

192. *MET* 遺伝子変異を有する肺腺癌治療戦略の検討

光富 徹哉

近畿大学 医学部 外科学講座 呼吸器外科部門

Key words : 肺がん, 分子標的治療, *MET*, *EGFR*

緒言

わが国における肺がんによる死亡数は増え続け、年間7万人以上である。肺がんはいまだに難治癌であり、治療法の確立が早急に求められている。*EGFR* や *ALK* などのドライバー遺伝子変異を有する肺腺癌に対する特異的チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は、従来のプラチナ併用化学療法に比べて有意な有効性をもたらし、予後の向上に大きく寄与した。しかし、日本人における *EGFR* 遺伝子変異頻度および *ALK* 遺伝子の転座頻度はそれぞれ、50%、5%程度であり新規の標的が強く求められている。これまでも *HER2* 遺伝子変異の分子標的としての可能性について検討をおこなってきた。

われわれは新しい分子標的としてエクソン14を異常スプライシングによって欠損する *MET* 遺伝子変異に注目し、以前肺腺癌の3%に存在することを報告した¹⁾。その後、症例報告として *MET* 阻害剤であるクリゾチニブによる奏効例が報告されているものの、未だ有効な *in-vitro* モデルが確立されておらず、有効性や耐性に関する機序は不明である。そこで、本研究では *MET* エクソン14欠失変異の *in-vitro* モデルを作製することを目的とした。

また、*EGFR* 遺伝子変異に関しては2004年発見以来多くの研究が行われてきたが、その対象の多くは約9割を占める common mutation (エクソン19欠失変異とエクソン21のL858R変異) である。しかし *EGFR* 変異にはいわゆる uncommon mutation といわれるまれな変異が多く存在していることが知られているが、それぞれの臨床的意義は十分明らかでない。そこで本研究ではあわせて、*EGFR* 遺伝子変異のうち4%を占め、臨床的意義が十分検討されていないエクソン18変異の有効な治療戦略を確立することもあわせて検討した。

方法、結果および考察

1. CRISPR/Cas9 システムを用いた *MET* エクソン14欠失変異モデルの作製²⁾

ゲノム編集システム CRISPR/Cas9 を用いてヒト胎児腎細胞 HEK293 の *MET* エクソン14の5'側および3'側のエクソン-イントロン境界を欠失させ、エクソン14のスプライスアウトをおこすようにした (図1A)。実際 exon13 と 15 にプライマーをおいて RT-PCR をおこなってエクソン14を欠失している二株を得た (図1B)。

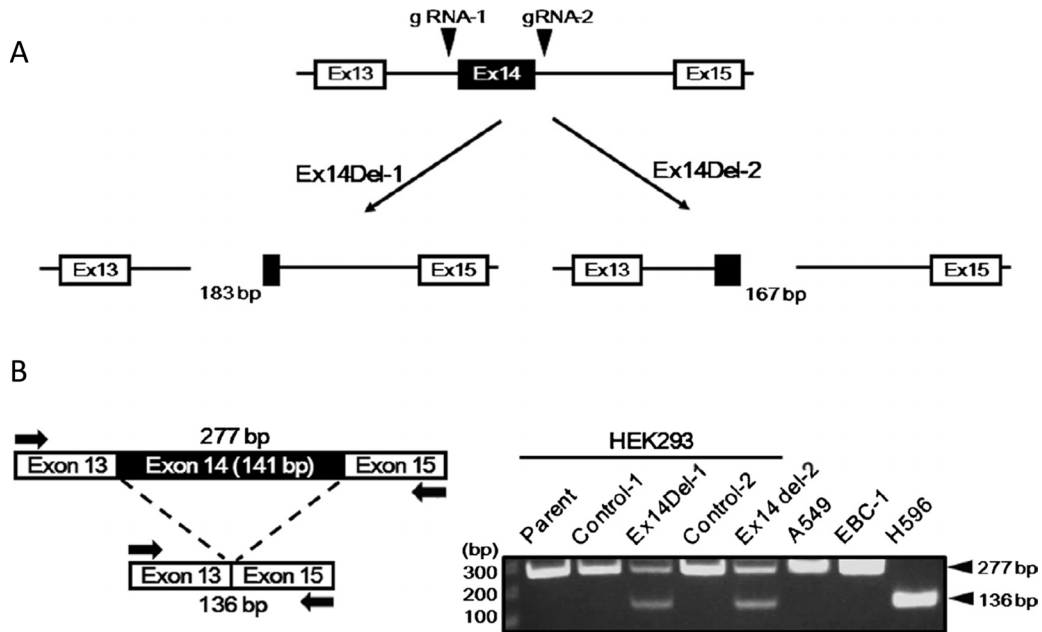


図1. CRISPR/Cas9 システムを用いた MET エクソン 14 の欠失

A) *MET* 遺伝子エクソン 14 欠失のための設計。B) エクソン 14 をはさむ RT-PCR のプライマーとその結果。136 bp がエクソン 14 欠失バンドである。

MTT アッセイでエクソン 14 欠失モデルとコントロール細胞の増殖速度を比較したところ、エクソン 14 欠失モデルの方が有意に速いことが示されたが ($p < 0.05$) (図 2A)、増殖速度の差はあまり期待したものではなかった。軟寒天中のコロニー形成能を比べたところエクソン 14 欠失モデルの方がコロニー形成能は明らかに増強していた (図 2B)。

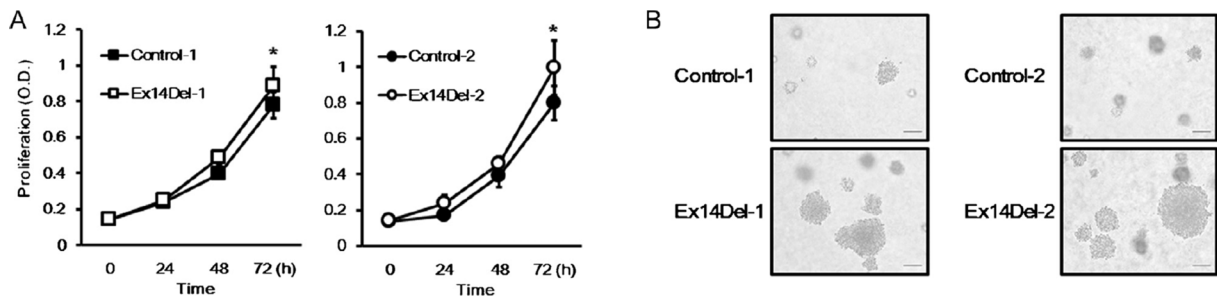


図2. exon14 欠失モデルの増殖能及びコロニー形成能

A) MTT アッセイによる増殖能の比較。 $p < 0.05$. B) 軟寒天アッセイによるコロニー形成能の比較。スケールバーは $100 \mu\text{m}$ 。

MET のリガンドである HGF の刺激がない状態でも、コントロールに比べてわずかにリン酸化 MET の発現上昇がみられた。さらに、HGF による刺激後、エクソン 14 のため正常より少し小さいリン酸化 MET 及びその下流のリン酸化 ERK の発現が持続することがわかった (図 3)。

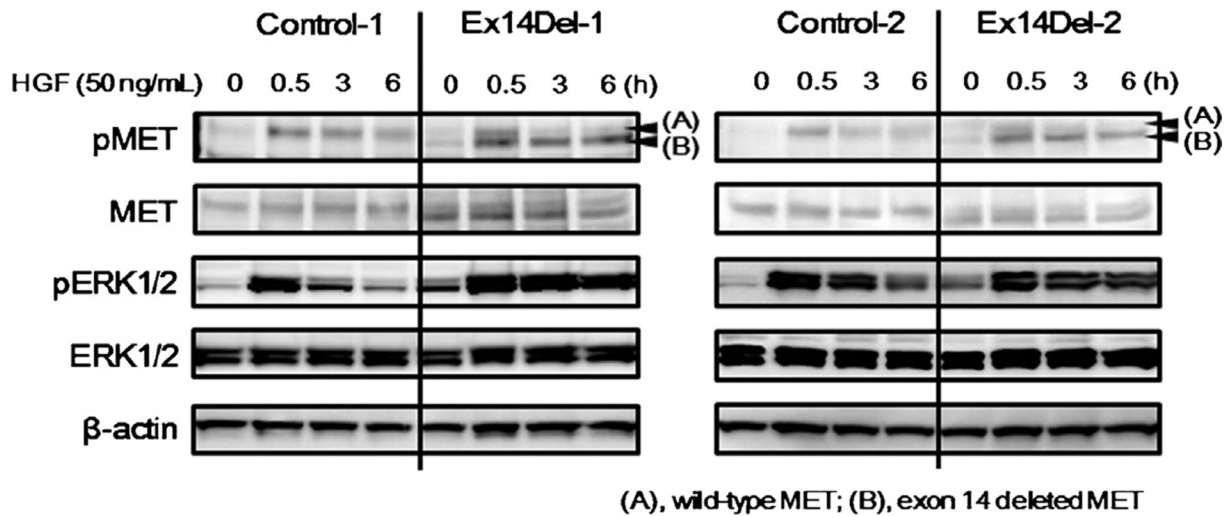


図3. HGF 刺激の有無に対するリン酸化 MET 及び ERK のウェスタンブロット

50 ng/ml の HGF (hepatocyte growth factor) を加えた後の経時的な MET、ERK リン酸化の変化を示す。control と比してサイズの小さい MET バンドがみられしかもリン酸化がよりおこっていることが示されている。

次にこれらの細胞を MET 阻害剤であるクリゾチニブで処理したところ、エクソン 14 欠失株は対照株とくらべて高い感受性を示し、下流分子もその所見を支持した (図 4)。

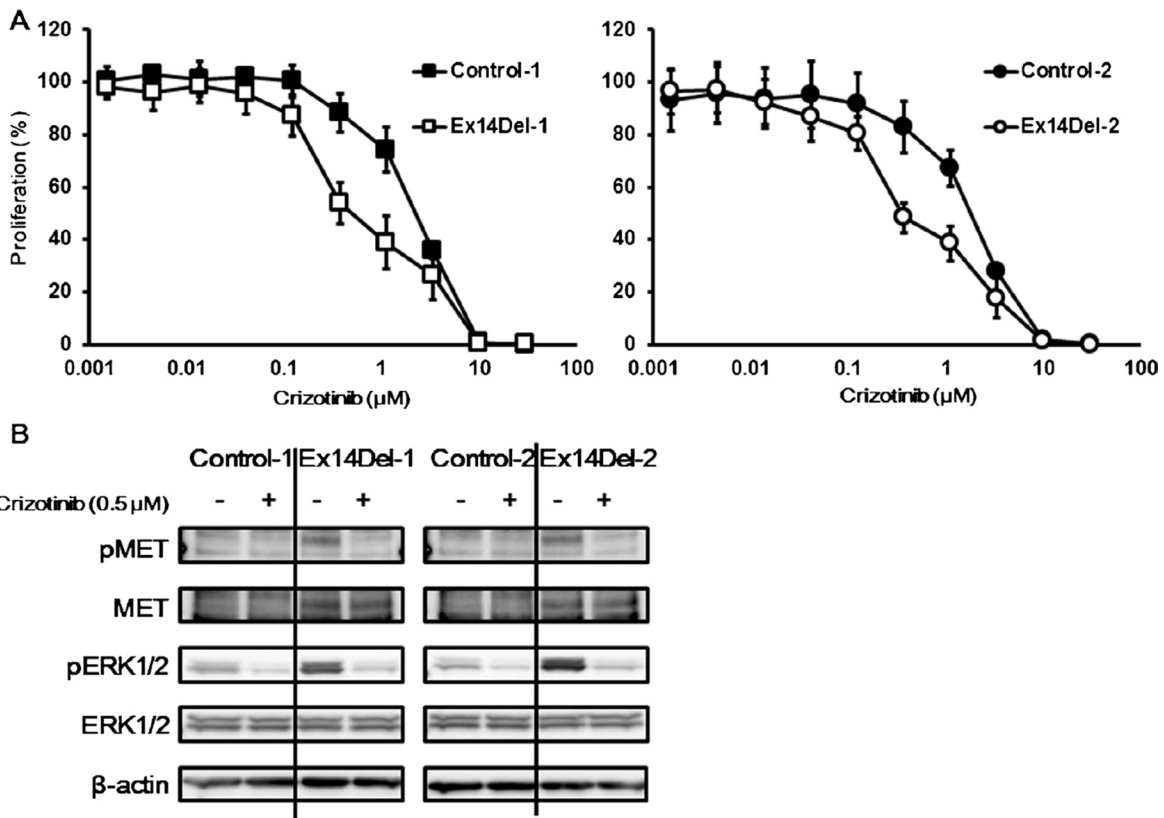


図4. MET 阻害剤であるクリゾチニブの効果

A) MTT アッセイによる MET 阻害剤であるクリゾチニブの濃度感受性。exon14 欠失株は感受性が高い。IC50 値は Ex14Del1 で 0.49、対照 2.23、Ex14Del2 で 0.35、対照 1.79 μM であった。B) METexon14 株においてクリゾチニブはリン酸化 MET 及びリン酸化 ERK をより強く抑制している。

しかし、いわゆる oncogene addiction の程度は十分高いとはいえ、更なる検討を要する。後述する Ba/F3 細胞を用いた実験モデルの構築により、耐性機序を含めたさらなる研究を試みる。

2. EGFR エクソン 18 変異導入 Ba/F3 細胞モデルを用いた網羅的感受性試験³⁾

EGFR エクソン 18 変異のうち代表的な 3 つの変異 G719A、E709K、Del18 (delE709_T710insD) をマウスのプロ B 細胞 Ba/F3 に遺伝子導入した。Ba/F3 細胞の生存はインターロイキン-3 (IL-3) に依存しているが、これらの変異を導入した細胞は IL-3 なしでも増殖し続けた。また、接触阻害作用をもつ NIH-3T3 細胞にもこれらの変異を導入したところ、コロニーを形成した。これらのことから、G719A、E709K と Del18 が確かに腫瘍原性をもつことが示された (図 5)。

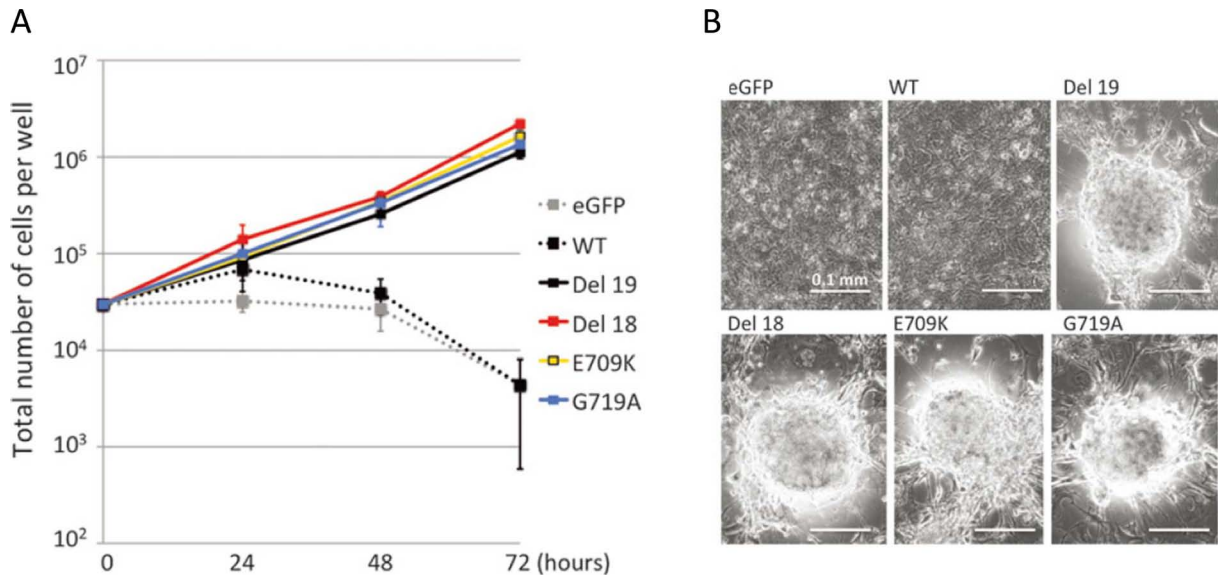


図5. EGFR エクソン 18 変異の腫瘍原性

A) インターロイキン 3 なしでの変異導入 Ba/F3 細胞数の推移。B) 変異導入 NIH-3T3 細胞の 21 日目の写真。スケールバーは 0.1 mm。

第一世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) のゲフィチニブ、エルロチニブ、不可逆的 pan-HER 阻害剤である第二世代 TKI のアファチニブ、ダコミチニブ、ネラチニブ、T790M 変異選択的な第三世代 TKI のオシメルチニブ (AZD9291)、ロシレチニブ (CO1686) の計 7 種類に対する 90 % 増殖阻害濃度 (IC90) を網羅的に調べた。最も感受性の高い変異であるエクソン 19 欠失変異と比較して、エクソン 18 変異は第一世代や第三世代 TKI に対しては IC50 が 11-50 倍と著明に高かったが、第二世代 TKI のアファチニブに対してはわずか 3-7 倍の差しかなく、実臨床で十分到達できる薬物血中濃度であった。さらに、ネラチニブに関してはむしろ Del19 よりも G719A と E709K の方が 5-25 倍効きやすいという逆の傾向がみられた (図 6)。

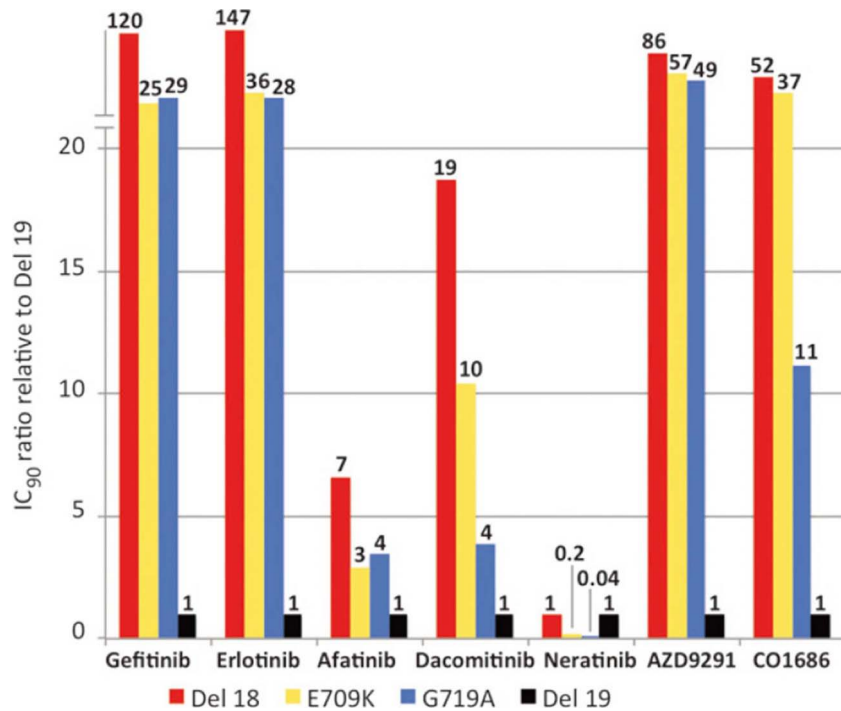


図6. 変異導入細胞 Ba/F3 細胞の各種 EGFR-TKI に対する感受性

高感受性変異であるエクソン 19 欠失変異に対する各種エクソン 18 変異の IC90 比を各世代の EGFR-TKI 別にしめた。エクソン 18 に対しては neratinib、afatinib の効果が期待される。

また、変異導入 HEK293 細胞で行ったウェスタンブロットでも Ba/F3 細胞での感受性と一貫したリン酸化 EGFR の発現抑制が示された (図7)。

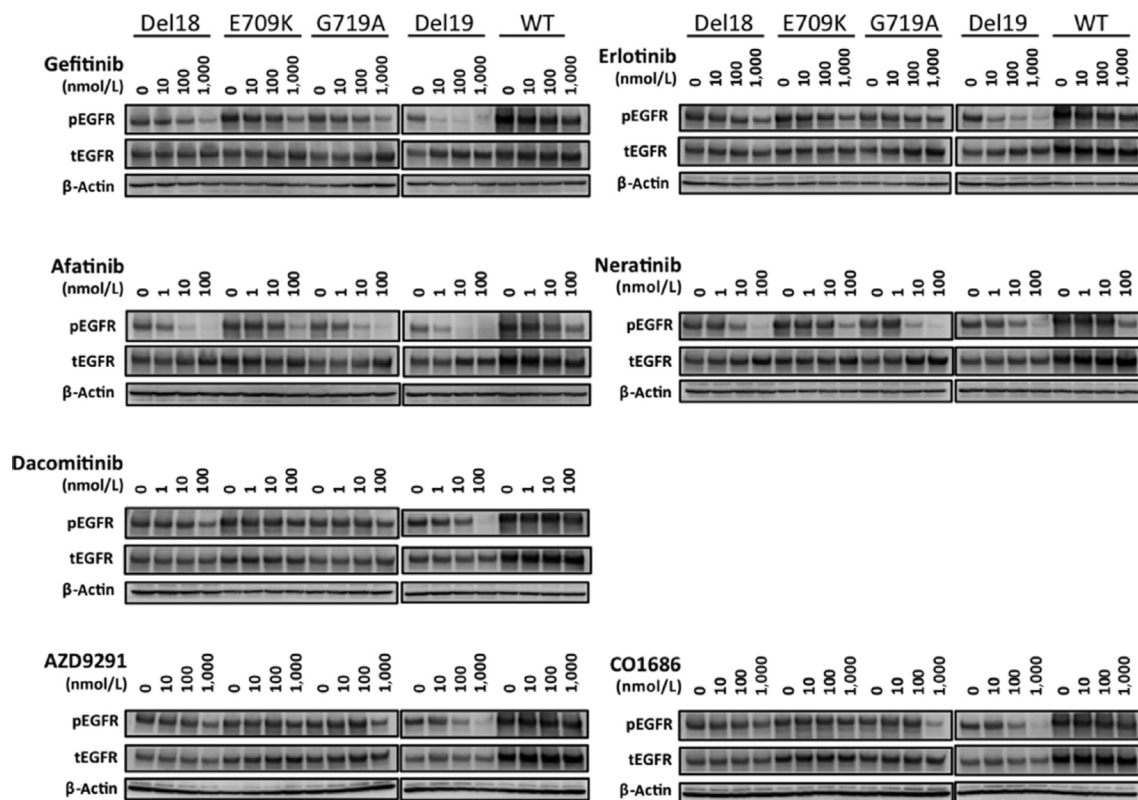


図7. 変異導入 HEK293 細胞におけるウェスタンブロット

各種変異株に各種 EGFR-TKI を処理した際の EGFR、リン酸化 EGFR の発現。エクソン 18 変異である Del18、E709K、G719A の EGFR リン酸化抑制効果は neratinib と afatinib で高いことが示されている。

また、自験例及び文献の臨床データをまとめると、エクソン 18 変異肺癌の第一世代 TKI に対する奏効率は 35-56 % 程度であるのに対して、アファチニブとネラチニブは約 80 % であることがわかり、我々の *in-vitro* のデータと一貫していた。残念ながらネラチニブに関しては、大多数を占める common mutation に奏効しないことから肺癌を対象とした臨床試験は進んでいない。そのため、エクソン 18 変異肺癌には現時点で既に投与可能なアファチニブが最も適切な選択肢であると考えられる。本研究の結果は、遺伝子変異の種類毎に適切な TKI を選択することの重要性を意味する。

共同研究者

本研究の共同研究者は、近畿大学医学部ゲノム生物学講座の富樫庸介、西尾和人、同外科学講座呼吸器外科部門の小林祥久である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂き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) Onozato R, Kosaka T, Kuwano H, Sekido Y, Yatabe Y, Mitsudomi T: Activation of MET by gene amplification or by splice mutations deleting the juxtamembrane domain in primary resected lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2009 Jan;4(1):5-11. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181913e0e. PMID: 19096300
- 2) Togashi Y, Mizuuchi H, Tomida S, Terashima M, Hayashi H, Nishio K, Mitsudomi T: MET gene exon 14 deletion created using the CRISPR/Cas9 system enhances cellular growth and sensitivity to a MET inhibitor. *Lung Cancer.* 2015 Dec;90(3):590-7. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.10.020. PMID: 26547802
- 3) Kobayashi Y, Togashi Y, Yatabe Y, Mizuuchi H, Jangchul P, Kondo C, Shimoji M, Sato K, Suda K, Tomizawa K, Takemoto T, Hida T, Nishio K, Mitsudomi T: EGFR exon 18 mutations in lung cancer: molecular predictors of augmented sensitivity to afatinib and neratinib as compared with first or third generation TKIs. *Clin Cancer Res.* 2015 Dec 1;21(23):5305-13. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1046. PMID: 26206867