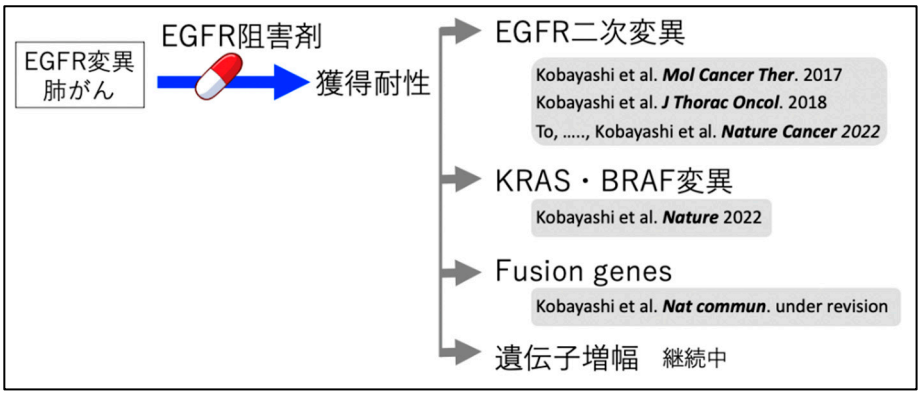
179　遺伝子増幅による薬剤耐性の機序解明と臨床応用	小林　祥久

【目的】肺がんは最も死亡者が多いがん種である。肺腺がんのうち日本人の 50%、欧米人の 20%に 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、特に第 3 世代オシメルチニブが著効する。しかし、一度効いても約 1〜2 年後に必ず耐性となり再増悪してしまうことが問題である。本研究は、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を応用して、薬剤耐性としての点変異・融合遺伝子・遺伝子増幅を持つモデルを作製することによってその機序解明と耐性の克服を目指す。

【方法】EGFR 活性型変異（exon 19 の欠失変異）のある肺腺がん細胞株 PC-9 から、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を応用して、内因性の *KRAS* 変異、*BRAF* 変異、*CCDC6* - *RET* や *ESYT2* - *BRAF* などの融合遺伝子をもつモデルを作製した。それぞれのモデルで薬剤感受性試験を行った。KRAS 変異に関しては、スプライシングを評価した。融合遺伝子については、有効な併用療法で治療を続けた後のさらなる耐性機序も解析した。

【結果】4 種類の *KRAS* 変異を持つモデルのうち G12C、G12D、A146T の 3 種類の変異は期待通り EGFR 阻害剤に対して耐性となったが、KRAS Q61K だけは予想外に薬剤耐性を起こさなかった。詳細な解析により、KRAS Q61K が薬剤耐性を引き起こすには隣のコドン G60 にアミノ酸が変化しないサイレント変異を伴うことが必須であり、その機序としてスプライシングが関わっていることを明らかにした。*CCDC6* - *RET* 融合遺伝子と *ESYT2* - *BRAF* 融合遺伝子を作製したモデルは EGFR 阻害剤に耐性となった。RET 阻害剤と EGFR 阻害剤の併用、MEK 阻害剤と EGFR 阻害剤の併用によってこれらの融合遺伝子による耐性を克服できることを見出した。さらに、これらの併用療法で長期間治療を続けると *CCDC6* - *RET* の遺伝子増幅と *ESYT2* - *BRAF* の遺伝子増幅、*YAP1* の遺伝子増幅、*EGFR* 野生型の遺伝子増幅など様々な遺伝子増幅が起こった。これらのことから、PC-9 モデルは薬剤耐性としての遺伝子増幅を起こしやすい特性を持っていると考えられた。その素因を明らかにするために、超低継代全ゲノムシークエンス (ULP-WGS) でゲノム上のどの領域に遺伝子増幅が起こったかを明らかにしながら、原因遺伝子の同定を継続中である。

EGFR 変異肺がんの主な薬剤耐性機序とその克服



179. 遺伝子増幅による薬剤耐性の機序解明と臨床応用

小林　祥久

国立がん研究センター 研究所 分子病理分野

Key words：肺がん，薬剤耐性，EGFR，KRAS

緒　言

肺がんは最も死亡者が多いがん種である。肺腺がんのうち日本人の 50%、欧米人の 20%に 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、特に第 3 世代オシメルチニブが著効する［1］。しかし、一度効いても約 1～2 年後に必ず耐性となり再増悪してしまうことが問題である。

報告者はこれまで、薬剤耐性機序としての EGFR 二次変異の克服法について研究してきた［2, 3］。また、CRISPR-Cas9 を応用して独自のゲノム編集モデルを構築し、肺がんを引き起こす新規融合遺伝子の MAPK 経路の活性化による腫瘍原性を示した［4］。

本研究では、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を薬剤耐性研究に応用して、薬剤耐性としての点変異・融合遺伝子・遺伝子増幅を持つモデルを作製した。これらのゲノム編集モデルから、根本的な機序解明に迫り耐性の克服を目指す。

薬剤耐性としての *KRAS* 変異を契機に、KRAS Q61K が薬剤耐性を引き起こすには隣のコドン G60 にアミノ酸が変化しないサイレント変異を伴うことが必須であり、その機序は異常なスプライシングから癌細胞が自己を守るためであることを明らかにした［5］。遺伝子増幅に関する研究は、機序解明につながる候補遺伝子の抽出を行い、現在も継続中である。

方法および結果

1.　KRAS Q61K は予想外に薬剤耐性を起こさない

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤オシメルチニブによって治療され、一度奏効した後に耐性を獲得した患者検体から、KRAS G12C、G12D、Q61K、A146T 及び BRAF V600E の変異が検出された。そこで、これらの変異の薬剤耐性としての意義を明らかにするために、EGFR 活性型変異（exon 19 の欠失変異）のある肺腺がん細胞株 PC-9 から、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を応用してこれらの変異を作製した。KRAS G12C、G12D、A146T 及び BRAF V600E 変異が導入されたシングルクローンは期待通り EGFR 阻害剤に対して耐性となったが、KRAS Q61K をもつクローンだけは予想外に全く耐性とならず、親株の PC-9 と同等の薬剤感受性であった（図 1）。

2.　KRAS Q61K の発がんには、異常なスプライシングから自己を守るために G60G サイレント変異が必須である

これまでに複数のがん種で発がん遺伝子変異として報告されてきた KRAS Q61K がなぜ耐性を示さないのかを明らかにするために、ゲノム編集をしたバルク細胞を EGFR 阻害剤で治療する過程の検体を次世代シーケンサーで解析した。すると、Q61K のすぐ隣の G60 にアミノ酸を変化させないサイレント変異を伴った場合のみ、薬剤耐性を引き起こすことが判明した（図 2a）。

なぜサイレント変異が必要なのかについて検証したところ、スプライシングに関与していることがわかった。*KRAS* 野生型のコドン 61 周辺の配列はエクソンとイントロン の境界に存在する splicing donor site のモチーフと非常によく似た配列をしており、そこに Q61K 変異が生じるとこの配列は完全に splicing donor site の配列と一致して、ここから異常なスプライシングが生じてしまいフレームシフトと早期終止コドンにより KRAS 発がん蛋白が機能しなくなる。Q61K だけでなく G60G サイレント変異も同時に生じさせることで、splicing donor site のモチーフを壊して異常

なスプライシングが生じなくなる（図 2b）[5]。

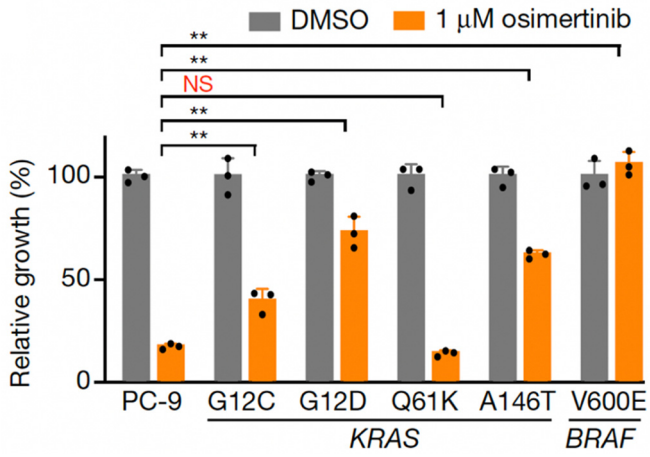


図 1. ゲノム編集 PC-9 モデルの EGFR 阻害剤オシメルチニブに対する薬剤感受性
1μM のオシメルチニブに 72 時間投与後の細胞増殖を CellTiter-Glo 試薬で評価した。
**p＜0.01、NS：not significant（student t-test）。

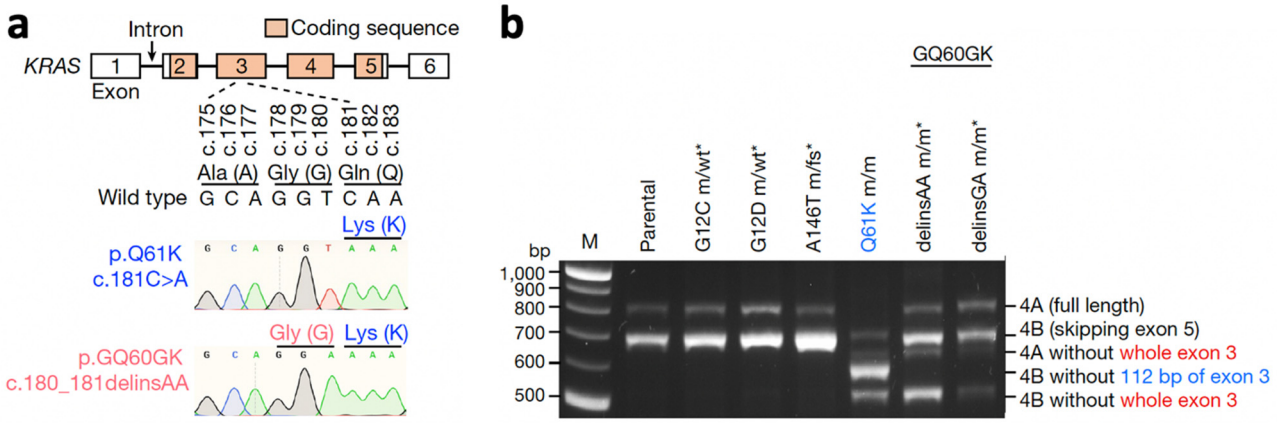


図 2. G60G サイレント変異とそのスプライシングに関する機能
a) KRAS Q61K のみと、Q61K に G60G サイレント変異を伴う配列の比較。
b) ゲノム編集 PC-9 のシングルクローンから抽出した RNA を、*KRAS* 特異的プライマーで増幅させた PCR バンド。Q61K 変異のみでは異常なスプライシングが起こった。

3. 薬剤耐性としての遺伝子増幅

EGFR 阻害剤治療後に耐性となった患者検体から *CCDC6* - *RET*、*ESYT2* - *BRAF*、*FGFR3* - *TACC3*、*EML4* - *ALK* 融合遺伝子が検出されたため、肺腺がん細胞株 PC-9 から CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を応用してこれらの融合遺伝子を先行研究で作製した。これらの融合遺伝子は確かに薬剤耐性を示し、それぞれの融合遺伝子を阻害する薬剤と EGFR 阻害剤の併用療法が有効であることがわかった（Kobayashi et al. リバイス中）。

次に、これらの併用療法で長期間治療を続けると *CCDC6* - *RET* の遺伝子増幅と *ESYT2* - *BRAF* の遺伝子増幅、*YAP1* の遺伝子増幅、*EGFR* 野生型の遺伝子増幅など様々な遺伝子増幅が起こった。これらのことから、PC-9 モデルは薬剤耐性としての遺伝子増幅を起こしやすい特性を持っていると考えられ、その素因について超低継代全ゲノムシー

クエンス（ULP-WGS）でゲノム上のどの領域に遺伝子増幅が起こったかを明らかにしながら、原因遺伝子の同定を継続中である（図 3）。

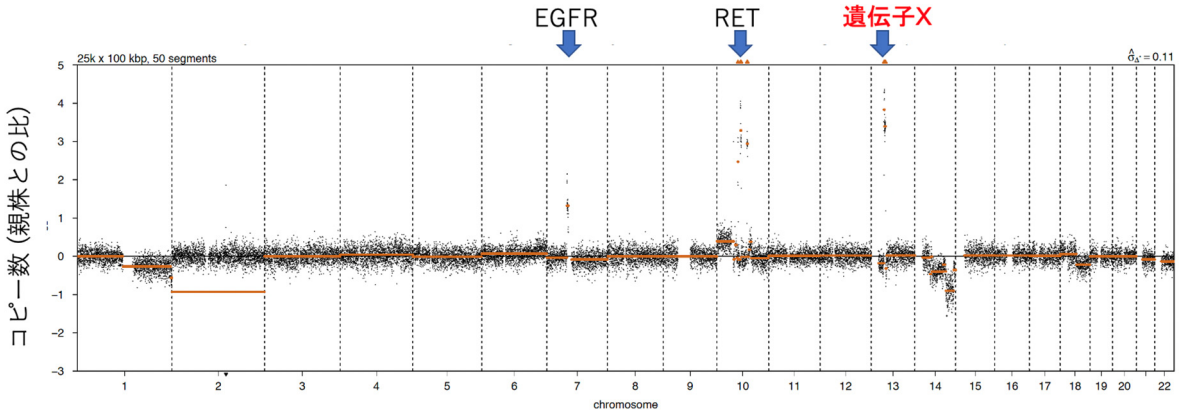


図 3. 親株と薬剤耐性株でのゲノムワイドなコピー数の比較
肺腺がん細胞株 PC-9 から樹立した薬剤耐性株で、遺伝子増幅が起こった領域。

考　察

生物の遺伝情報は、DNA から mRNA に転写され、mRNA の 3 つずつの塩基配列であるコドンがアミノ酸配列へと翻訳され、アミノ酸が連なってタンパク質を構成する。DNA の変異には、アミノ酸配列を変える変異と変わらない変異の 2 種類があり、一般的にはアミノ酸が変わることでがんやさまざまな機能の変化が生じるため、このアミノ酸配列を変える変異ががんをはじめとする生物学全般での研究対象となってきた。一方、アミノ酸配列が変わらない変異の意義は明確になっておらず、あまり注目されてこなかった。本研究は、生物学全般においてこれまであまり研究対象として注目されてこなかったサイレント変異が KRAS Q61K 変異の発がんに必須であることを発見した。

細胞モデルを作製するために従来使われてきたウイルスベクターによる強制発現法は、ウイルス内にパッケージングできる配列の長さの制限によって、エクソンのうちコーディング領域のみを強制発現させる、つまり、スプライシングによってイントロンが除去された後の配列しか導入できなかった。一方、本研究で用いた CRISPR ゲノム編集技術は、細胞が持っている DNA を直接編集するため、エクソンとイントロンの両方が関わるスプライシングを研究するための最適なモデルである。

遺伝子増幅を起こしやすい素因に関する研究は、今回の解析によって候補遺伝子の一つを抽出した段階である。今後の特許申請も見据えて、さらなる継続的な研究が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の主な共同研究者は、Dana-Farber Cancer Institute、Lowe Center for Thoracic Oncology の Pasi A. Jänne 教授と、国立がん研究センター研究所分子病理分野の谷田部恭分野長である。

文 献

1) Soria JC, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, Dechaphunkul A, Imamura F, Nogami N, Kurata T, Okamoto I, Zhou C, Cho BC, Cheng Y, Cho EK, Voon PJ, Planchard D, Su WC, Gray JE, Lee SM, Hodge R, Marotti M, Rukazenkov Y, Ramalingam SS, Investigators F. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med 2018;378:113-125. PMID: 29151359 DOI: 10.1056/NEJMoa1713137

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, Mitsudomi T. Characterization of EGFR T790M, L792F, and C797S Mutations as Mechanisms of Acquired Resistance to Afatinib in Lung Cancer. Mol Cancer Ther 2017;16:357-364. PMID: 27913578 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0407

3) 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. J Thorac Oncol 2018;13:727-731. PMID: 29410323 DOI: 10.1016/j.jtho.2018.01.009

4) Cooper AJ#, Kobayashi Y#, Kim D, Clifford SE, Kravets S, Dahlberg SE, Chambers ES, Li J, Rangachari D, Nguyen T, Costa DB, Rabin MS, Wagle N, Sholl LM, Janne PA, Oxnard GR. Identification of a RAS-activating TMEM87A-RASGRF1 Fusion in an Exceptional Responder to Sunitinib with Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res 2020;26:4072-4079. #Co-first author. PMID: 32312893 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-0397

5) Kobayashi Y, Chhoeu C, Li J, Price KS, Kiedrowski LA, Hutchins JL, Hardin AI, Wei Z, Hong F, Bahcall M, Gokhale PC, Janne PA. Silent mutations reveal therapeutic vulnerability in RAS Q61 cancers. Nature 2022;603:335-342. PMID: 35236983 DOI: 10.1038/s41586-022-04451-4