

令和 2 年 4 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860544

氏 名 小林 祥久

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ボストン （国名： 米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
肺がん分子標的治療の新規ターゲットとその耐性克服
3. 派遣期間： 平成 30 (2018) 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 (2020) 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
ハーバード大学医学部 ダナファーマー癌研究所
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

派遣先における研究状況の概要

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による分子標的治療が確立している。しかし、一部の肺がんは初期耐性を示し、一旦奏効した肺がんも次第に耐性を獲得することが必発である。その機序としてこれまで EGFR の二次変異、MET や HER2 遺伝子増幅など他の遺伝子活性化によるバイパスシグナル、小細胞肺がんへの組織転換など多くの耐性機序についての研究が行われてきたが、新たに獲得する融合遺伝子の役割は明らかとなっていない。

そこで、肺がん細胞株から CRISPR/Cas9 技術で内因性の融合遺伝子を作成する実験系を確立した。これらのモデルを用いて、マルチキナーゼ阻害剤 sunitinib の第二相臨床試験において長期間奏効した患者検体から見つかった新規融合遺伝子 TMEM87A-RASGRF1 が MAPK 経路を活性化して腫瘍原性をもつことを明らかにした (Clin Can Res 2020)。さらに、この成功を踏まえて、EGFR 変異のある肺がん約 400 例に生じた融合遺伝子を網羅的に解析し、CRISPR ゲノム編集モデルで検証するプロジェクトを継続中である。

研究目的

日本の肺がん年間罹患数は 13 万人、死亡数は 7 万人をこえさらに増えている。診断時に約半数が 進行期であること、手術をうけても約 4 割が再発するため予後の改善には化学療法が重要である。肺腺がんの約 40%に上皮成長因子受容体 (EGFR)遺伝子変異がある。このタイプの肺がんには、分子標的治療薬である EGFR チロシンキナーゼ阻害剤が劇的に効き、標準治療となっている。

派遣者は、これまで EGFR 変異のある肺がんについて複数ある EGFR 阻害剤の最適な使い分けについて研究してきた。レトロウイルスベクターを使った外因性の遺伝子発現モデル作成と薬剤耐性株樹立により「変異の種類毎に EGFR 阻害剤を使い分けることで従来効かなかったタイプの肺がんにも効くこと」と、「特定の薬剤毎に耐性機序が異なり、適切に使い分けることで耐性も克服できること」を見出した。

今回、遺伝子編集技術 CRISPR/Cas9 技術を応用して、外因性の遺伝子導入ではなくがん細胞が元々持っている内因性の遺伝子を直接編集した融合遺伝子細胞モデルの作成に挑戦する。特に、1) 臨床試験で長期間治療薬が奏効した患者検体の詳細な解析による原因遺伝子の同定とその検証、2)次世代シーケンサーによる解析が普及してきたことで臨床的意義の不明な融合遺伝子が検出される機会が増えていることを踏まえて、EGFR 肺がんにおける全融合遺伝子の網羅的な解析を行う。

研究状況

プロジェクト 1) 肺がんにおける新規融合遺伝子 TMEM87A-RASGRF1

EGFR, ALK など分子標的治療薬のターゲットとなる変異を持たず非喫煙の肺がん患者に対して、マルチキナーゼ阻害剤 sunitinib の第二相臨床試験を行った。試験全体では奏効率 8%と乏しかったが、有効性が 33 ヶ月続いた患者がいた (図 1)。この肺がん検体に対してターゲット次世代シーケンス、全エクソームシーケンスを行っても明らかなドライバーがん遺伝子の変異はみられなかったが、RNA シーケンスおよびバイオインフォマティクス解析により新規 TMEM87A-RASGRF1 融合遺伝子を検出した。

この融合遺伝子の機能を解析するために、まず腫瘍原性の確認のため広く使われているマウスの NIH/3T3 細胞を CRISPR/Cas9 でゲノム編集して内因性の融合遺伝子を作成した (図 2)。

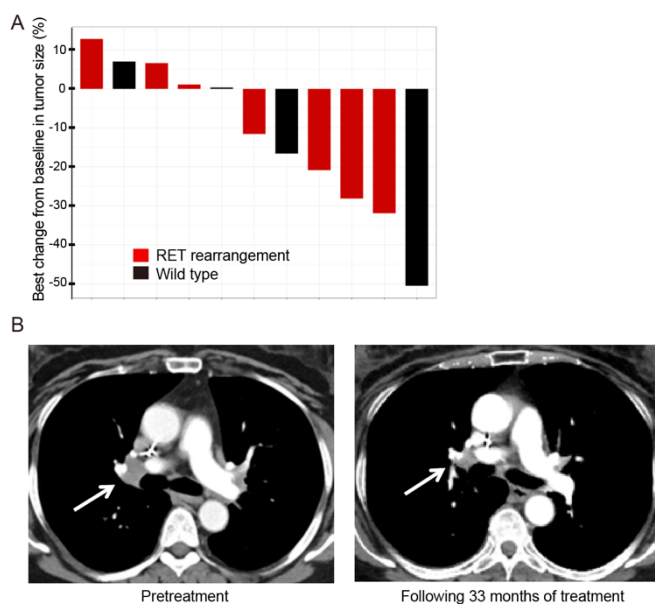


図1 sunitinibの第2相臨床試験

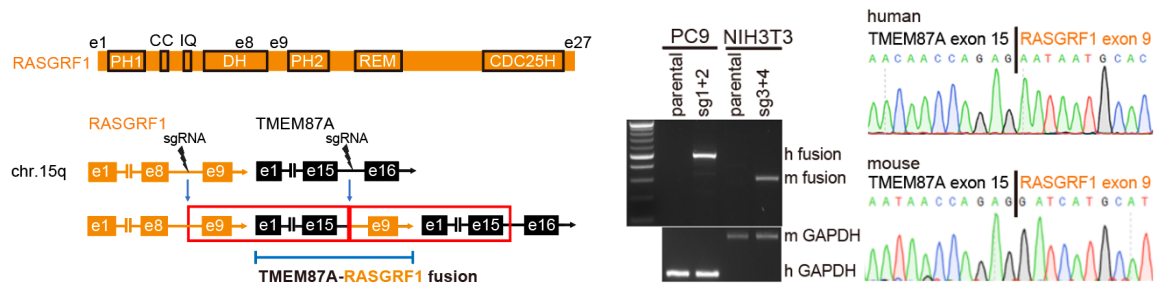


図2 CRISPR-Cas9による融合遺伝子の作成

ゲノム編集された NIH/3T3 細胞は、元々持っている接触阻害作用（隣の細胞と接触するとそれ以上増殖しなくなる）を乗り越えてコロニーを形成した（図 3）。

次に、薬剤感受性およびシグナル経路を解析するために、EGFR 遺伝子変異をもつヒトの肺がん細胞株 PC9 でも同様にこの融合遺伝子を作成した。シングルセルクローニングをして融合遺伝子をもつクローンの解析を進めたところ、代表的な EGFR 阻害剤 osimertinib に対して親株の 100 倍以上の耐性を示し、RASGRF1 融合遺伝子が oncogene として作用していることが示された（図 4）。さらに、ウェスタンブロットで MAPK 経路の活性化がみられ、osimertinib と MEK 阻害剤または ERK 阻害剤の併用療法が有効であった。

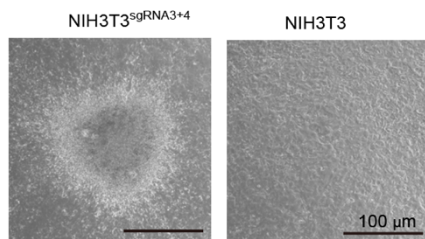


図3 マウスNIH/3T3細胞のコロニー形成

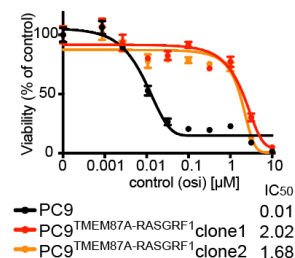


図4 肺がんPC9細胞の薬剤感受性

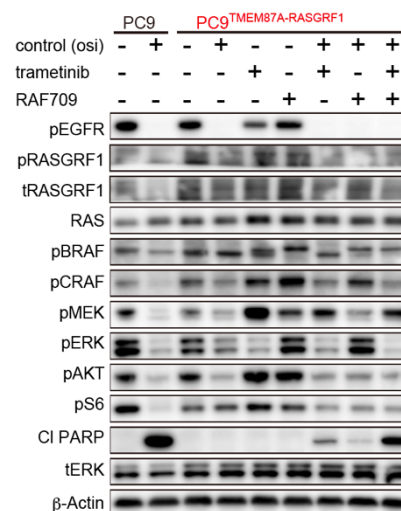


図5 RASGRF1融合遺伝子によるMAPK経路活性化

プロジェクト 2) EGFR 肺がんの全融合遺伝子の網羅的解析

派遣先の肺がん患者において、DNA 検体からの次世代シーケンス (NGS)によって新たな耐性機序として ESYT2-BRAF、CCDC6-RET、FGFR3-TACC3 融合遺伝子が見つかった (*JAMA Oncol* 2018)。DNA ベースの NGS は、肺がん患者に特異的阻害剤を使用するための検査法として日本でも 2019 年に保険承認された。NGS の益々の普及により想定外の融合遺伝子が検出される機会も多くなると予想されるが、技術的な欠点がある。融合遺伝子の break point はイントロン上に位置しているためリピート配列も多く、短い断片の配列から正確な融合パートナー遺伝子を見つけることが難しい。しかし、派遣者らはプロジェクト 1)で DNA ベースの NGS では見逃される融合遺伝子を RNA シーケンスとバイオインフォマティック解析により正確に検出することに成功した (*Clin Can Res* 2020)。

プロジェクト 2 では、EGFR 変異肺がんにおける全融合遺伝子の薬剤耐性機序としての役割を包括的に明らかにする。まず、DNA ベースの NGS で検出された融合遺伝子と実際の患者での EGFR 阻害剤に対する効果をマッピングさせて耐性に関わるかどうかを明らかにする。次に、その融合遺伝子を RNA シーケンスで再評価して、さらに CRISPR-Cas9 技術で内因性の融合遺伝子を持つ細胞モデルを作成して有効な治療法を明らかにする (Fig 1)。

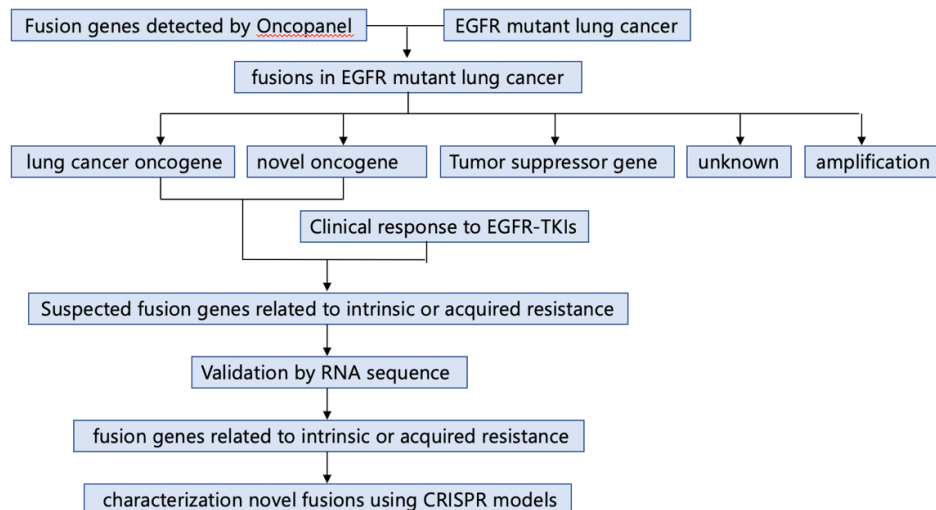


Fig.1 Flow chart of this study

A) DNA ベースの NGS で EGFR 変異肺がん に生じる全融合遺伝子を包括的に解析しその臨床的意義を解明

約 3100 例の非小細胞肺癌に対して DNA ベースの NGS で解析したところ、EGFR 変異のある約 400 例から 78 種もの融合遺伝子が見つかった。それらを A) 肺癌に関連するがん遺伝子、B) これまで肺癌では報告されていない新規のがん遺伝子、C) がん抑制遺伝子、D) 意義不明な遺伝子に分類した。この中で、A) 肺癌関連または B) 新規のがん遺伝子を含む計 29 個の融合遺伝子に注目した。次に、これらの患者の EGFR 阻害剤への有効性とマッチングさせて、各融合遺伝子が EGFR 阻害剤への初期耐性または獲得耐性に関わるかどうかを明らかにした。

B) 候補の融合遺伝子を RNA シークエンスと CRISPR-Cas9 ゲノム編集で再評価し治療法を提唱

臨床データとマッチングさせた融合遺伝子のうち入手可能であった検体から RNA を抽出して、現在 RNA シークエンスを行っている。今後、RNA シークエンスデータをバイオインフォマティク解析して融合遺伝子を再評価することで、DNA ベースの NGS の欠点および実際の融合遺伝子の確認を行う。

上記と並行して、EGFR 変異のある肺癌細胞株から CRISPR-Cas9 で融合遺伝子を作成した。融合遺伝子は構造的に大きな欠損、逆位、配列の重複の 3 つの機序によって起こるが、これら全ての作成に成功した。融合遺伝子モデルは EGFR 阻害剤に強い耐性を示し、siRNA で融合遺伝子をノックダウンすることで EGFR 阻害剤への感受性が戻り、確かにこの融合遺伝子が薬剤耐性の原因となっていることを明らかにした (Fig 2)。

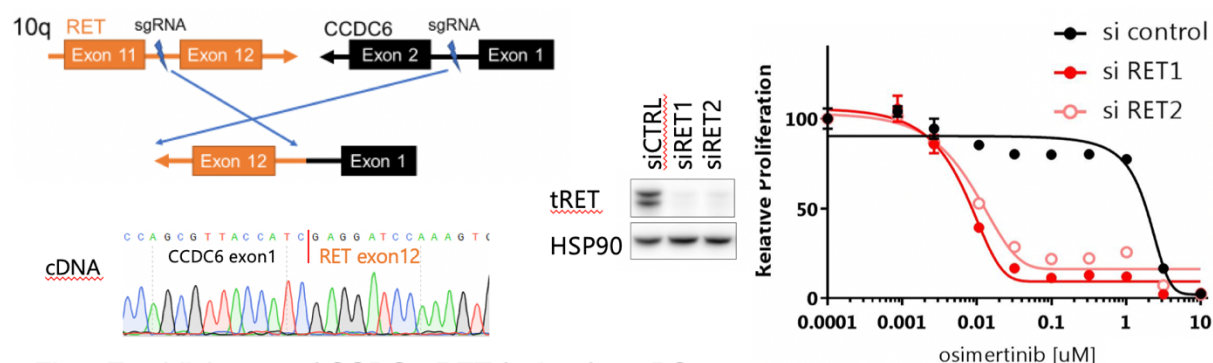


Fig.2 Establishment of CCDC6-RET fusion from PC9

融合遺伝子を持つ細胞モデルに対する薬剤スクリーニングで有効な併用療法を明らかにした。実際の患者においても倫理委員会承認のもと併用療法を行い、奏効した。

さらに、これらの患者が併用療法に対しても次第に耐性を獲得することが強く予想されるため、これらの状況を模して融合遺伝子モデルを併用療法で長期間培養するにより薬剤耐性株を樹立し、併用療法に対する耐性機序とその克服法も明らかにした。

成果の発表・関係学会への参加状況

プロジェクト 1)については Clinical Cancer Research 誌に掲載済みである。

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, Jänne PA, Oxnard GR. Identification of a RAS-activating TMEM87A-RASGRF1 fusion in an exceptional responder to sunitinib with non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research** online published 2020 Apr 20. #co-first author
新型コロナウイルスの影響で関連学会が開催されず、学会では未発表である。

プロジェクト 2)については RNA シークエンスが新型コロナウイルスの影響で中断されており、途中の段階であるため未発表である。

その他の論文発表一覧

1. Kobayashi Y, Mitsudomi T. Ground glass nodules with 5 years' stability can grow after 10-year follow-up: do genetic features determine the fate? **Translational Lung Cancer Research** 2019 Dec; 8(4): S425-427.
2. Fujino T, Kobayashi Y, Suda K, Koga T, Nishino M, Ohara S, Chiba M, Shimoji M, Tomizawa K, Takemoto T, Mitsudomi T: Sensitivity and Resistance of MET Exon 14 Mutations in Lung Cancer to Eight MET Tyrosine Kinase Inhibitors In Vitro. **Journal of Thoracic Oncology** 2019 Oct; 14(10):1753-1765.
3. Yonesaka K, Kobayashi Y, Hayashi H, Chiba Y, Mitsudomi T, Nakagawa K. Dual blockade of EGFR tyrosine kinase using osimertinib and afatinib eradicates EGFR-mutant Ba/F3 cells. **Oncology Reports** 2019 Feb;41(2):1059-1066.
4. Tomizawa K, Sato K, Ohara S, Fujino T, Koga T, Nishino M, Kobayashi Y, Chiba M, Shimoji M, Suda K, Takemoto T, Mitsudomi T. Life-threatening complications after pulmonary resection for lung cancer in patients on chronic hemodialysis. **Surgery Today** 2019 Jan; 49:513-520.
5. Koga T, Kobayashi Y, Tomizawa K, Suda K, Kosaka T, Sesumi Y, Fujino T, Nishino M, Ohara S, Chiba M, Shimoji M, Takemoto T, Suzuki M, Jänne PA, Mitsudomi T. Activity of a novel HER2 inhibitor, poziotinib, for HER2 exon 20 mutations in lung cancer and mechanism of acquired resistance: An in vitro study. **Lung Cancer** 2018 Dec; 126:72-79.
6. Nishino M, Suda K, Kobayashi Y, Ohara S, Fujino T, Koga T, Chiba M, Shimoji M, Tomizawa K, Takemoto T, Mitsudomi T. Effects of secondary EGFR mutations on resistance against upfront osimertinib in cells with EGFR-activating mutations in vitro. **Lung Cancer** 2018 Dec; 126:149-155.
7. Kobayashi Y, Ambrogio C, Mitsudomi T. Ground-glass nodules of the lung in never-smokers and smokers: clinical and genetic insights. **Translational Lung Cancer Research** 2018 Aug; 7(4):487-497.
8. EGFR T790M and C797S Mutations as Mechanisms of Acquired Resistance to Dacomitinib. Kobayashi Y, Fujino T, Nishino M, Koga T, Chiba M, Sesumi Y, Ohara S, Shimoji M, Tomizawa K, Takemoto T, Mitsudomi T. **Journal of Thoracic Oncology** 2018 May; 13(5):727-731.