

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09285

研究課題名(和文) HER2異常肺癌に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment strategy for HER2-altered lung cancer

研究代表者

宗 淳一 (Soh, Junichi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90559890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：複数のHER2標的薬について、肺癌・胃癌・乳癌細胞株を用いた感受性試験・獲得耐性の機序に関する検討を行い、その成果を複数の英文論文で報告した。さらに、新規HER阻害剤タルロキシニブの感受性を確認し、HER2変異を導入したBa/F3細胞を用いて、耐性化に関する新たな変異HER2 exon C805S変異を突き止め、英文論文報告した。また、肺扁平上皮癌患者におけるEGFR/HER2阻害剤アファチニブの有用性を検証したLUX-Lung8試験で同定された、アファチニブ感受性がある新たなHER2変異スペクトルをBa/F3細胞株に導入し、その病原性・薬剤感受性を検討し、英文論文報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HER2異常肺癌の頻度は5%程度であるが、HER2異常は複数の癌腫で認められ、HER2標的療法は個別化治療として期待される。HER2異常スペクトル別にHER2標的薬の効果とその獲得耐性の克服を検討することで、HER2異常肺癌に対するプレシジョン・メディシンの確立を目指した基礎的検討を実施した。HER2異常細胞株を用いて、複数のHER2標的薬の効果を検討し、長期暴露による薬剤耐性株や人工的なHER2変異導入細胞株の樹立により、耐性機序の解明とその治療法の開発を行い、複数の報告を行っている。

研究成果の概要(英文)：We conducted sensitivity testing and investigated the mechanism of acquired resistance using lung, gastric, and breast cancer cell lines for several HER2-targeting agents, and reported the results in several English papers. In addition, we confirmed the sensitivity of a novel HER inhibitor, Tarloxotinib, and identified a new resistance-related mutation, HER2 exon C805S, involved in resistance using Ba/F3 cells transfected with HER2 mutation, which was reported in an English paper. A new afatinib-sensitive HER2 mutation spectrum identified in the LUX-Lung8 study, which evaluated the efficacy of the EGFR/HER2 inhibitor afatinib in patients with squamous cell lung cancer, was introduced into the Ba/F3 cell line and its pathogenicity and drug sensitivity were investigated and reported in an English paper.

研究分野：呼吸器外科、肺癌分子生物学

キーワード：HER2 肺癌 薬剤耐性 ERBB2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

臨床検体の大規模な遺伝子解析が行われ、頻度は低いものの癌のドライバー異常が多く発見されている。一方、臨床的意義が明らかでない異常も多い。HER2 異常は、乳癌・胃癌で遺伝子増幅の頻度が比較的高く、HER2 標的療法が保険収載される。肺癌での頻度は 5%程度と低く、肺癌に対する HER2 標的療法の有効性は十分検討されていない。HER2 異常は膀胱癌・大腸癌など多くの悪性腫瘍で認められるが、治療標的となり得るかは不明である。申請者らは、これまで肺癌における新規 HER2 異常の発見と HER2 標的薬の効果、乳癌・胃癌での HER2 標的薬の効果と耐性化の研究を行い、HER2 標的療法には、HER2 異常の多様性を考慮した治療法の確立、治療による獲得耐性の克服、が必要であることを実感している

## 2. 研究の目的

本研究では、治療法が確立されていない HER2 異常肺癌に対するきめ細かな治療法の確立に向けた基礎的検討を実施し、肺癌の治療成績の改善につながるプレジジョン・メディシンの実現を目指す。なお、申請者らの経験 (Yamamoto H ら:Oncologist, 2018) では、この知見は肺癌にとどまらず、HER2 異常を有する臓器を超えた様々な癌腫に適応できる可能性があり、本邦の死因の第一である癌に対する治療成績の改善に寄与することが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) HER2 異常タイプ別の HER2 標的薬の効果の検討 (in vitro & vivo):

HER2 異常肺癌細胞株 (G776VC 変異 H1781; 増幅 H2170, Calu3) HER2 増幅乳癌 (BT-474)・胃癌 (NUGC4・N87) 細胞株、正常気道上皮細胞株 (BEAS-2B) BALB/c 系統マウス由来の IL-3 依存性細胞株 (Ba/F3) を使用する。HER2 変異の種類については、研究協力者である米国スローンケタリング癌センターの Ladanyi 教授が主導する癌の網羅的遺伝子解析プロジェクト (MSK-IMPACT) のデータ、公共データベース (TCGA 等) を参考に、HER2 の複数変異 (co-mutation) も含め、頻度が高い変異を優先的に検討する。(in vitro) HER2 野生型・各 HER2 変異の発現ベクターを導入した BEAS-2B 細胞・Ba/F3 細胞を作成する。上記 HER2 異常細胞株に対する各 HER2 標的薬の効果と併用効果を MTT アッセイにより検討する。効果不良株に対しては、各分子標的薬との併用効果を検討する。(in vivo) マウス Xenograft モデルを作成し、HER2 標的薬単剤、および他薬との併用効果を in vivo で検討する。

### (2) HER2 標的薬耐性細胞株の樹立とオミックス解析による耐性機序の解明:

HER2 異常細胞株に対して、我々が確立した薬剤曝露法である Step-wise 法、High-dose 法により各 HER2 標的薬を曝露し耐性細胞株を作成する。乳癌の抗 HER2 抗体療法の耐性機序として、不完全な HER2 不活化、MET/IGF1R 等の側副経路活性化、PI3K/Akt/mTOR 活性化、などが報告されている。HER2 チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の耐性機序は一部の薬剤に対するゲートキーパー変異以外あまり知られていないが、同じ HER ファミリーの EGFR-TKI の肺癌における耐性機序として、MET などの側副経路活性化、形質変化 (EMT 形質獲得・幹細胞特性)、染色体異常などが報告されている。耐性細胞株の耐性機序が不明であれば、次世代シーケンサー (DNA/RNA 異常) SNP アレイ (遺伝子増幅・欠失) mRNA 発現アレイ、リン酸化アレイによるオミックス解析により親株と耐性細胞株を比較検討し、耐性機序同定に繋げる。同定した原因については、原因に応じた方法で対応し、対応後の薬剤感受性の回復を検証する。さらに、同定した遺伝子異常について、臨床検体を用いて、その頻度などを確認する。

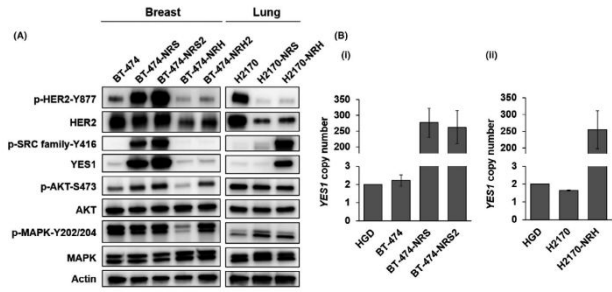
### (3) 獲得耐性例の治療法および耐性例出現の抑制法の開発:

耐性原因に対する標的薬が存在する場合は、単剤および他剤との併用によりその効果を評価する。耐性原因が不明の場合は、有効な既存薬を推測し、その効果を検証する。同定した薬剤については、単剤および併用療法の最適な投与濃度・投与タイミング・有害事象などを in vitro&vivo で検討する。HER2 標的療法において、耐性化出現の抑制や時期の延長も重要な治療戦略となる。種類の異なる HER2 標的薬の併用、同定した耐性化に有効な薬剤と HER2 標的薬の併用、などを行い、HER2 標的薬単独と比較して、耐性獲得までの時期を検討する。HER2 ノックインマウスや細胞株マウス Xenograft モデルでも、単剤と併用療法を比較し、マウスの生存期間・有害事象などを検討する。

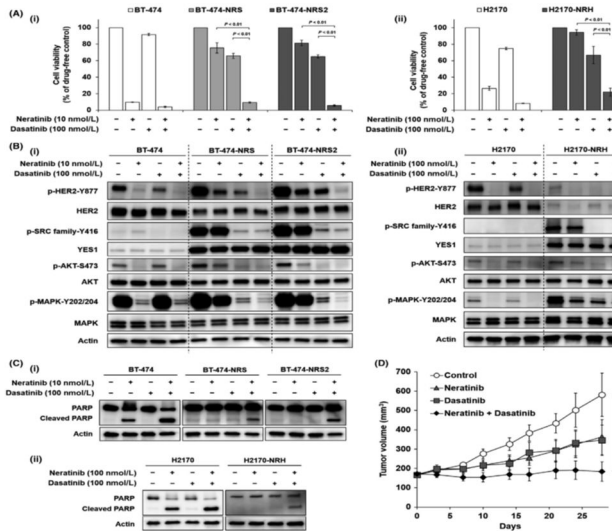
## 4. 研究成果

- (1) Takeda T et al., YES1 activation induces acquired resistance to neratinib in HER2-amplified breast and lung cancers Cancer Sci 2019;111:849-856

乳癌 (BT-474)・肺癌 (H2170) HER2 異常細胞株を用いて、分子標的薬である Neratinib を長期間様々な条件で暴露させ、薬剤耐性株を樹立した (BT-474-NR、H2170-NR)。また、獲得耐性株について、耐性化の要因の検討し、SRC ファミリー分子の一つである YES1 遺伝子が耐性獲得後に増幅する細胞株を認めた (右上図)。



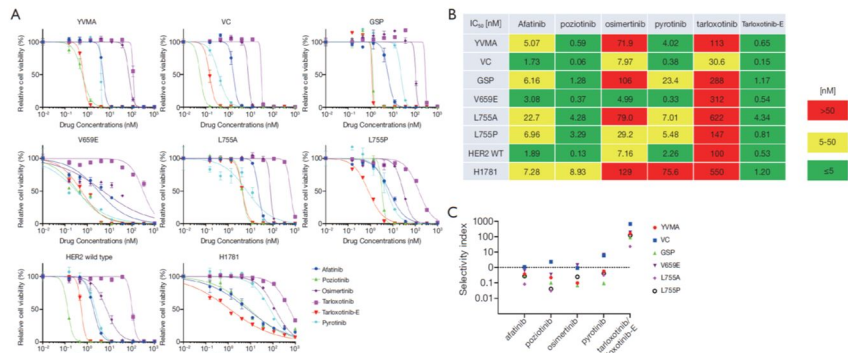
siRNA を用いて YES1 発現の Knockdown を用いたところ、Neratinib に対する耐性株の感受性が改善し、HER2、AKT、MAPK などのシグナル分子の downregulation<sup>^</sup>を引き起こした。



次に SRC 阻害剤である Dasatinib を用いたところ、Neratinib に対する耐性株の感受性が改善し、HER2、AKT、MAPK などのシグナル分子の downregulation<sup>^</sup>を引き起こし、マウスモデルにおいて、Dasatinib と Neratinib の併用療法は、耐性株に対して抗腫瘍効果を示した (右下図)。これらの結果により、YES1 遺伝子が HER2 標的療法に対する獲得耐性の一因である可能性が示唆され、Dasatinib の併用により獲得耐性を克服できる可能性が示唆された。

(2) Koga T et al., Activity and mechanism of acquired resistance to tarloxotinib in

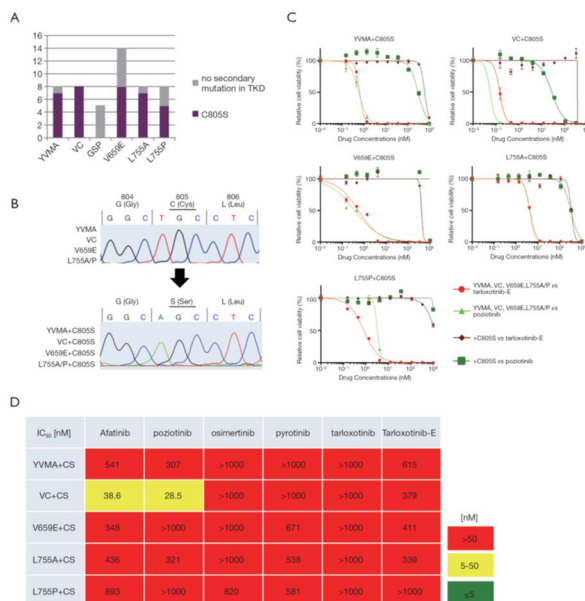
HER2 mutant lung cancer: an in vitro study Transl Lung Cancer Res 2021;10:3659-3570



新規汎HER阻害剤である Tarloxotinib を用いて、変異型 HER2 と野生型 HER2 の発現ベクターをそれぞれ導入した Ba/F3 細胞株や、

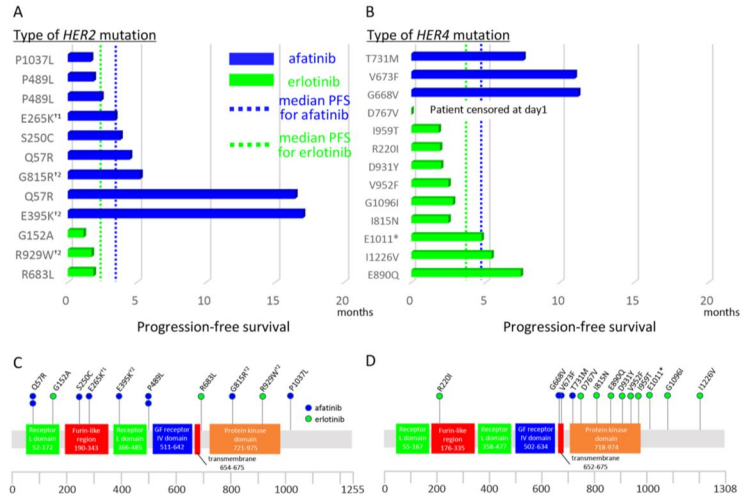
HER2 変異陽性肺癌細胞株 H1781 に対する感受性を評価した (右上図)。

前述の Ba/F3 細胞株と H1781 細胞株を N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) に曝露させて、人工的にランダムに遺伝子変異を惹起させた後に、Tarloxotinib 長期間暴露させて残存した薬剤耐性クローンの HER2 遺伝子変異を検索することで、薬剤耐性に関わる HER2 遺伝子変異として、HER2 exon20 の C805S 変異を同定した (右下図)。H1781 細胞株を長期間 Tarloxotinib に曝露させて樹立した獲得耐性株の発現を調べたところ、HER3 遺伝子が耐性を獲得する前より高発現していた。以上より、Tarloxotinib は HER2 変異陽性細胞に対して感受性を示すこと、また、HER2 exon20 C805S 変異や HER3 高発現が、Tarloxotinib 耐性化への関与していることが示唆された。



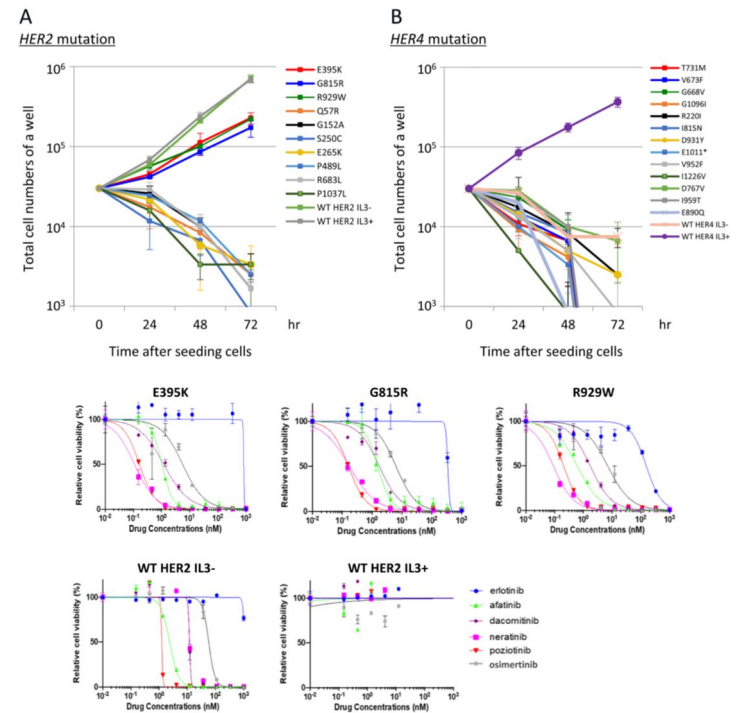
(3) Hamada A et al., In vitro validation study of HER2 and HER4 mutations identified in an adhoc secondary analysis of the LUX-Lung 8 randomized clinical trial Lung Cancer 2021;162:79-85

転移性扁平上皮肺癌に対して、AfatinibとErlotinibの治療効果を比較検証した第Ⅲ相国際共同治験 LUX-Lung 8 試験において、HER2/HER4 遺伝子変異が、Afatinib の治療成績に参与している可能性が示唆された(右上図)。



本研究では、LUX-Lung 8 試験で同定された HER2/HER4 遺伝子変異および病原性が不明な HER2 変異スペクトルのベクターをそれぞれ導入した Ba/F3 細胞株について、インターロイキン 3 (IL-3) 非存在下での増殖の有無により、遺伝子変異の病原性を評価した。HER2 E395K、G815R、R929W 変異を導入した Ba/F3 は、IL-3 非存在下

でも増殖し、Afatinib を含む第 2/3 世代汎 HER チロシンキナーゼ阻害剤は高い感受性を示した(右下図)。以上より、LUX-Lung 8 試験で同定された HER2/4 変異のほとんどは病原性がないが、一部の扁平上皮癌はまれな HER2 変異が原因となっており、第 2/3 世代汎 HER チロシンキナーゼ阻害剤が有効である可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takeda, T. Yamamoto, H. Suzawa, K. Tomida, S. Miyauchi, S. Araki, K. Nakata, K. Miura, A. Namba, K. Shien, K. Soh, J. Shien, T. Kitamura, Y. Sendo, T. Toyooka, S. | 4. 巻<br>111             |
| 2. 論文標題<br>YES1 activation induces acquired resistance to neratinib in HER2-amplified breast and lung cancers  | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Sci   | 6. 最初と最後の頁<br>849-856   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/cas.14289   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Yoshioka, T. Shien, K. Takeda, T. Takahashi, Y. Kurihara, E. Ogoshi, Y. Namba, K. Torigoe, H. Sato, H. Tomida, S. Yamamoto, H. Soh, J. Fujiwara, T. Toyooka, S.    | 4. 巻<br>110             |
| 2. 論文標題<br>Acquired resistance mechanisms to afatinib in HER2-amplified gastric cancer cells   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Sci   | 6. 最初と最後の頁<br>2549-2557 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/cas.14089   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Hamada, A. Suda, K. Koga, T. Fujino, T. Nishino, M. Ohara, S. Chiba, M. Shimoji, M. Takemoto, T. Soh, J. Uchida, T. Mitsudomi, T.                                  | 4. 巻<br>162             |
| 2. 論文標題<br>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<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Lung Cancer  | 6. 最初と最後の頁<br>79-85     |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.lungcan.2021.10.014   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Koga, T. Suda, K. Nishino, M. Fujino, T. Ohara, S. Hamada, A. Soh, J. Tirunagaru, V. Vellanki, A. Doebele, R. C. Mitsudomi, T.                                     | 4. 巻<br>10              |
| 2. 論文標題<br>Activity and mechanism of acquired resistance to tarloxotinib in HER2 mutant lung cancer: an in vitro study   | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Transl Lung Cancer Res   | 6. 最初と最後の頁<br>3659-3670 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.21037/tlcr-21-216  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>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<br>In Vitro Validation Study for HER2 Mutations in Squamous Cell Carcinoma as a Potential Predictive Factor Identified in Secondary Analysis of the LUX-Lung 8 Trial |
| 3. 学会等名<br>2020 World Conference on Lung Cancer (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 富田 秀太<br><br>(Tomida Shuta)<br><br>(10372111)      | 岡山大学・大学病院・准教授<br><br><br>(15301)     |    |
| 研究分担者 | 豊岡 伸一<br><br>(Toyooka Shinichi)<br><br>(30397880)  | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授<br><br><br>(15301) |    |
| 研究分担者 | 山本 寛斉<br><br>(Yamamoto Hiromasa)<br><br>(40467733) | 岡山大学・大学病院・講師<br><br><br>(15301)      |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 阪口 政清<br><br>(Sakaguchi Masakiyo)<br><br>(70379840) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授<br><br><br><br>(15301) |    |
| 研究分担者 | 光富 徹哉<br><br>(Mitsudomi Tetsuya)<br><br>(70209807)  | 近畿大学・医学部・教授<br><br><br><br>(34419)       |    |
| 研究分担者 | 須田 健一<br><br>(Suda Kenichi)<br><br>(30631593)       | 近畿大学・医学部・講師<br><br><br><br>(34419)       |    |
| 研究分担者 | 諏澤 憲<br><br>(Suzawa Ken)<br><br>(90839713)          | 岡山大学・大学病院・助教<br><br><br><br>(15301)      |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |