai H, Kim YH, Togashi Y, Sesumi Y, Chiba M, Shimoji M, Sato K, Tomizawa K, Takemoto T, Nishio K, and Mitsudomi T. EGFR T790M, L792F, and C797S Mutations as Mechanisms of Acquired Resistance to Afatinib. World Conference on Lung Cancer, 2016 年 12 月 7 日、Messe Wien Exhibition and Congress Center (Vienna・Austria)

[図書] (計 1 件)

- ① 小林祥久、光富徹哉: コンパニオン診断薬と現場の問題点について教えてください P42-46. 最適使用推進ガイドラインについて教えてください P326-329. 肺癌診療 Q&A 第 3 版 一つ上に行く診療の実践、2017 年、中外医学社。査読なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 祥久 (KOBAYASHI, Yoshihisa)
近畿大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30734628

(2) 研究分担者

研究者番号： ()

(3) 連携研究者 ()

研究者番号： ()

(4) 研究協力者 ()