

EGFR 変異肺がんの薬剤耐性機序としての融合遺伝子の包括的研究 薬剤耐性の原因となっている融合遺伝子の見分け方と克服法を提唱

2022 年 10 月 7 日

国立研究開発法人国立がん研究センター

発表のポイント

- 日本人を含むアジア人の肺腺がんの半数に見られる EGFR 遺伝子変異のある肺がんにおいて、薬剤耐性の原因となる融合遺伝子を包括的に調べました。
- 遺伝子解析で検出される多くの融合遺伝子候補のうち、実際に薬剤耐性の原因となっているのは一部であり、その見分け方と克服するための有効な併用療法を細胞実験により提唱しました。
- 研究を進めることで、融合遺伝子によって薬剤耐性となった肺がんへの治療応用が期待されます。

概要

米国 Dana-Farber Cancer Institute (Dr. Pasi A. Jänne) と国立がん研究センター (理事長: 中釜 齊、所在地: 東京都中央区) 研究所 (所長: 間野博行) 分子病理分野 (研究員: 小林 祥久) を中心とした国際共同研究チームは、日本人を含むアジア人の肺腺がんの半数を占める EGFR 遺伝子変異のある肺がんの薬剤耐性機序としての融合遺伝子を包括的に調べ、実際に薬剤耐性の原因となっているものとそうでないもの見分け方と克服するための有効な併用療法を患者治療データと細胞実験データから提唱しました。研究成果は、英国時間 2022 年 9 月 24 日付 (日本時間 9 月 25 日) に国際学術誌「Nature Communications」に掲載されました。

進行期・再発の EGFR 遺伝子変異のある肺がんには、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤が標準治療となっていますが、約 1~2 年で薬剤耐性を獲得して効かなくなってしまうことが問題です。耐性機序の一つとして、EGFR 遺伝子以外の 2 つの遺伝子が融合して新たな融合遺伝子を形成する現象が見られます。融合遺伝子を正確に検出する方法は確立しておらず、また、どのように治療すれば良いか明らかになっていません。

本研究は、504 人の EGFR 遺伝子変異のある肺がん患者さんの DNA 検体を次世代シーケンサーで解析し、潜在的な融合遺伝子を包括的に調べました。①実際の患者さんの治療経過、②RNA シーケンス、③ゲノム編集細胞実験のデータを統合することで各融合遺伝子の役割を調べたところ、薬剤耐性としての機能をもつ融合遺伝子は一部でしかないことがわかりました。また、細胞実験から融合遺伝子に有効な併用療法、さらに併用療法に対する将来的な薬剤耐性機序とその克服法を明らかにしました。

今後さらに研究を進めることで、薬剤耐性の原因となっている融合遺伝子をどのように見つければ良いかと、それを克服するための治療への応用が期待されます。

背景

EGFR 遺伝子変異のある肺がんの薬剤耐性機序

肺がんは最も死亡者数の多いがん種です。肺腺がんのうち、日本人を含むアジア人の半数、欧米人の約 20%で EGFR 遺伝子の活性型変異が見られます。進行期及び再発の EGFR 遺伝子変異肺がんには、第三世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (オシメルチニブ)(注 1)が標準治療となっていますが、約 1~2 年で薬剤耐性を獲得して効かなくなってしまうことが問題です。これまでに薬剤耐性機序として、

- ① 薬剤結合ポケットの構造変化で薬が結合できない (例: EGFR C797S 二次変異)
- ② EGFR 遺伝子以外の他の発がん遺伝子の変異・遺伝子増幅・融合遺伝子からの発がんシグナルが出る
- ③ 腺がんから他の種類の病理組織への転換 (小細胞がん、扁平上皮がん)

などが報告されていますが研究段階で、その克服法として標準治療化されたものはまだ存在しません。

技術的に検出が難しい薬剤耐性機序としての融合遺伝子

DNA はエクソンとイントロンが交互に繰り返される配列をしています。DNA から mRNA に転写されてアミノ酸配列へと翻訳される過程の途中で、イントロンを除去してエクソンだけをつなぎ合わせるスプライシングが起こります。

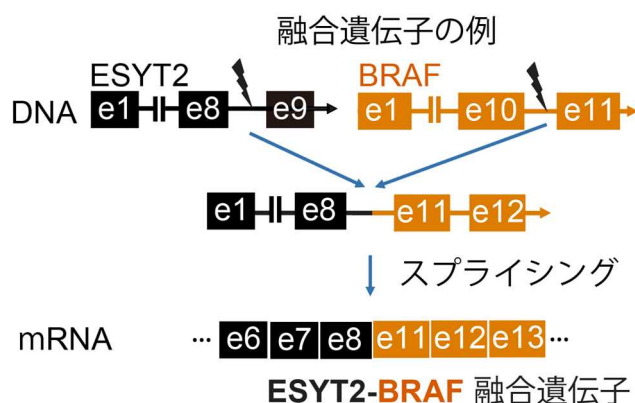


図 1 ESYT2-BRAF 融合遺伝子の例

エクソン (e)とエクソンの間のイントロンで DNA が切れて、別の遺伝子のイントロンとつながって融合遺伝子ができ、つなぎ目はスプライシングによって除去されます。ESYT2-BRAF 融合遺伝子では、BRAF 遺伝子の自己制御領域(e1 から e10 に含まれている)が ESYT2 遺伝子と置き換わっているためブレーキが効かず、発がんシグナルが生じ続けると考えられています。

融合遺伝子の多くは、その breakpoint (切断点)がイントロンに位置しています。DNA 配列を解析するための次世代シーケンサーの技術が発達してきていますが、特に以下の 2 つの理由から融合遺伝子の検出は技術的に困難なことが多いのが現状です。

- ① 患者さんの治療につながる遺伝子変異を検出するためのパネル (解析対象となる遺伝子領域のセット)には、あらかじめエクソンのホットスポット変異(注 2)が標的として設定されており、イントロンは標的に含まれていないことが多い。
- ② イントロンには繰り返し配列が散見され、次世代シーケンサーで読まれた 100~200 塩基程度の長さの配列からどの遺伝子のイントロンの一部であるかを同定することが困難なことが多い。

研究成果

ポイント 1. 次世代シーケンサーで検出される融合遺伝子候補のうち、実際に薬剤耐性の原因となっているのはごく一部であることが判明しました。

まず、504人のEGFR遺伝子変異のある肺がん患者さんのDNA検体を次世代シーケンサー（あらかじめ設定されていない標的遺伝子も広く検出できるハイブリッドキャプチャー）で解析したところ、104種類の融合遺伝子候補が検出されました。がんに関連する遺伝子のタイプには、がんを引き起こす発がん遺伝子やがんを抑えるがん抑制遺伝子などがありますが、薬剤耐性を起こしやすく尚且つ薬剤で治療標的になりやすいという観点から、発がん遺伝子を含む融合遺伝子37個についてさらに解析を進めました。①実際の患者さんの治療経過、②スプライシングによってイントロンが除去された後のRNAを解析することで新規発がん融合遺伝子 *TMEM87A-RASGRF1* の発見に成功した実績のあるRNAシーケンス (Cooper# and Kobayashi# et al. *Clin Cancer Res* 2020 PMID: 32312893)(#は共筆頭著者)、③CRISPR-Cas9ゲノム編集細胞モデル (Kobayashi et al. *Nature* 2022 PMID: 35236983) (注3)を使った実験データの3つのアプローチを統合することで各融合遺伝子の役割を調べたところ、薬剤耐性としての機能をもつ融合遺伝子は一部でしかないとわかりました。

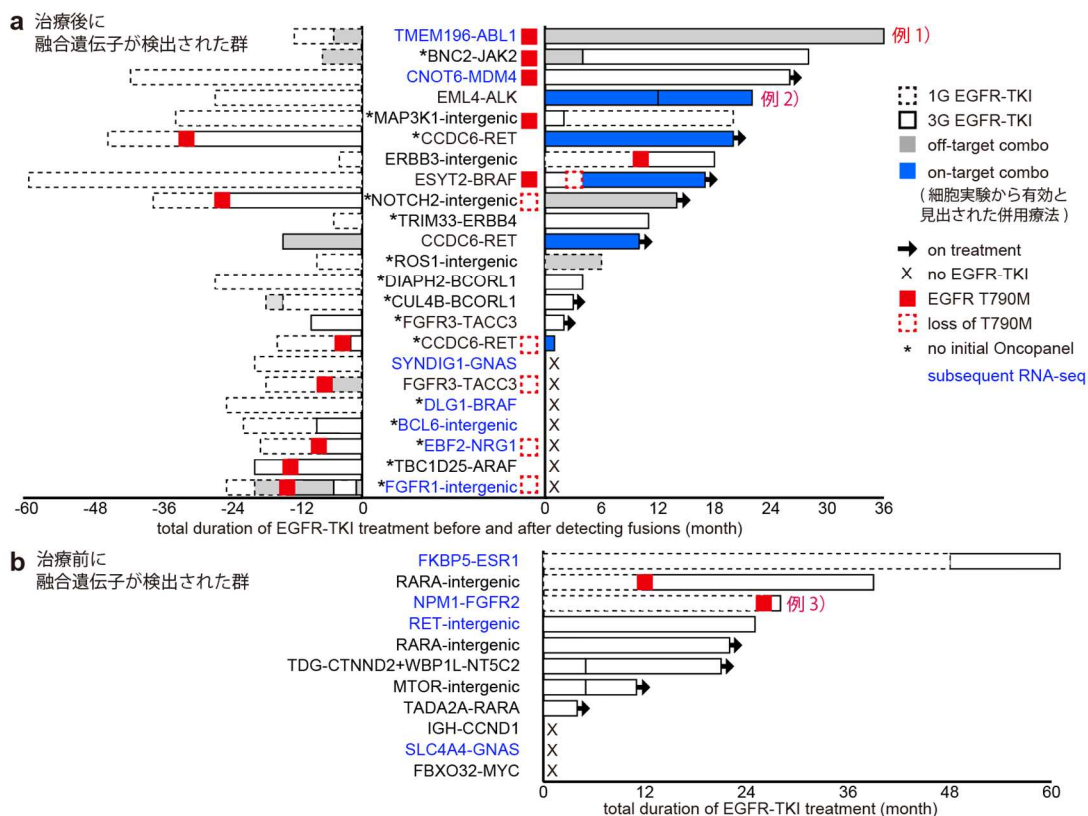


図2 発がん遺伝子を含む融合遺伝子が検出されたEGFR変異肺がん患者の治療経過

融合遺伝子が検出されたタイミングとその前後でEGFR阻害剤によって治療された期間のまとめ。

- 例1) *TMEM196-ABL1*: 第一世代EGFR阻害剤(1G EGFR-TKI)で1年治療後、白血病の原因として有名な *ABL1* 遺伝子を含む融合遺伝子が検出されたにもかかわらず、その後第三世代(3G)EGFR-TKIによる治療が3年続いたことから、この融合遺伝子には薬剤耐性の役割がないと判断できます。
- 例2) *EML4-ALK*: 1G EGFR-TKIで2年治療された後、*EML4-ALK* 融合遺伝子が検出され、細胞実験から見出されたEGFR阻害剤とALK阻害剤の併用療法(on-target combo注4)が2年間有効であったことから、この融合遺伝子は薬剤耐性の原因であったと判断できます。
- 例3) *NPM1-FGFR2*: 治療前からEGFR変異と一緒に発がん遺伝子 *FGFR2* を含む融合遺伝子が検出されたがEGFR-TKIが2年効いたことから、この融合遺伝子は薬剤耐性の役割がないと判断できます。

ポイント 2. 融合遺伝子の克服に有効な阻害剤と EGFR 阻害剤との併用療法、さらに併用療法に対する将来的な薬剤耐性機序とその克服法を明らかにしました。

EGFR 遺伝子変異のある肺がん患者さんが薬剤耐性として融合遺伝子を獲得した状況を模して、CRISPR ゲノム編集技術を応用することで EGFR 遺伝子変異のある肺がん細胞株から ESYT2-BRAF などの融合遺伝子を作成しました。これらのモデルは確かに EGFR 阻害剤に耐性となることを確認し、薬剤スクリーニングによってそれぞれの融合遺伝子に効く薬を同定しました。さらに、がんはあらゆる治療に対してさらなる薬剤耐性を獲得してしまうため、融合遺伝子に効く薬剤と EGFR 阻害剤の併用療法で長期間細胞モデルを培養することで薬剤耐性株を樹立し、その耐性機序を解析しました。がんは、①融合遺伝子側の耐性機序 (Fusion Side)、②EGFR 遺伝子側の耐性機序 (EGFR side)、③共通のシグナル経路の耐性機序 (Down stream)、④新規耐性機序 (Other)など様々な原因で耐性となることがわかりました。さらなる細胞実験により、これらの様々な耐性機序を克服するために有効な薬剤もそれぞれ同定しました。例えば、併用療法に対する耐性機序として ESYT2-BRAF 融合遺伝子の遺伝子増幅が起こった際は、BRAF 阻害剤ではなく MEK 阻害剤と EGFR 阻害剤の併用が有効であることを見出しました。

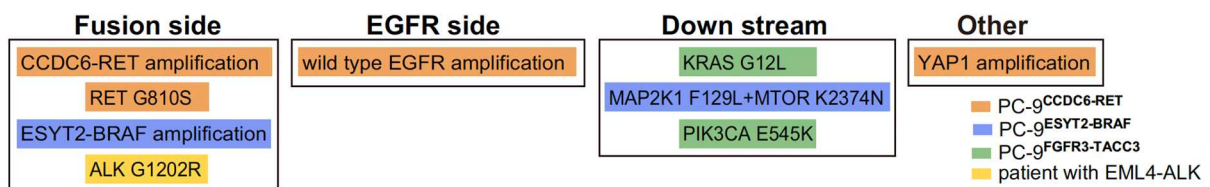


図 3 融合遺伝子に効く薬剤と EGFR 阻害剤の併用療法に対するさらなる薬剤耐性機序のまとめ

肺がん細胞株 PC-9 にゲノム編集でそれぞれの融合遺伝子 CCDC6-RET (オレンジ色)、ESYT2-BRAF (青色)、FGFR3-TACC3 (緑色)を作成した細胞モデルを、EGFR 阻害剤と各融合遺伝子に有効な薬の併用療法によって治療した後に出現した薬剤耐性機序の一覧です。実際の肺がん患者さんで (黄色)、EGFR 阻害剤による治療後に EML4-ALK 融合遺伝子を獲得して、EGFR 阻害剤と ALK 阻害剤の併用療法後にさらなる耐性機序として ALK G1202R 二次耐性変異が生じました。

展望

融合遺伝子という現象は複雑であるため、正しく検査で見つけること自体が困難です。しかし、本研究を含むこれまでの研究から、正しく見つけることができれば、ALK 阻害剤や RET 阻害剤などすでに保険承認されている薬と EGFR 阻害剤の併用療法が実際に患者さんのがんにも効くことが研究段階で示されています。本研究では、DNA を使った次世代シーケンス、RNA シーケンス、臨床情報、細胞実験など病院と研究所の総力戦で治療標的となる融合遺伝子の検出に挑みましたが、個々の患者さんに対して行うことは非現実的であるため、将来的には単一の検査で治療標的となる融合遺伝子を正しく検出できる方法の開発が求められます。さらに次のステップとして、その検査の結果に応じて有効な併用療法の効果を評価する臨床試験を行うことで、治療法の保険収載・実臨床での患者さんの治療につながるかと期待されます。融合遺伝子の克服には、研究・臨床の両方の面からのさらなる研究が必要です。

発表論文

雑誌名: *Nature Communications*

タイトル: Genomic and biological study of fusion genes as resistance mechanisms to EGFR inhibitors.

著者: Kobayashi Y, Oxnard GR, Cohen EF, Mahadevan NR, Alessi JV, Hung YP, Bertram AA, Heppner DE, Ribeiro MF, Sacardo KP, Saddi R, Macedo MP, Blasco RB, Li J, Kurppa KJ, Nguyen T, Voligny E, Ananda G, Chiarle R, Katz A, Tolstorukov MY, Sholl LM, Jänne PA.

DOI: 10.1038/s41467-022-33210-2.

URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-33210-2>

掲載日: 2022年9月24日(日本時間9月25日)

研究費

日本学術振興会 海外特別研究員(代表 小林祥久)

上原記念生命科学財団 海外リサーチフェローシップ(代表 小林祥久)

上原記念生命科学財団 研究奨励金(代表 小林祥久)

科研費若手研究 21K15581(代表 小林祥久)

AMED 革新的がん医療実用化研究事業 JP22ck0106699(代表 小林祥久)

SGH 財団 第33回 SGH がん研究助成(代表 小林祥久)

鈴木謙三記念医科学応用研究財団 令和3年度調査研究助成(代表 小林祥久)

用語解説

[注1] EGFR チロシンキナーゼ阻害剤

EGFR 遺伝子変異による異常な酵素の活性を抑えることで、がん細胞の増殖に関わるシグナル伝達を止めてがんの増殖を抑える薬剤です。現在標準治療として広く使われている薬剤は第三世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害薬と呼ばれ、第一世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の治療後に生じる EGFR T790M 二次耐性変異に対しても効果を発揮するように開発された薬剤です。

[注2] ホットスポット変異

遺伝子の変異のうち、高頻度に集中して生じるものを指します。

[注3] CRISPR-Cas9 ゲノム編集細胞モデル

CRISPR-Cas9 は、元々細菌がウイルスの侵入を排除するための自己防御(免疫)として備わっている機能です。このシステムを応用することで目的の遺伝子の DNA を切断して、任意の配列を挿入、置換、欠失することができる新しい遺伝子改変技術です。この本技術を応用してがん細胞の DNA を直接編集することで実験細胞モデルを構築しました。

同様のゲノム編集細胞モデルを活用した過去のプレスリリースもご参照ください。

2022年3月3日発表プレスリリース

最多の発がん遺伝子を標的とした治療応用に期待 RAS 遺伝子変異による発がんに関わる新たなメカニズムとその弱点を発見し核酸医薬による新規治療を提唱 —Nature 誌に論文発表—

https://www.ncc.go.jp/jp/information/pr_release/2022/0303/index.html

[注 4] on-target combo

EGFR 阻害剤と別の薬剤の併用療法のうち、細胞実験から融合遺伝子に効果があることを見出した薬剤を用いた組み合わせを指します。

報道関係からのお問い合わせ

- 研究に関するお問い合わせ

国立研究開発法人国立がん研究センター

研究所 分子病理分野

研究員 小林 祥久

電話番号：03-3542-2511(代表) Eメール：yoshikob@ncc.go.jp

- 広報窓口

国立研究開発法人国立がん研究センター

企画戦略局 広報企画室

電話番号：03-3542-2511(代表) Eメール：ncc-admin@ncc.go.jp