

## 169. 肺癌における TK 阻害剤耐性機序の解明と克服

杉尾 賢二

Key words : 肺癌, EGFR, EGFR-TKI,  
TK 阻害剤耐性, LKB1

大分大学 医学部 呼吸器・乳腺外科学

### 緒 言

肺癌は癌死亡の第一位を占め、予後向上のための新たな治療法の開発は急務である。近年の標的分子の探索と分子標的薬の開発は、特定の肺癌の治療成績を格段に向上させたが、耐性機序の解明とその克服が大きな課題である。上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR)<sup>1)</sup> チロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosin kinase inhibitor: TKI) や *EML4-ALK* TKI の耐性機序に関して、手術摘出試料や TKI 治療前後の肺癌組織試料を対象とし、ゲノミクスおよびエピジェネティクスの両面から解析した。そうすることで既知・未知の遺伝子異常や耐性機序の解明を行い、バイオマーカーを指標にした Biomarker Based Medicine を確立し、より安全で適切・確実な薬物療法を含めた肺癌の集学的治療を構築することが本研究の目的である。

また、我々は、粘液産生性肺癌における *LKB1* の意義について解析を行ってきた。*LKB1* 遺伝子変化は非小細胞肺癌の 10-30%にみられる異常で、*K-Ras* 遺伝子変異<sup>2)</sup>と併存することが知られている。また、*K-Ras* 変異と *LKB1* 不活化を伴う肺癌は悪性度が高く予後が悪いことが報告されている。一方で、*LKB1* 遺伝子変化を伴う非小細胞肺癌の組織亜型に関する報告は少ない。今回、粘液産生性肺癌におけるがん関連遺伝子の網羅的解析を計画し、粘液産生性肺癌における *LKB1* 変異の意義を検討した。

### 方法および結果

#### 1. 分子標的治療の EGFR-TKI 感受性と耐性機序に関する研究

EGFR 感受性変異症例の EGFR-TKI 耐性獲得の機序には、EGFR exon20 の T790M 変異を代表とする target alteration, *MET* 増幅などの bypass tracks, および小細胞癌への転化, などがある。EGFR-TKI 耐性獲得の機序の解明のために、*EGFR* 遺伝子変異陽性症例に対する EGFR-TKI による治療奏効症例について解析を行った。対象は、EGFR-TKI 治療における実施臨床および臨床試験 (EGFR-TKI の耐性機序にかかわるバイオマーカー探索に関する研究; 研究代表者-著者) から得られる手術標本や生検試料を用いる。臨床試験においては、TKI 治療前、治療後 PD 時、beyond PD 後の治療後に再燃が確認された時点での 3 ポイントでの組織検体を対象とする。今回、実施臨床から得られた TKI 耐性となった後の癌組織採取 (re-biopsy) を 5 例に施行し、解析を行った。EGFR-TKI 感受性変異は、exon19 deletion が 2 例、exon21 L858R が 3 例であった。耐性後の癌組織の解析により、耐性の機序は、target alteration である EGFR T790M が 2 例、小細胞癌への転化が 1 例、他の 2 例は新たな遺伝子変異などは認められず、耐性機序は不明であった。これらについては、今後、次世代シーケンサーを用いた targeted sequencing 解析やコピー数多型 (CNV) 解析を用いて、既知のがん関連遺伝子 (*EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *BRAF*, *MET*, *RET*, *ROS* など) の変異や融合遺伝子の検出を行う。また、次世代シーケンサーによる全ゲノム網羅的検索にて未知の変異遺伝子、融合遺伝子を検索し、耐性機序の解析を継続する予定である。

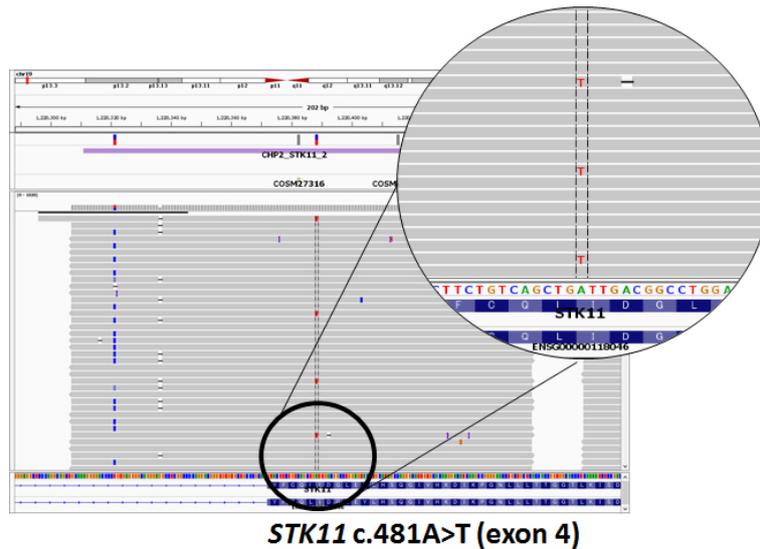


図1. 粘液産生性肺腺癌のがん関連遺伝子の targeted sequencing (Integrative Genomics Viewer).

ionAmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 によるがん関連遺伝子の targeted sequencing により, LKB1(STK11) 変異として exon4 の I161F (14.6%) が検出された。

## 2. 粘液産生性肺腺癌の発生に関与する遺伝子解析

2010年から2014年に外科切除された粘液産生性肺腺癌15例を対象とし, *K-Ras* の遺伝子変異を Scorpion ARMS 法で, *LKB1* の遺伝子変異を direct sequencing で解析することとした。このうち, 説明同意が取得され, 解析可能な症例においては, ionAmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 によるがん関連遺伝子の targeted sequencing を行った。さらに, 癌抑制遺伝子である *LKB1* の広汎な deletion や, homozygous deletion を検出するため, MLPA 法を用いたコピー数解析を予定した。また, *LKB1* の癌部における不活性化を解析するため, ウサギ抗ヒト *LKB1* 抗体を用いて, *LKB1* の蛋白発現についても検討した。

粘液産生性肺腺癌において, Scorpion-ARMS 法を用いた解析で *K-Ras* G12D 変異が証明された症例について, 癌遺伝子 50 種類の targeted sequencing を行った。その結果, *K-Ras* 変異 (19.4%) に加え, *LKB1* 変異 (I161F, 14.6%) が検出された (図1)。その他の 48 のがん関連遺伝子に有意な変異は検出されなかった。正常組織を対照としコピー数多型 (CNV) 解析を行ったところ, *FGFR3*, *NOTCH1*, *AKT1*, *LKB1* の 4 遺伝子においてコピー数の有意な相違を認め, それぞれ 1 copy に減少していると考えられた。特に, *LKB1* を含む 19p13.3 では, 16MB に及ぶ広範な欠失が推測された (表1)。Targeted sequencing のデータから推測されるコピー数変化に関しては, MLPA 法による確認を予定している。*LKB1* の免疫組織化学染色に関しては, *LKB1* 野生型の陽性対照を用いた予備実験で, *LKB1* 蛋白の染色強度が十分に得られておらず, 今後さらなる条件設定が必要である。

表 1. Ion Reporter 4.0 software による粘液産生性肺腺癌の正常部-腫瘍部比較 (Copy number variation: CNV 解析)

| Type | Gene Sym               | CytoBand                            | Length      | Copy Number |
|------|------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|
| CNV  | FGFR3                  | 4p16.3<br>(1803551-1809006)         | 5.455kb     | 1           |
| CNV  | NOTCH1                 | 9q34.3<br>(139390764-139399447)     | 8.683kb     | 1           |
| CNV  | AKT1                   | 14q32.33<br>(105241433-105246583)   | 5.15kb      | 1           |
| CNV  | STK11<br>GNA11<br>JAK3 | 19p13.3p13.11<br>(1206977-17954225) | 16747.248kb | 1           |

STK11 の locus を含む 19p13 の copy 数低下が示唆された。

## 考 察

EGFR-TKI 治療の獲得耐性に対して、同一症例から経時的に得られた生体試料の比較解析を、次世代シーケンサーを用いたゲノミクス解析およびエピジェネティクス解析にて網羅的に行うことにより、新たな耐性機序が明らかにされる可能性がある。本研究においては、従来の EGFR T790M の検出と小細胞癌への転化という耐性機序が得られた。しかし、新たな機序の検出は得られなかった。今後、次世代シーケンサーを用いた targeted sequencing 解析やコピー数多型 (CNV) 解析を用いて、既知のがん関連遺伝子の変異や融合遺伝子の検出により、未知の変異遺伝子、融合遺伝子を検索し、耐性機序の解析を継続する予定である。

一方、今回検出された *LKBI* の変異 I161F はキナーゼドメインの変異であるが、過去に報告がなく、またその役割も明らかでない。コピー数多型 (CNV) 解析でも *LKBI* を含む chr.19 の広範な LOH が推測されており、*LKBI* の不活性化に関与している可能性がある。今後、この遺伝子変異の持つ意義について解析予定である。また、残りの症例に関しても targeted sequencing によるがん関連遺伝子の網羅的解析を予定している。さらには、粘液産生性肺癌が画像上予想される肺癌症例について、術前に説明同意を取得し、CTOS 法により初代培養肺癌スフェロイドを樹立、*in vitro* における機能解析を行う予定である。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、大分大学医学部呼吸器・乳腺外科学講座の小副川敦および宮脇美千代である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Ohba, T., Toyokawa, G., Kometani, T., Nosaki, K., Yamaguchi, M., Hamatake, M., Hirai, F., Seto, T., Ichinose, Y. & Sugio, K. : The mutations of EGFR and K-ras genes in resected stage I lung adenocarcinoma and their clinical significance. *Surg. Today*, **44** : 478-486, 2014.
- 2) Morodomi, Y., Takenoyama, M., Inamasu, E., Toyozawa, R., Kojo, M., Toyokawa, G., Shiraiishi, Y., Takenaka, T., Hirai, F., Yamaguchi, M., Taguchi, K., Seto, T., Sugio, K. & Ichinose, Y. : Non-small cell lung cancer patients with EML4-ALK fusion gene are insensitive to cytotoxic chemotherapy. *Anticancer Res.*, **34** : 3825-3830, 2014.