

博士論文

臨床的意義不明なERBB2遺伝子変異の  
ハイスループット機能解析

長野 匡晃

臨床的意義不明なERBB2遺伝子変異の  
ハイスループット機能解析

所属：外科学専攻 呼吸器外科

指導教官名：中島 淳

申請者名：長野 匡晃

## 目次

|      |     |    |
|------|-----|----|
| 略語一覽 | ．．． | 3  |
| 要旨   | ．．． | 4  |
| 序文   | ．．． | 5  |
| 方法   | ．．． | 17 |
| 結果   | ．．． | 24 |
| 考察   | ．．． | 52 |
| 結語   | ．．． | 60 |
| 謝辞   | ．．． | 61 |
| 引用文献 | ．．． | 62 |

## 略語一覽

|            |  |
|------------|--|
| ATCC       | American type culture collection   |
| ATP        | Adenosine triphosphate   |
| COSMIC     | Catalogue of somatic mutations in cancer   |
| DMEM-F12   | Dulbecco' s modified Eagle' s medium-F12   |
| EGFR       | Epidermal growth factor receptor   |
| ERBB2      | Erb-B2 receptor tyrosine kinase  |
| FBS        | Fetal bovine serum   |
| FDA        | Food and drug administration   |
| FFPE       | Formalin fixed paraffin-embedded   |
| MANO       | Mixed all nominated mutants in one   |
| MSK-IMPACT | Memorial Sloan Kettering-integrated mutation<br>profiling of actionable cancer targets |
| NGS        | Next generation sequencer  |
| OncKB      | Oncology knowledge base  |
| RPMI       | Roswell park memorial institute  |
| TCGA       | The cancer genome atlas  |
| VUS        | Variant of unknown significance  |

## 要旨

DNA シークエンシング技術の発展により、*ERBB2* 遺伝子変異が様々な癌腫で報告されている。いくつかの変異は発がん性の形質転換能を有することが既に知られているが、他の多くの変異は臨床的意義不明の変異 (variant of unknown significance) に分類される。我々は、次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異の細胞増殖に与える影響や薬剤感受性を網羅的に評価することのできる革新的なハイスループット遺伝子変異機能解析手法 (mixed-all-nominated-mutants-in-one method: MANO 法) を開発し、それを使って 55 種類の *ERBB2* 遺伝子変異を解析した。その結果、新たに 3 種類の非同義変異が形質転換能を有することが明らかとなった。また、EGFR および *ERBB2* に対するチロシンキナーゼ阻害剤であるアファチニブ、ネラチニブ、オシメルチニブの 3 薬剤は多くの *ERBB2* 変異に奏功するが、L755 変異はオシメルチニブのみ感受性が高く、一方で、エクソン 20 挿入変異はオシメルチニブよりもアファチニブ、ネラチニブの方が奏功する、という薬剤感受性の違いが示唆された。さらに、我々は 17 種類の *ERBB2* 複合変異についても同様の解析を行い、L755S 変異を有する複合変異はオシメルチニブに最も高い感受性を示すことがわかった。MANO 法は、*ERBB2* 変異を含めた様々ながん原遺伝子変異の機能解析を行う上で実用性の高い方法であり、今後のさらなる発展と応用が期待される。

## 序文

### シーケンスの歴史

1953年にWatsonとCrickによってDNAの二重らせん構造モデルが提唱され [1]、それに続いて、DNAの塩基配列がタンパク質のアミノ酸配列を決定しているという事実が明らかになったことで、DNAの塩基配列を知ることで遺伝子に書き込まれるタンパク質の構造および機能を理解するという流れが1980年代から広まった。また、このDNA塩基配列を決定するシーケンシングという技術は、SangerとGilbertの2人によって1970年代後半に開発されて以降 [2, 3]、加速度的に解析能力を向上させていった。特に、1990年から世界各国の協力により3000億円以上の予算を投与して実施されたヒトゲノム計画と並行して、DNAシーケンシングを劇的に高速化するための取り組みが1990年前後から活発化し、従来の1塩基解像度の電気泳動ではなく、高度に集積化された並列反応を実施し、それを超並列型リアクターによって計測することで大量の塩基配列情報を獲得することができる、次世代シーケンサー (next generation sequencer: NGS) が2005年に開発された。このNGSを使った塩基配列の解析速度と解析塩基量は、開発当時でも従来のキャピラリー式シーケンサーを遥かに凌駕していたが、その後も急速に改良や新型機種が登場し、年々性能が上昇している。このNGSの発展によりDNA塩基配列決定能力が飛躍的に上昇したこと

で、大きく前進しつつあるのが癌研究の分野である。多くの癌は体細胞の遺伝子異常がその原因でありことが知られており、近年では様々な癌組織から DNA を抽出して NGS を用いた網羅的な解析が盛んに行われている。NGS を利用してがんの分子的機序の理解を促進することを目指す包括的プロジェクトとして、米国立がん研究所と米国立ヒトゲノム研究所が立ち上げた The Cancer Genome Atlas (TCGA) はその代表的なものであり、2014 年には、そのプロジェクトの一つとして肺腺癌 230 例の NGS を用いた網羅的な遺伝子解析の結果が報告され [4]、全体の 75% に Driver Oncogene が同定された (図 1)。

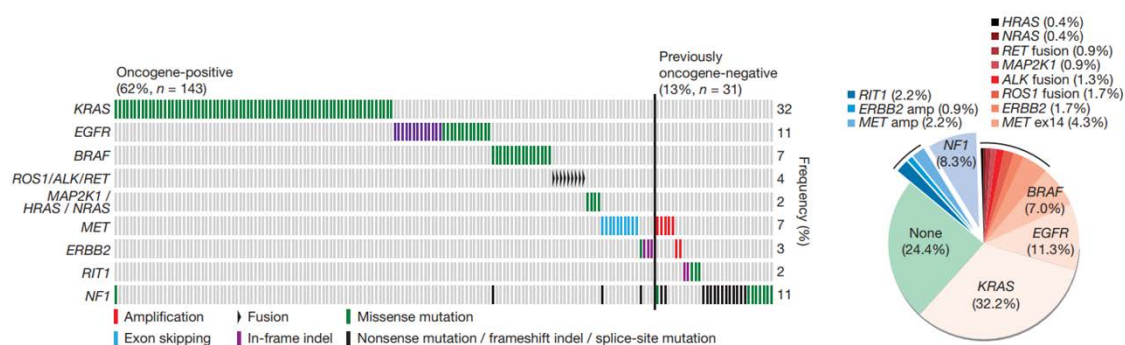


図 1 NGS を用いた肺腺癌 230 例の解析結果

TCGA でのプロジェクトの一環として解析された肺腺癌 230 例の解析により、KRAS や EGFR の遺伝子変異など既に Driver Oncogene として知られていた 62% に加えて、MET 遺伝子の増幅や NF1 遺伝子変異など 13% の症例で新たに Drive Oncogene が同定された。

(Cancer Genome Atlas Research Network. *Nature* 511, 543-550, 2014. より引用)

## クリニカルシーケンス

2015 年 1 月に米国一般教書演説で当時のオバマ大統領が” Precision Medicine Initiative” を発表したことで、個々の症例における分子発現や遺伝

子変異を元にした薬剤の選択、治療効果や予後の推定などを実施していく個別化医療 (Precision Medicine) という言葉が一般的に知られるようになった。これまで DNA シークエンサーの利用は主として研究目的であり、NGS での検査は血液や組織の凍結切片からの DNA 抽出が主流であったが、大量シーケンシングの実現性と低コスト化に加えて、近年では試薬や機器の開発や改良が進み、ホルマリン固定パラフィン包埋切片 (formalin fixed paraffin-embedded: FFPE) から良質な DNA 抽出することが可能となってきたことで、主に FFPE を用いたサンプルを利用して、がんの増殖や進展に関係するとされている特定の遺伝子 [5] をターゲットとして、日常検査の一環として解析し個別化医療を実現しようとする「がんクリニカルシーケンス」という流れが顕在化してきている (図 2)。

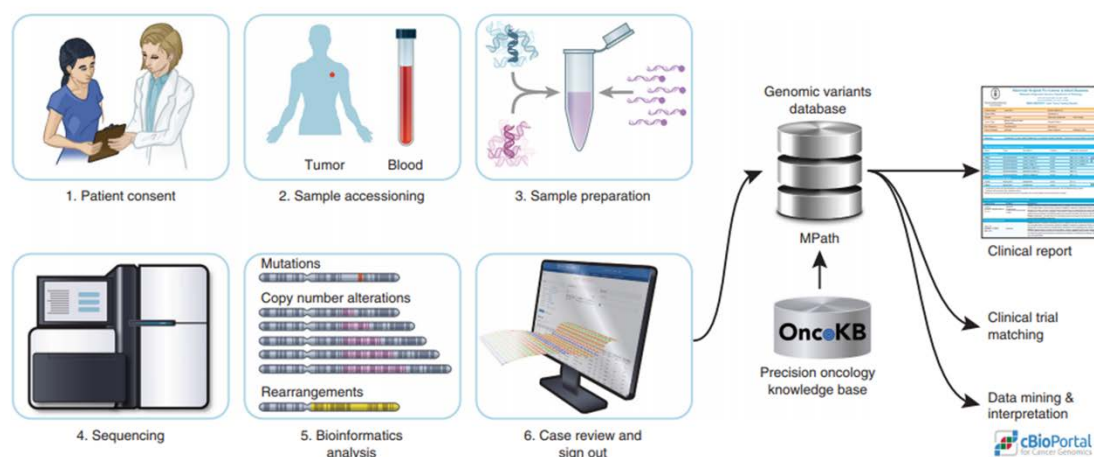


図 2 がんクリニカルシーケンスの流れ

患者同意の下、腫瘍と血液のサンプルを回収して DNA/RNA を抽出後、ライブラリーを作成して NGS で解析を行う。解析されたデータは OncoKB などのデータベースと照らし合わされた後にレポートして患者に返却される。

(A. Zehir, et al. *Nat Med* 23, 703-713, 2017. より引用)



米国の Memorial Sloan Kettering がんセンターでは、Memorial Sloan Kettering-integrated mutation profiling of actionable cancer targets (MSK-IMPACT) 検査と呼ばれる 468 個のがん関連遺伝子情報を網羅的に解析する検査が 2014 年より開始され、既に 10000 例を超える症例に対して FFPE サンプルを利用してこのクリニカルシーケンスが行われている [6]。そのデータが 2017 年に報告されており、36.7% の患者でがんの増殖や浸潤に強く関連する遺伝子（ドライバー遺伝子）が少なくとも一つ同定され、11% の患者が臨床試験に登録されたという結果であった（図 3）。

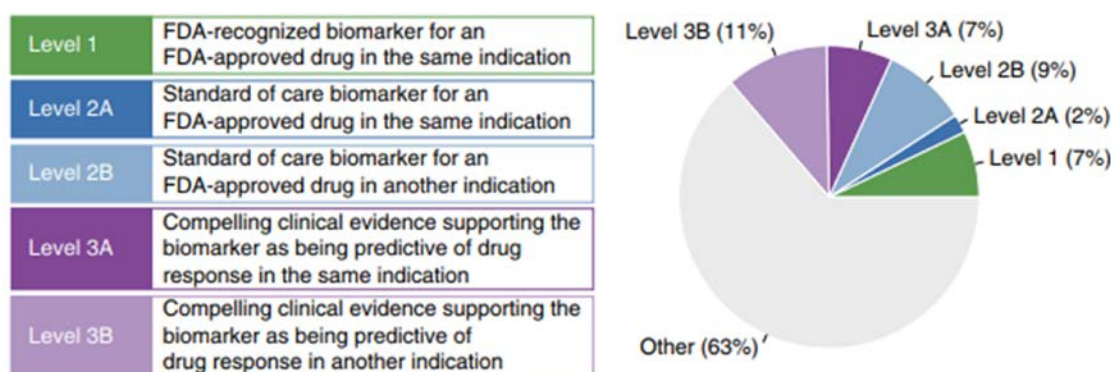


図 3 MSK-IMPACT 検査による 10000 例の解析結果

FDA に認証されている薬が適応となりうるドライバー遺伝子は全体の 18% に認められた。

(A. Zehir, et al. *Nat Med* 23, 703-713, 2017. より引用)

### Variant of unknown significance (VUS)

がんクリニカルシーケンスの実用化により、ドライバー遺伝子の変異に関する報告が急速に増え、それに基づき治療薬を選択する戦略が可能になったこと

で、より多くの治療薬（分子標的薬）が見出されてきた。これにより、これまで分子標的薬の処方が難しかった難治性がんにおいても、ドライバー遺伝子変異に基づき他癌種むけに開発された分子標的薬による治療の可能性が広がった。また、がんが進行してしまい標準治療では対応が困難になっている患者にとっても、他癌種の分子標的薬を適応拡大することにより効果的な治療を継続できる道が開けた。しかし、その一方で NGS では複数の遺伝子を同時に調べるため、患者の病態に関係する既知の疾患責任遺伝子の変異だけでなく、意義のある疾患原因として確定できない遺伝子変異が見つかる場合も多い。このような臨床的意義不明の変異を variant of unknown significance (VUS) と呼ぶ。がんクリニカルシーケンスの広がりとともに、VUS の種類と数も急速に増加してきており、これをどのように解釈し患者の治療につなげていくことができるかは非常に難しい問題であり、見つかった VUS の機能評価および薬剤感受性評価などを行っていかなくてはならないという認識が広まりつつある。

#### **Mixed-all-nominated-mutants-in-one method (MANO 法)**

多くのがんゲノムに共通した特徴として、変異遺伝子の long tail 化が指摘されている。つまり、複数症例に共通して変異が見いだされる遺伝子は限られており、多くの遺伝子変異は全体の 1% ないしそれ以下の割合に過ぎず、VUS の大

多数はこの中に含まれる。したがって、従来からの特定のがん腫で共通して見つかる変異遺伝子に注目する方法では、これらの症例ユニークな変異遺伝子の意味を解釈することは難しいと考えられる。また、従来の遺伝子変異機能解析法は一つ一つの変異遺伝子の機能を調べるのに多くの時間と労力を必要とするため、次々と報告されてくるこれらの低頻度な変異遺伝子は新薬開発などにおける治療標的にしづらい側面もあり、機能解析が追いついていないのが現状である。そこで、我々は各遺伝子変異の細胞増殖に与える影響や薬剤感受性を一度の解析で迅速にかつ網羅的に評価することのできる、革新的なハイスループット遺伝子変異機能解析手法 (mixed-all-nominated-mutants-in-one method: MANO 法) を開発した [7]。図 4 に MANO 法の概略を示す。

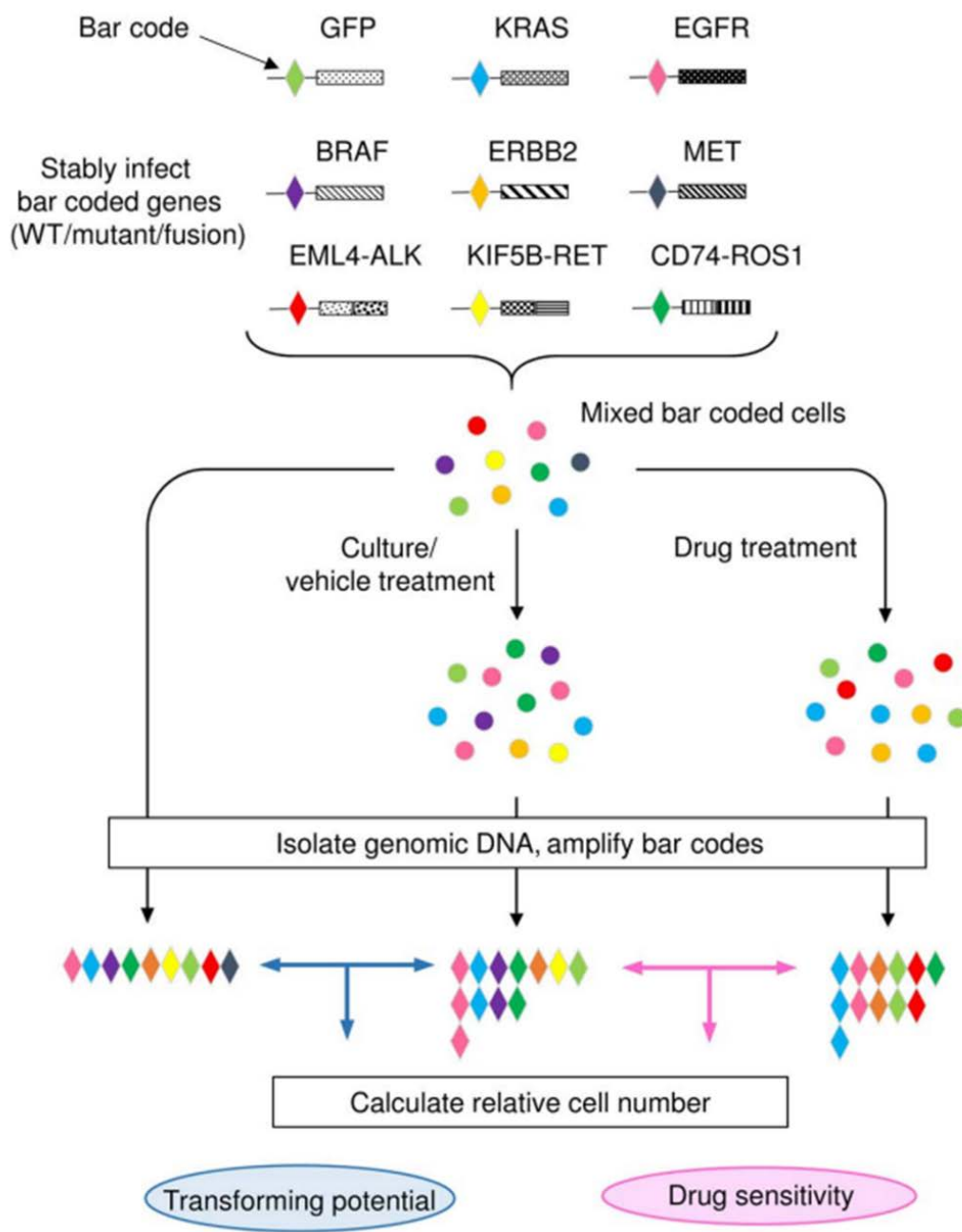


図4 MANO法の概略図

6塩基のバーコード配列を組み込んだ個々の遺伝子をレトロウイルスによってアッセイ細胞にそれぞれ導入後、全て混和した上で一定期間培養し、培養細胞のDNAを抽出、バーコード配列をPCR増幅してNGSを用いて解析することで、バーコードの相対量を計測する。その値から各遺伝子導入細胞の相対的な細胞数を算出することで、VUSを含めた多数の変異遺伝子の形質転換能や薬剤感受性を一気に機能解析する手法である。

(S. Kohsaka, et al. *Sci Transl Med* 9, eaan6566, 2017. より引用)

この手法はレトロウイルスベクターを用いて遺伝子を細胞株に導入して機能解析を行うが、各遺伝子に固有の 6 塩基からなるバーコード配列が遺伝子の直前に組み込まれており、目的の遺伝子がこの配列によって識別可能となっている。レトロウイルスによって各遺伝子が導入されたアッセイ細胞を全て混和した上で一定期間培養し、培養細胞の DNA を抽出後、バーコード配列を PCR 増幅して NGS を用いて解析することで、バーコードの相対量を計測する。その値から各遺伝子導入細胞の相対的な細胞数を算出することで、VUS を含めた多数の変異遺伝子を一気に機能解析することができるという手法である。MANO 法は、がん関連遺伝子の VUS を網羅的に評価することで個別化医療を実現していくための基盤的な手法になると共に、新しい分子標的薬開発にもつながると期待されている。

### ***ERBB2* 遺伝子**

Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2)は膜貫通型チロシンキナーゼ受容体であり、ErbB ファミリーの一つである。ErbB ファミリーには他に epidermal growth factor receptor (EGFR)、ERBB3、ERBB4 が含まれる。リガンドが結合することで受容体が活性化され、受容体は細胞膜上を移動し、ERBB2 または他の ErbB 受容体と結合して二量体を形成する。細胞内領域にあるチロシンキナーゼ

部位は、adenosine triphosphate (ATP)を利用して、相方の受容体細胞内領域にあるチロシン残基をリン酸化し、RAS-RAF-MAPK 経路と PI3K-AKT 経路の2つを主に活性化することで細胞増殖などが誘導される [8] (図5)。

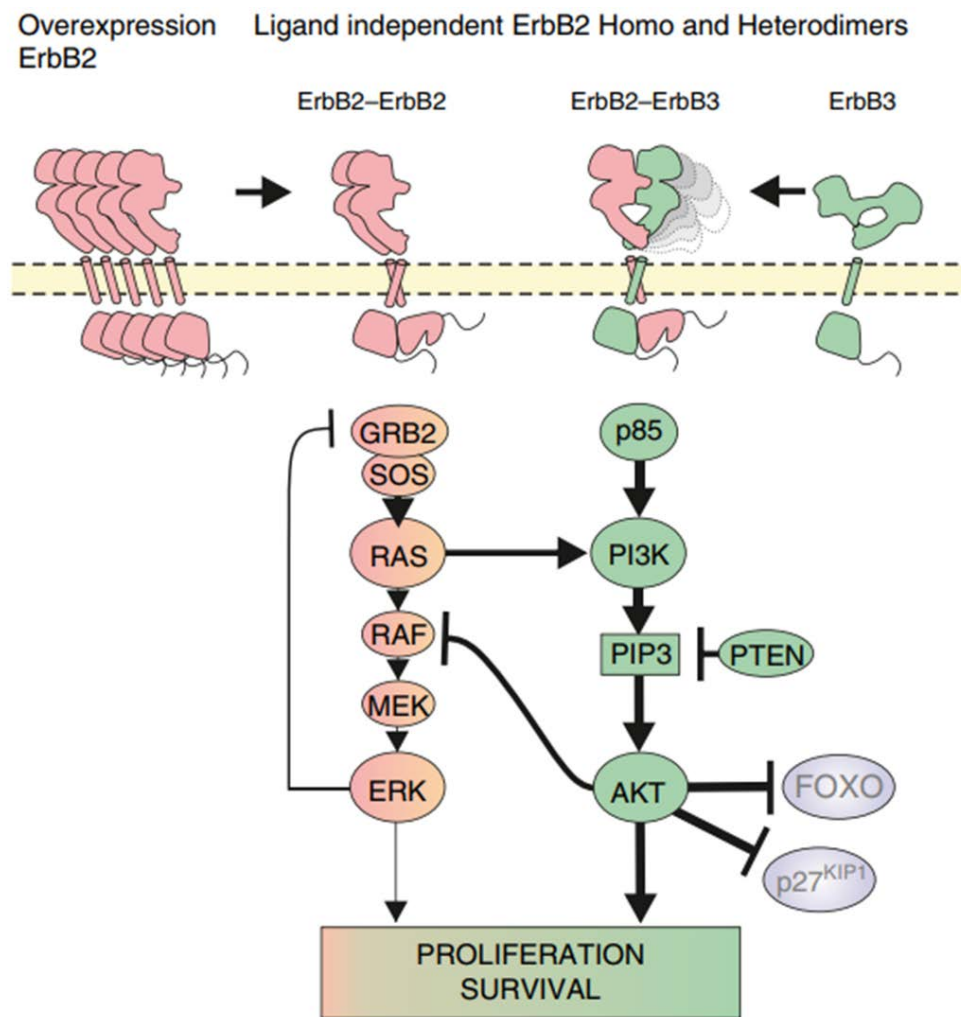


図5 ERBB2 によるシグナル伝達経路

ERBB2 受容体は ErbB 受容体と結合して二量体を形成することで活性化し、チロシンキナーゼ部位が相方のチロシン残基をリン酸化する。それにより、RAS-RAF-MAPK 経路と PI3K-AKT 経路の2つを主に活性化され、細胞増殖などが誘導される。

(R. Tamaskovic, et al. *Nat Commun* 7, 11672, 2016. より引用)

ERBB2 タンパクの増幅が細胞増殖に強く関連していることは様々な癌腫です  
で知られており [9-11]、ERBB2 タンパクの細胞外ドメインに結合し 2 量体化  
を阻害することで抗腫瘍効果を発揮するモノクローナル抗体であるトラスツズ  
マブやペルツズマブ、EGFR および ERBB2 に対するチロシンキナーゼ阻害剤であ  
るラパチニブ等が、ERBB2 タンパクが過剰発現している癌の治療成績を向上させ  
てきた [12-14]。これらの分子標的薬は、ERBB2 タンパクの過剰発現が確認され  
た乳癌および治癒切除不能な進行・再発の胃癌において、Food and Drug  
Administration (FDA) で認可されている [15, 16]。近年では、ErbB 受容体ファ  
ミリー (EGFR、ERBB2、ERBB3) に対するチロシンキナーゼ阻害剤であるサピチニブ  
が、ラパチニブと比較して高い抗腫瘍効果を示すことが研究レベルで報告され  
ている [17]。ERBB2 タンパク *ERBB2* 遺伝子変異については、肺腺癌において 2004  
年に 2~4%に認められることが最初に報告されて以降 [18]、NGS を用いた網羅  
的な解析により乳癌、胃癌、大腸癌、肝臓癌、卵巣癌、膀胱癌など様々な癌腫で  
報告されるようになった [19-24]。*ERBB2* 遺伝子変異のいくつかの種類について  
は、発がん性の形質転換能を有する変異であることが既に知られているが [19,  
25]、多くの *ERBB2* 遺伝子変異は未だ VUS に分類されている。実際に、Catalogue  
of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) というがんに関連した体細胞変異の  
情報を集積した公開データベース上には、300 種類を超える *ERBB2* 遺伝子の非同

義変異が報告されているが、その機能についてこれまでに調べられた変異は Oncology Knowledge Base (OncoKB) という臨床的エビデンスを集積しているデータベースで 74 種類のみとされている。さらに、ERBB2 変異に対する薬剤感受性についての研究はさらに少ない [19, 26, 27]。第 I 相ないし第 II 相臨床試験で、ErbB 受容体ファミリーのチロシンキナーゼ部位に不可逆的に結合して抗腫瘍効果を発揮する分子標的薬であるアファチニブ、ネラチニブ、ダコミチニブが ERBB2 変異を有する癌に対して奏功することが報告されており [28-30]、2018 年に SUMMIT トライアルという ERBB2 変異を有する 21 の癌腫に対してネラチニブ単独の奏効率を検証したバスケット型臨床試験の結果が報告され、乳癌においては投与後 8 週間での奏効率 32%という結果であった [31]。最近では薬剤耐性遺伝子変異として知られている EGFR T790M 変異に効果を発揮する第 3 世代 EGFR 阻害薬であるオシメルチニブが ERBB2 変異に対しても効果を発揮する可能性があることが研究レベルで報告されてきているが [32]、アファチニブやオシメルチニブに関して大規模な臨床試験のデータはまだ存在していない。また、ERBB2 タンパク過剰発現の乳癌に対するトラスツズマブの治療後に、*ERBB2* *K753E* 変異や *L755S* 変異が薬剤耐性 2 次変異として出現しているという報告が出てきており [33, 34]、ERBB2 変異の薬剤感受性を調べることは重要な課題となっている。



## 本研究で明らかにしたこと

以上から本研究では、様々な癌腫で報告されている *ERBB2* 遺伝子変異の発生頻度を調べると共に、VUS として分類されている多くの *ERBB2* 遺伝子変異の機能評価を網羅的に行うことを目的として実験を行った。まず MSK-IMPACT および TCGA データベースに登録されている様々な癌腫での *ERBB2* 遺伝子増幅・遺伝子変異の頻度について比較検討を行った。続いて、COSMIC データベースに複数報告されている *ERBB2* 遺伝子の非同義変異 55 種類について、MANO 法を用いて形質転換能と薬剤感受性を網羅的に評価した。薬剤についてはトラスツズマブ・ラパチニブ・サピチニブ・アフアチニブ・ネラチニブ・オシメルチニブの 6 薬剤の比較検討を行った。さらに、COSMIC データベースに報告されている *ERBB2* 複合変異 17 種類についても同様に、MANO 法を用いて形質転換能と薬剤感受性について解析を行った。

## 方法

### 細胞株

ヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney 293 cells: HEK293 cells) とマウス線維芽細胞 (3T3 cells) は American Type Culture Collection: ATCC (Manassas, VA, USA) から購入し、10%ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) と 2 mmol/L グルタミン酸、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco' s modified Eagle' s medium-F12: DMEM-F12) で培養した (全て Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。

マウス pro-B 細胞 (Ba/F3 cells) は、10%FBS と 2 mmol/L グルタミン酸、1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、20 U/mL Interleukin 3 (IL-3) を添加したロズウェルパーク記念研究所培地 (Roswell Park Memorial Institute: RPMI) で培養した (全て Thermo Fisher Scientific)。

### バーコード配列をつけたレトロウイルスベクターの作成

Pcx4 ベクター [35] に目的の遺伝子 (今回は *EGFR* と *ERBB2* 遺伝子) を導入し、その遺伝子上流に 6 塩基のバーコード配列を挿入した Pcx5 ベクターを作成した。遺伝子変異は、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) と変異特異的なプライマーを用いて作成

した。作成したプラスミドは、Applied Biosystems 3730 DNA アナライザー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてサンガー法にて、変異とバーコード配列を確認した。

## ウイルスの作成と感染方法

目的遺伝子を組み込んだ組み換えレトロウイルスベクタープラスミドを 2 種類のパッケージングベクターとともに HEK293 細胞へ導入し、組み換えレトロウイルス粒子を作成した。そのレトロウイルス粒子を、3T3 細胞には 4 µg/mL ポリブレン (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) を用いて 12 ウェルプレートで感染させ、Ba/F3 細胞にはレトロネクチンでコーティングした 12 ウェルプレート (Takara Bio, Otsu, Japan) で感染させた。

## フォーカスフォーメーションアッセイ

それぞれの ERBB2 遺伝子変異を発現した 3T3 細胞を、5%ウシ血清を添加した DMEM-F12 培地で 2 週間培養し、ギムザ液で染色して形質転換能を評価した。ギムザ染色された面積を Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) で測定した。

## MANO 法

異なる 6 塩基のバーコード配列を持つ、それぞれの ERBB2 変異遺伝子を導入した Pcx5 ベクターを 3T3 細胞と Ba/F3 細胞にレトロウイルスを用いて感染させた。個々に変異遺伝子が導入されたアッセイ細胞を等量ずつ混ぜて培養し、細胞を回収、DNA を抽出した。DNA の抽出には QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用し、5' -TGCAAAGGACCTTACACAGTCCTG-3' と 5' -GACTCGTTGAAGGGTAGACTAGTC-3' のプライマーセットでバーコード配列部分を PCR 増幅した。得られた PCR 産物を AMPure beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) で精製後、NEB NextUltra DNA Library Prep Kit (NEB, Ipswich, MA, USA) でシーケンス用に調整した。調整したライブラリーのクオリティーチェックは Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific) と Agilent 2200 TapeStation system を用いて評価した。最後に、Illumina MiSeq (150-bp ペアエンド、300 サイクル) でシーケンスを行い、各変異遺伝子のバーコード数をカウントした。

## MANO 法を用いた形質転換能の評価

各変異遺伝子をアッセイ細胞にレトロウイルスで導入した 2 日後にアッセイ細胞を等量ずつ混ぜて同じ Dish 内で培養を開始した (Day 0)。3T3 細胞は 10%FBS

を添加した DMEM-F12 培地で、Ba/F3 細胞は IL-3 なしの RPMI 培地で培養し、どちらのアッセイ細胞も triplicate (N=3) で実験を行った。3 日毎に継代を行い、その際に一部の細胞を回収して DNA を抽出した。Day 0 で回収した DNA から得られたバーコード数をコントロールとし、各遺伝子変異の倍率変化 (fold-change) を  $100 \times (\text{得られたバーコード数の平均値}) / (\text{Day 0 での相応するバーコード数の平均値})$  という式で計算した。Day 12 における各変異遺伝子の fold change を計算し、野生型 ERBB2 の fold change と比較して統計学的に有意に増加している ERBB2 遺伝子変異は形質転換能を有する変異であると定義した。

#### MANO 法を用いた薬剤感受性の評価

薬剤感受性を調べる際には、変異遺伝子がそれぞれ導入された Ba/F3 細胞を IL-3 添加なしの RPMI 培地で 2 週間培養し、IL-3 非依存性に増殖してきた (つまり形質転換能を有する) Ba/F3 細胞を等量ずつ混ぜて、評価したい分子標的薬を様々な濃度で投与し、72 時間後に細胞を回収し DNA を抽出した。本実験で使用した分子標的薬はトラスツズマブ (Chugai Pharmaceutical Co., Chuo, Tokyo, Japan)、ラパチニブ (LC Laboratories, Boston, MA, USA)、サピチニブ (Selleckchem, Houston, TX, USA)、アフアチニブ (LC Laboratories)、ネラチニブ (LC Laboratories)、オシメルチニブ (LC Laboratories) の 6 種類で

ある。薬剤感受性実験も triplicate (N=3)で行った。薬剤を加えなかったウェルから抽出した DNA より得られたバーコード数をコントロールとし、各遺伝子変異の増殖抑制効果を  $100 \times (\text{得られたバーコード数の平均値}) / (\text{コントロール群のバーコード数の平均値})$  という式で計算した。

### アラマーブルー法

遺伝子変異を導入することで形質転換した (IL-3 非依存性に増殖可能になった) Ba/F3 細胞をそれぞれ 96 ウェルで培養し、分子標的薬を投与した。薬剤投与後 72 時間でアラマーブルー (Thermo Fisher Scientific) を 10  $\mu$ l ずつウェルに加え、蛍光強度を測定した [36]。細胞を加えなかったウェルをコントロールとして、細胞の生存率を GraphPad Prism 7.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) というソフトウェアで解析した。

### *in vivo* での MANO 法

各変異遺伝子をレトロウイルスで導入した 60 種類の 3T3 細胞を等量ずつ混ぜ、生後 6 週の雌のヌードマウスの皮下に  $3.0 \times 10^6$  細胞/匹 (すなわち、各変異遺伝子が導入された 3T3 細胞は  $0.5 \times 10^5$  細胞ずつ含まれる) で注射した。ラパチニブ、アフアチニブ、ネラチニブ、オシメルチニブの 4 薬剤それぞれを 2%DMSO、

30%ポリエチレングリコール (Sigma Aldrich)、滅菌水の混合液で溶解し、2日毎に腹腔内投与した。それぞれの群でマウス10匹使用し、N=10で実験を行った。腫瘍の大きさを  $1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$  という計算式で2日毎に測定した。腫瘍は12日後に摘出し、gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany) の ”homogenization of tissue for total RNA isolation” というプロトコルを用いて機械的に粉砕・均質化した。その検体から *in vitro* と同様にDNAを抽出し、MANO法を用いて各遺伝子変異のバーコード数を測定した。すべての動物実験については、「動物の愛護および管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び管理ならびに苦痛の軽減に関する法律」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき倫理的な配慮をもって適正に行った。

#### *in vivo*でのERBB2 L755P変異の薬剤感受性評価

ERBB2 L755P変異を発現している3T3細胞を、生後6週の雌のヌードマウスの皮下に  $1.0 \times 10^6$  細胞/匹で注射した。それぞれの群でマウス5匹を使用し、N=5で実験を行った。アファチニブ、オシメルチニブの2薬剤を低用量（アファチニブ：8 mg/kg、オシメルチニブ：8 mg/kg）と高用量（アファチニブ：40 mg/kg、オシメルチニブ：20 mg/kg）で使用した。2%DMSO、30%ポリエチレングリコール、滅菌水の混合液に溶解し、2日毎に腹腔内注射で投与した。腫瘍の大きさを  $1/2$

$x$  (長径)  $\times$   $x$  (短径)<sup>2</sup> という計算式で 2 日毎に測定した。

## 薬物血中濃度測定

アフアチニブとオシメルチニブを上述の低用量/高用量で腹腔内投与後、30 分・1 時間・2 時間・4 時間・6 時間・24 時間でマウスの血清を採取した (各採取につきマウスを 3 匹使用し、N=3 で実験を行った)。それぞれの血清サンプルには内部標準としてクリゾチニブ (LC Laboratories) を等量ずつ投与し、アセトニトリルを用いて前処置を行った。サンプルは高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いて解析を行った。標準試料を用いて検量線を作成し、サンプルの血中薬物濃度を定量した。

## 統計学的分析

*in vitro* での MANO 法を用いた形質転換能の検定 (各 ERBB2 変異遺伝子と野生型 ERBB2 との比較) には、両側  $t$  検定を行った。*in vivo* での各群間の検定では、一元配置分散分析後にダネット多重比較検定を用いた。P 値が 0.05 未満の場合に、統計学的に有意と解釈した。



## 結果

### *ERBB2* 遺伝子変異の種類と発生頻度

COSMIC データベースにおいて、*ERBB2* 遺伝子の非同義変異 55 種類が複数症例で報告されていた (表 1)。

表 1 COSMIC データベースで複数回報告のある *ERBB2* 遺伝子変異

| Name             | Barcode | Count in the COSMIC database |
|------------------|---------|------------------------------|
| R34Q             | ACAAAT  | 2                            |
| R138Q            | GTAAAA  | 2                            |
| R143Q            | TTAGTT  | 2                            |
| R217C            | CGCGGG  | 5                            |
| A241V            | GTTTTC  | 2                            |
| I263T            | ACATAT  | 2                            |
| E265K            | CATCAA  | 2                            |
| D277G            | GCCCTA  | 2                            |
| D277Y            | ACACTT  | 2                            |
| G292R            | AAATTA  | 4                            |
| S310F            | GATCGG  | 55                           |
| S310Y            | TACAGC  | 14                           |
| Y343C            | GGTCGT  | 2                            |
| V480A            | CCGAAA  | 2                            |
| R487W            | ACATCC  | 3                            |
| S633F            | GTGTAG  | 2                            |
| A644V            | GACTTC  | 2                            |
| R677Q            | AACATA  | 2                            |
| R678Q            | GATGGC  | 19                           |
| T733I            | TGTTTT  | 5                            |
| L755M            | ACTTGG  | 3                            |
| L755P            | CAACTA  | 2                            |
| L755S            | TCTAAA  | 40                           |
| I767M            | TAACAA  | 12                           |
| D769H            | CGGGCG  | 4                            |
| D769Y            | TTGGGT  | 10                           |
| E770_A771insAYVM | CCGTAA  | 3                            |
| A775_G776insYVMA | TAATAC  | 120                          |
| A775G            | CTCACC  | 2                            |
| G776S            | GTCACC  | 2                            |
| G776V            | AGACAC  | 5                            |
| G776>LC          | GCCTTT  | 4                            |

|                  |        |    |
|------------------|--------|----|
| G776>VC          | CCGACT | 8  |
| V777L            | TTCGCT | 28 |
| V777M            | ATACCA | 2  |
| G778_S779insG    | GTGGTA | 2  |
| S779_P780insVGS  | ACACGC | 2  |
| P780_Y781insGSP  | ACACTA | 3  |
| R784C            | ACACCA | 2  |
| L841V            | AGGAAG | 2  |
| V842I            | TAACCG | 27 |
| N857S            | CATTCG | 2  |
| T862A            | TCATCT | 9  |
| H878Y            | CATCCC | 3  |
| R896C            | TAGTCG | 3  |
| R897Q            | AACACA | 2  |
| E914K            | AAACTG | 2  |
| D962N            | CTATTT | 2  |
| F1030C           | TCGTAT | 2  |
| A1039T           | ACCCAA | 2  |
| D1058A           | TATTTA | 2  |
| E1079K           | TGAGCC | 2  |
| V1128I           | GAAGAG | 4  |
| P1199T           | TTTAGC | 2  |
| A1232fs          | ACAACA | 2  |
| Wild type        | TACGGT | -  |
| GFP              | GGCTAA | -  |
| EGFR_L858R       | TCATCG | -  |
| EGFR_L858R_T790M | CAGCAT | -  |
| EGFR_T790M_C797S | GGCACC | -  |

TCGA、MSK-IMPACT、Cancerhotspots [37]など、がんに関連した他の公開データベースに複数症例で報告されている *ERBB2* 遺伝子変異と COSMIC データベースのものを比較したのが図 5 であり、COSMIC データベースは他のデータベースと比較してより多くの遺伝子変異を含んでいることがわかる。

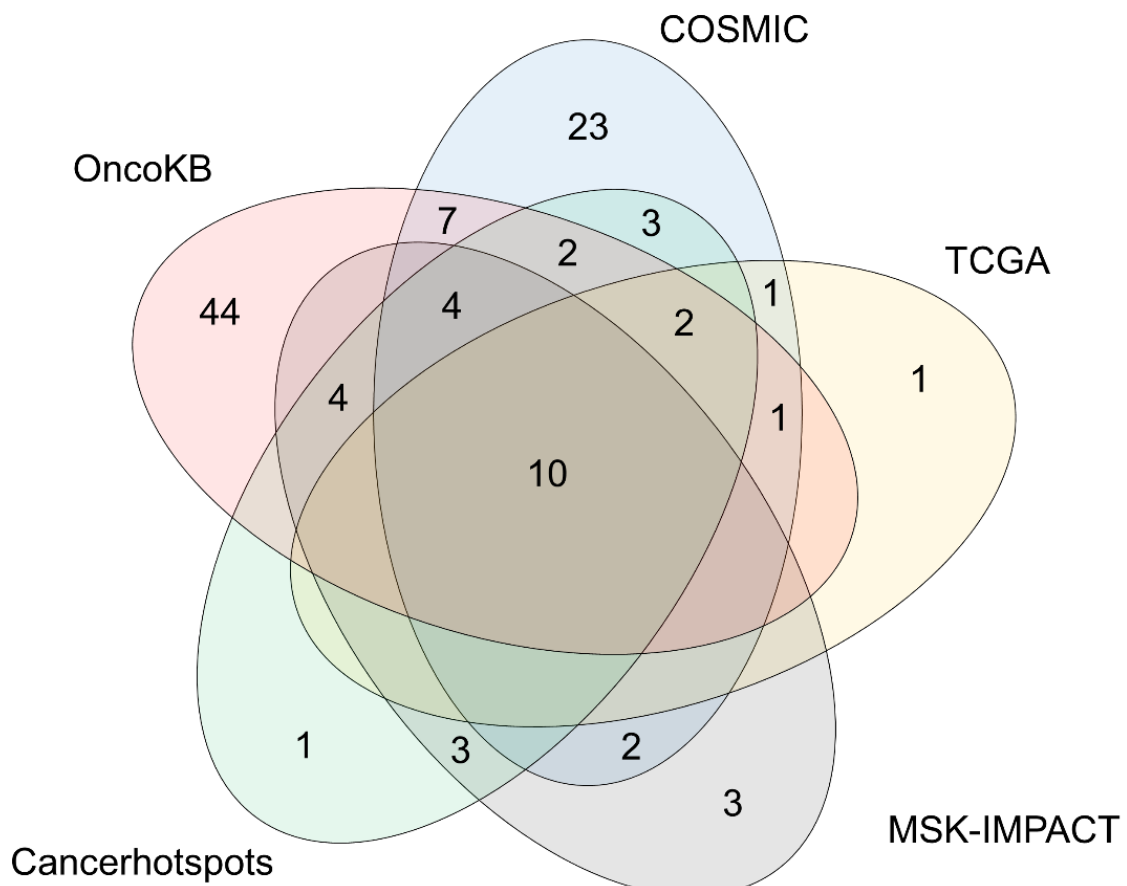


図5 5つのがんデータベースで報告のある *ERBB2* 遺伝子変異の数

OncoKB 以外の4つのデータベースでは、2症例以上で報告のある *ERBB2* 遺伝子変異数を示している。OncoKBでは、これまでにドライバー遺伝子変異かどうか評価された *ERBB2* 遺伝子変異数を示している。

COSMIC データベースで報告されている 55 種類の *ERBB2* 遺伝子変異は様々な癌腫で認められ、肺癌で一番報告数が多く、乳癌、膀胱尿路上皮癌がそれに続いた (図 6A)。ERBB2 タンパク構造内の局在としては、16 種類が細胞外ドメインに、2 種類が細胞膜ドメインに、29 種類がチロシンキナーゼドメインに、8 種類が C 末端ドメインに位置しており、A775\_G776insYVMA が最も報告数が多く、S310

変異、L755 変異がそれに続いた (図 6B)。なお、A775\_G776insYVMA はほとんどが肺癌で認められ、一方で、L755S 変異は乳癌における *ERBB2* 遺伝子変異の 40% を占めていた。

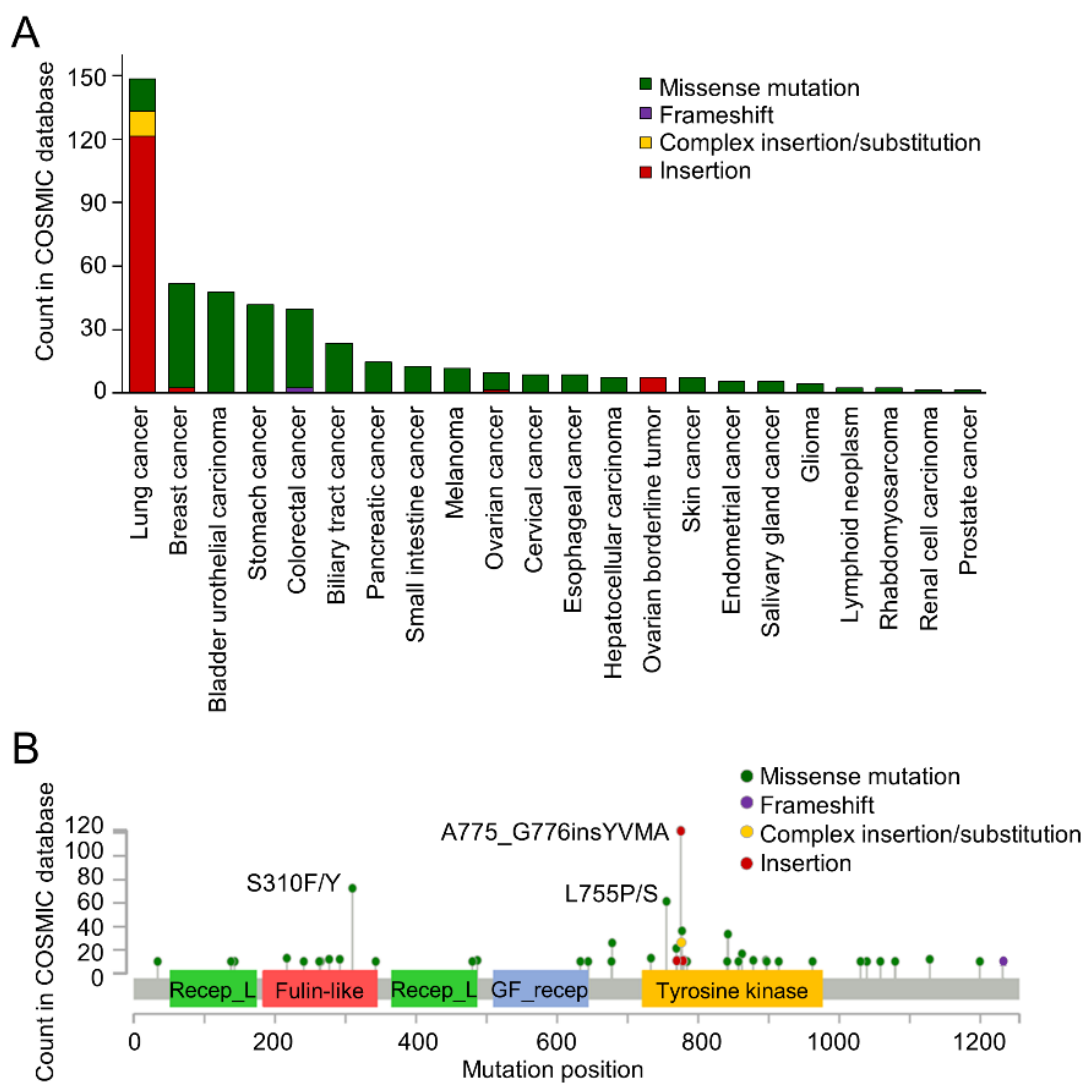


図 6 *ERBB2* 遺伝子変異の分布

(A) 癌腫別の分布を示す。縦軸はサンプル数を、横軸は癌腫を示す

(B) 局在別の分布を示す。縦軸はサンプル数を、横軸は遺伝子内の変異の局在を示す。

続いて、我々は cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) に蓄積されている TCGA と MSK-IMPACT の 2 つのデータベースを用いて、*ERBB2* 遺伝子変異と遺伝子増幅の関連性を調べた。図 7 に示すように *ERBB2* 遺伝子変異と増幅の頻度は 2 つのデータセットであまり大きな差は認められなかった。*ERBB2* 遺伝子変異は膀胱尿路上皮癌で最も頻度が高く、遺伝子増幅に関しては食道癌で最も頻度が高かった。特筆すべきことに、どの癌腫でもある一定の割合で *ERBB2* 遺伝子変異と遺伝子増幅の両方を有する癌が存在しており、特に膀胱尿路上皮癌ではその割合が約 30% と他の癌腫と比較して高かった。

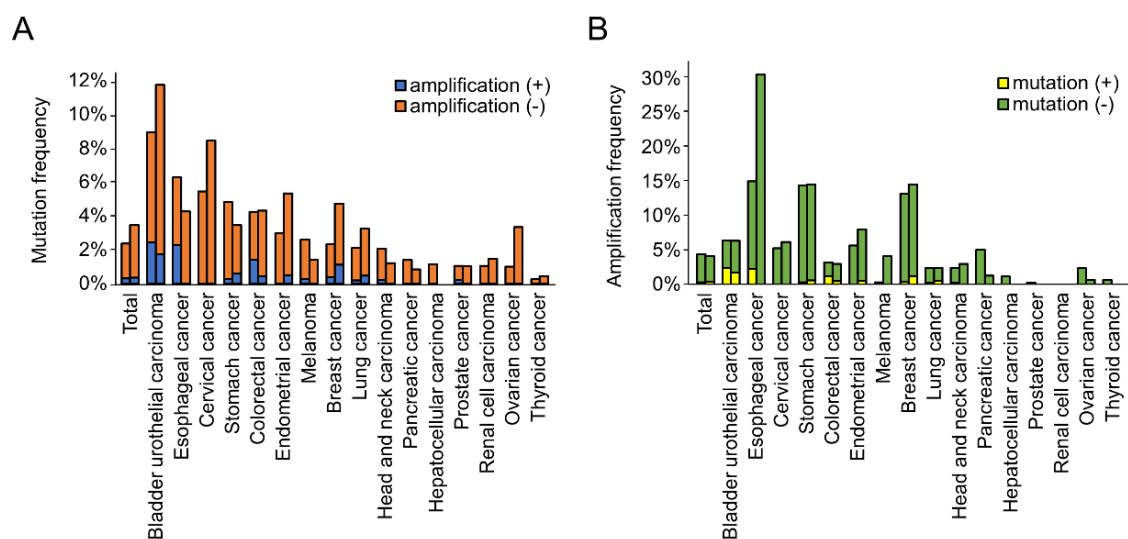


図 7 *ERBB2* 遺伝子変異と遺伝子増幅の癌腫別頻度

- (A) *ERBB2* 遺伝子変異の頻度。左列が TCGA で、右列が MSK-IMPACT。青色は遺伝子増幅陽性例、オレンジは遺伝子増幅陰性例を表す。
- (B) *ERBB2* 遺伝子増幅の頻度。黄色は遺伝子変異陽性例、緑色は遺伝子変異陰性例を表す。

## ERBB2 遺伝子変異の機能解析

各変異遺伝子が形質転換能を有するかどうかを MANO 法で評価した。各 ERBB2 遺伝子変異を有する 3T3 細胞、Ba/F3 細胞の相対的な割合が Day 0 から Day 12 までどのように変化したのかを表したものが図 8 である。

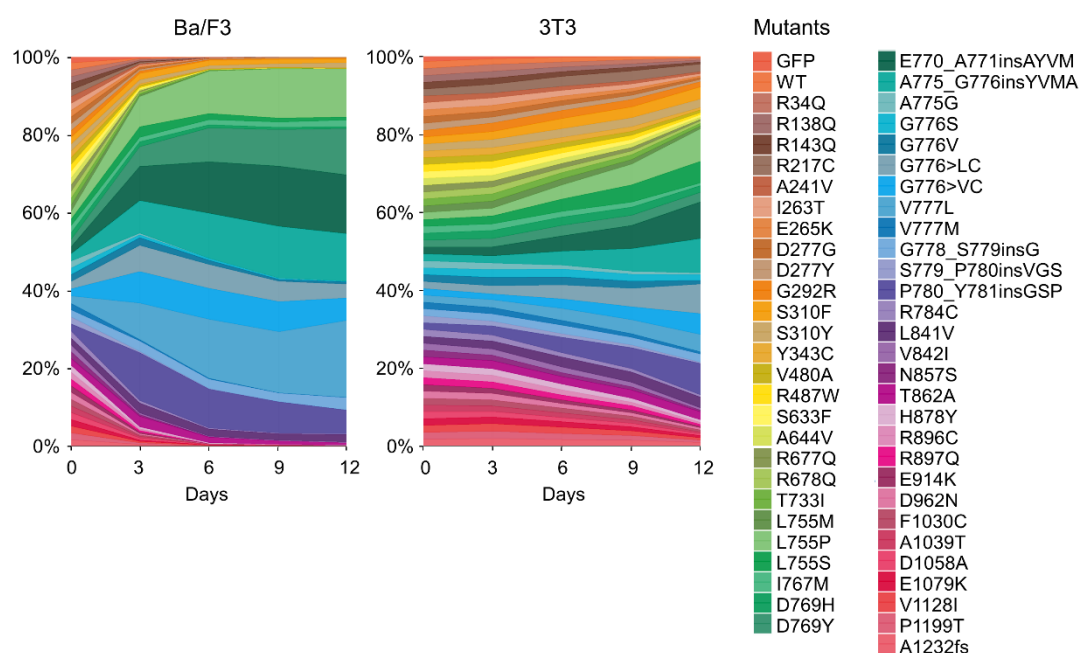
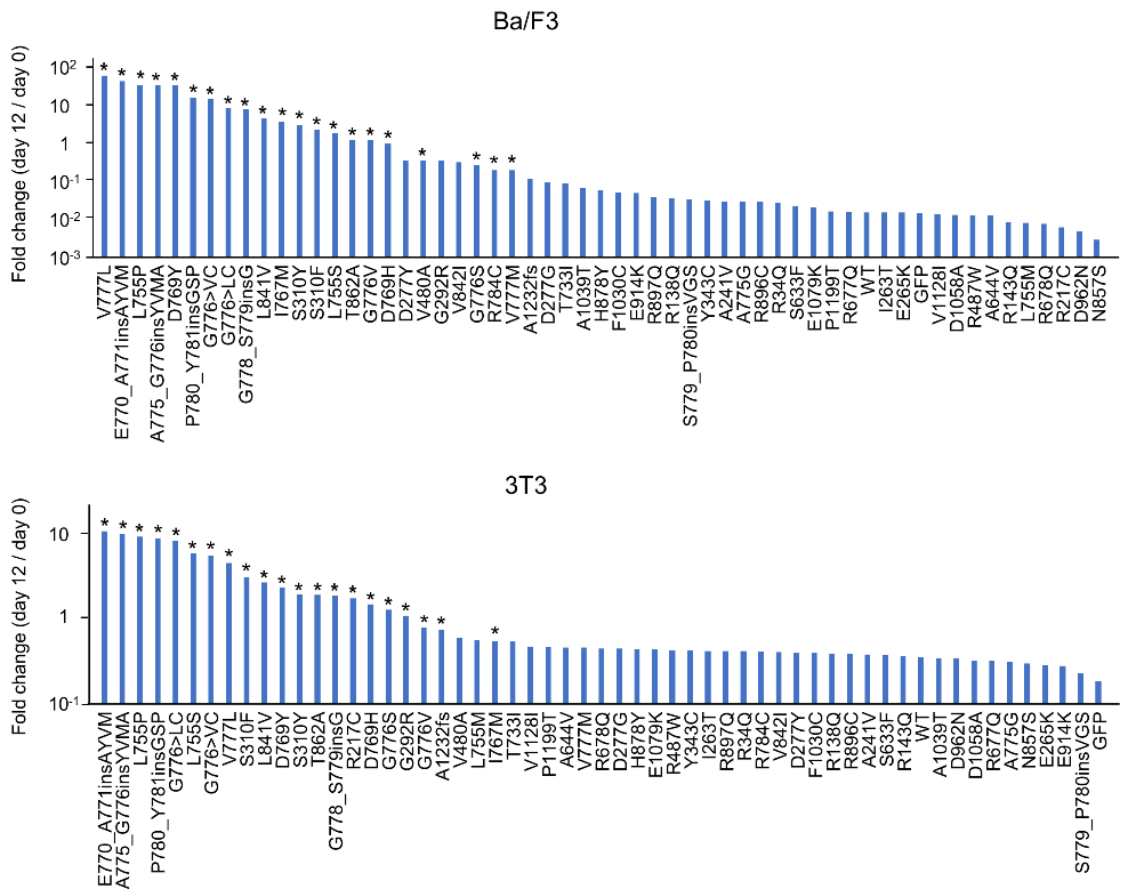


図 8 各 ERBB2 変異の割合の経時的変化

横軸は日数を示しており、3 日毎に各 ERBB2 遺伝子変異を有するアッセイ細胞の相対的な割合を計算した。縦軸は全体を 100%として各 ERBB2 遺伝子変異の割合を示している。

Day 0 をコントロールとして各変異の Day 12 におけるバーコード数の fold change を表したものが、図 9 である。18 種類の ERBB2 遺伝子変異が 3T3 細胞および Ba/F3 細胞の両方で形質転換能を有すると考えられ (図 10)、G776V、G778\_S779insG、L841V はこれまでに報告のない変異であった。



\*  $p < 0.05$

図9 各 ERBB2 変異の Day 12 における fold change

縦軸は各変異の Fold change を示しており、横軸は各変異を Fold change の大きい順に並べている。この Fold change の計算は triplicate で行っており、ERBB2 野生型の fold change と比較して統計学的に有意差があった変異は\*印で示している。

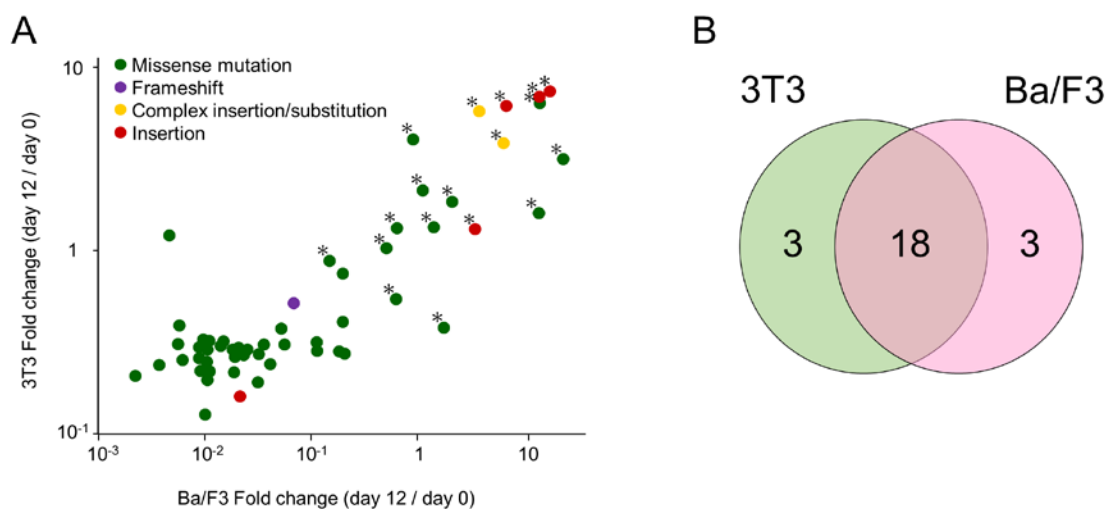


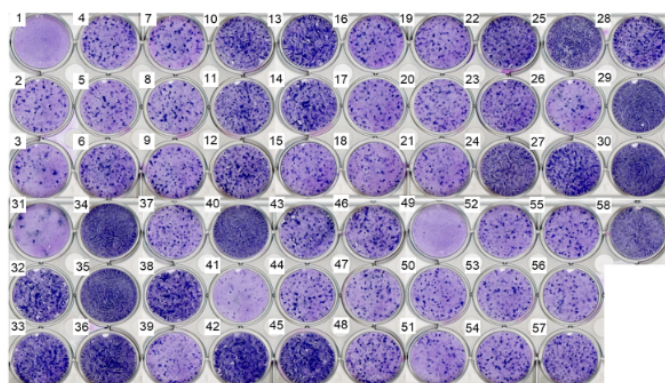
図 10 形質転換能を有する ERBB2 遺伝子変異

- (A) 縦軸は Ba/F3 細胞での各変異の Fold change を、横軸は 3T3 細胞での Fold change を示す。図 9 において ERBB2 野生型と比較して Fold change に有意差があった変異の中で、3T3、Ba/F3 両細胞で形質転換能を有すると判断された変異については\*印で示す。
- (B) それぞれのアッセイ細胞で形質転換能を有すると判断された変異数を示す。

3T3 細胞を使ったフォーカスフォーメーションアッセイでも ERBB2 遺伝子変異の形質転換能を評価した (図 11A)。Image J を用いてギムザ染色された面積を計算したところ、MANO 法で得られた Fold change (図 9) と同様の結果が得られた (図 11B)。



A



|    |                  |    |                 |
|----|------------------|----|-----------------|
| 1  | GFP              | 31 | A775G           |
| 2  | WT               | 32 | G776S           |
| 3  | R34Q             | 33 | G776V           |
| 4  | R138Q            | 34 | G776>LC         |
| 5  | R143Q            | 35 | G776>VC         |
| 6  | R217C            | 36 | V777L           |
| 7  | A241V            | 37 | V777M           |
| 8  | I263T            | 38 | G778_S779insG   |
| 9  | E265K            | 39 | S779_P780insVGS |
| 10 | D277G            | 40 | P780_Y781insGSP |
| 11 | D277Y            | 41 | R784C           |
| 12 | G292R            | 42 | L841V           |
| 13 | S310F            | 43 | V842I           |
| 14 | S310Y            | 44 | N857S           |
| 15 | Y343C            | 45 | T862A           |
| 16 | V480A            | 46 | H878Y           |
| 17 | R487W            | 47 | R896C           |
| 18 | S633F            | 48 | R897Q           |
| 19 | A644V            | 49 | E914K           |
| 20 | R677Q            | 50 | D962N           |
| 21 | R678Q            | 51 | F1030C          |
| 22 | T733I            | 52 | A1039T          |
| 23 | L755M            | 53 | D1058A          |
| 24 | L755P            | 54 | E1079K          |
| 25 | L755S            | 55 | V1128I          |
| 26 | I767M            | 56 | P1199T          |
| 27 | D769H            | 57 | A1232fs         |
| 28 | D769Y            | 58 | EGFR_L858R      |
| 29 | E770_A771insAYVM |    |                 |
| 30 | A775_G776insYVMA |    |                 |

B

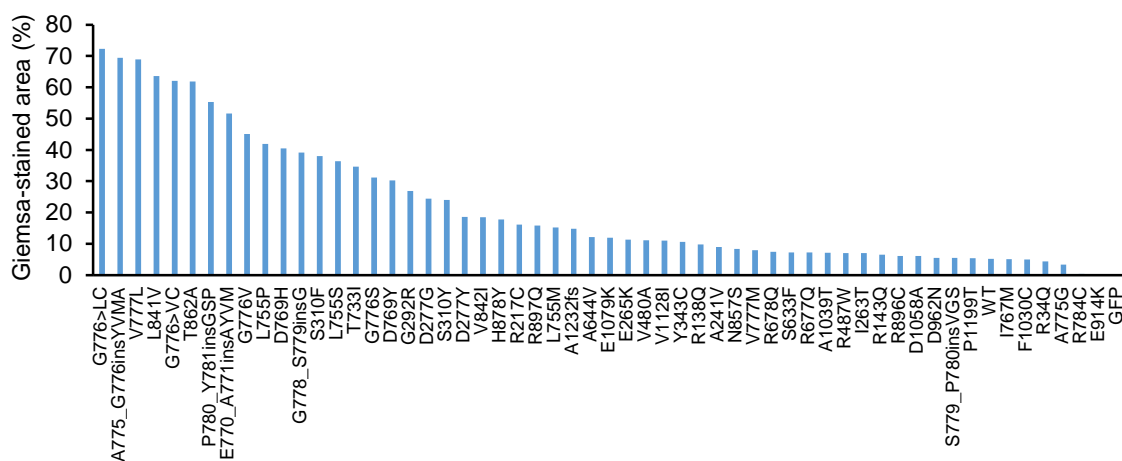


図 11 3T3 細胞でのフォーカスフォーメーションアッセイ

- (A) 右表に示されている各変異をレトロウイルスで感染させた 3T3 細胞を 5%ウシ血清で 14 日間培養し、ギムザ液にて染色を行った。
- (B) Image J を用いて染色された面積を計算し、染色面積が大きい変異順に並べた。

## *in vitro*での ERBB2 変異の薬剤感受性評価

薬剤感受性を評価するため、57 種類の異なる遺伝子変異を発現する Ba/F3 細胞を 6 種類の分子標的薬（トラスツズマブ、ラパチニブ、サピチニブ、アファチニブ、ネラチニブ、オシメルチニブ）で治療した。A775G、E914K 変異は Ba/F3 細胞が形質転換しなかった（IL-3 非依存性に増殖しなかった）ため、解析から除外した。それぞれの遺伝子変異が薬剤に対して感受性があるかどうかの評価は、これまでの研究報告を参考に IC<sub>50</sub> 値を元にして表 2 のように規定することとした [7, 17, 19, 25, 32, 38]。

表 2 各薬剤に対する感受性の基準値

|             | トラスツズマブ                                 | ラパチニブ                                | サピチニブ                                 |
|-------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 感受性良好       | IC <sub>50</sub> < 1 ug/ml              | IC <sub>50</sub> < 50 nM             | IC <sub>50</sub> < 100 nM             |
| 感受性<br>やや不良 | 1 ug/ml ≤ IC <sub>50</sub><br>≤ 5 ug/ml | 50 nM ≤ IC <sub>50</sub><br>≤ 100 nM | 100 nM ≤ IC <sub>50</sub><br>≤ 500 nM |
| 明らかな耐性      | IC <sub>50</sub> > 5 ug/ml              | IC <sub>50</sub> > 100 nM            | IC <sub>50</sub> > 500 nM             |
|             |   |                                      |                                       |
|             | アファチニブ                                  | ネラチニブ                                | オシメルチニブ                               |
| 感受性良好       | IC <sub>50</sub> < 1 nM                 | IC <sub>50</sub> < 1 nM              | IC <sub>50</sub> < 50 nM              |
| 感受性<br>やや不良 | 1 nM ≤ IC <sub>50</sub><br>≤ 10 nM      | 1 nM ≤ IC <sub>50</sub><br>≤ 10 nM   | 50 nM ≤ IC <sub>50</sub><br>≤ 100 nM  |
| 明らかな耐性      | IC <sub>50</sub> > 10 nM                | IC <sub>50</sub> > 10 nM             | IC <sub>50</sub> > 100 nM             |

図 12 に示すように、野生型 ERBB2 は 6 種類すべての薬剤に感受性を示した。EGFR L858R はアファチニブ・ネラチニブ・オシメルチニブに感受性を示す一方、EGFR T790M\_L858R はオシメルチニブのみに感受性があり、EGFR T790M\_C797S は

すべての薬剤に耐性であった。これらは、MANO 法で得られた結果が妥当なものであることを示している。細胞外ドメインと C 末端ドメインに存在する ERBB2 変異はトラスツズマブが奏功したが、チロシンキナーゼドメインに存在する ERBB2 変異はこのモノクローナル抗体に耐性であった。さらに、L755P/S 変異はラパチニブに対して耐性を示すことが従来から報告されており、今回の結果も同様であった。E770\_A771insAYVM、A775\_776insYVMA、G776>LC、G776>VC、S779\_P780insVGS、V842I 変異もラパチニブ耐性であった [38, 39]。多くの ERBB2 変異はサピチニブに対する IC<sub>50</sub> 値が 100 nmol/L 以上であり、感受性に乏しいことがわかった。アファチニブとネラチニブはほとんどの変異に奏功するが、L755P 変異にのみやや耐性を示した。オシメルチニブに関しては、各遺伝子変異を有する Ba/F3 細胞の IC<sub>50</sub> 値が EGFR T790M\_L858R (5.8 nmol/L)、野生型 EGFR (752 nmol/L)、野生型 ERBB2 (10.4 nmol/L)であることを考慮すると [32, 40]、L755P 変異含めた多くの ERBB2 変異に対して有効であることがわかった。しかし、E770\_A771insAYVM、A775\_776insYVMA を含むエクソン 20 挿入変異に対しては感受性に乏しかった。

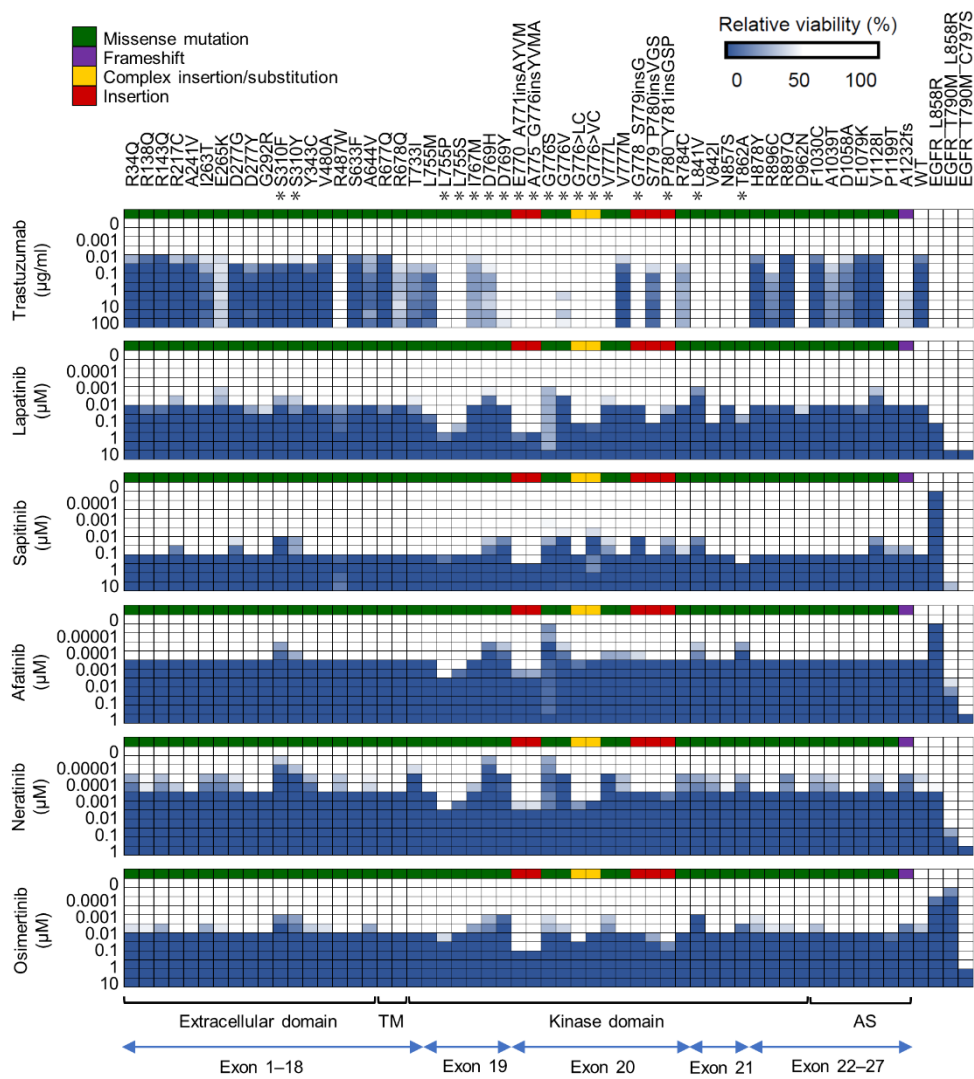


図 12 MANO 法による ERBB2 変異の薬剤感受性試験

縦軸は各薬剤の濃度を示しており、下に行くほど濃度が高くなっている。横軸は各変異を示しており、\*印は MANO 法で形質転換能があると判断された変異である。薬剤を加えない場合と比較して細胞数が 50%以上減少している場合は青色で表示され、減少割合が高くなるほど青色が濃くなる。

アフアチニブ・ネラチニブ・オシメルチニブは、多くの ERBB2 変異に有効な薬剤であると考えられたため、アラマーブルー法を用いてさらに詳細な薬剤感受性評価を行った (図 13)。EGFR L858R はこれら 3 種類の分子標的薬全てに感受

性を示し、TKI 耐性であることが知られている ERBB2 T798I\_C805S、EGFR T790M\_C797S は3 薬剤ともに耐性であることが示された。ERBB2 L755P 変異に対するアファチニブ・ネラチニブの IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 8.94 nmol/L、7.03 nmol/L であり、他の ERBB2 変異と比較して高値であった。対照的に、オシメルチニブでは ERBB2 A775\_776insYVMA 変異に対する IC<sub>50</sub> 値が 170 nmol/L であり、L755P 変異を含めた他の ERBB2 変異よりもきわめて高い値となった。

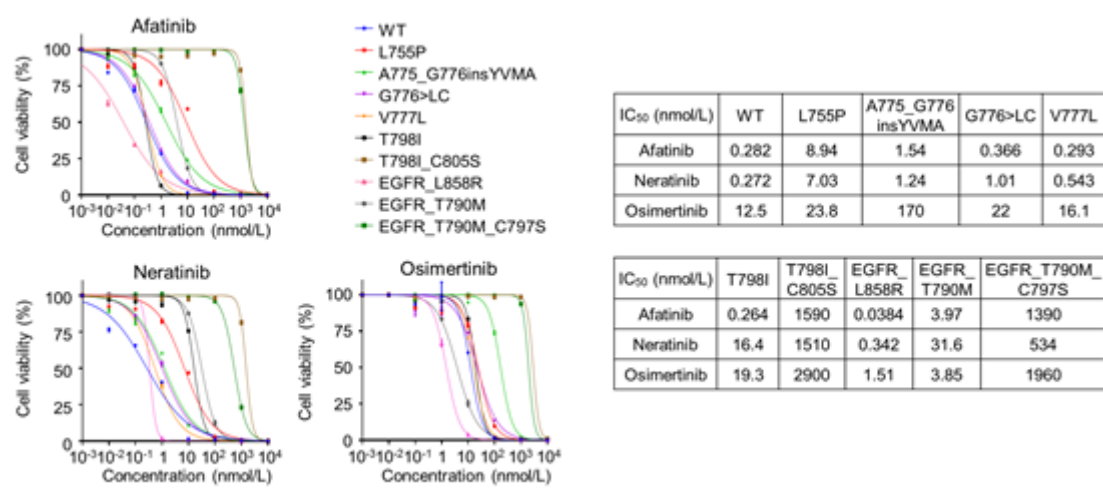
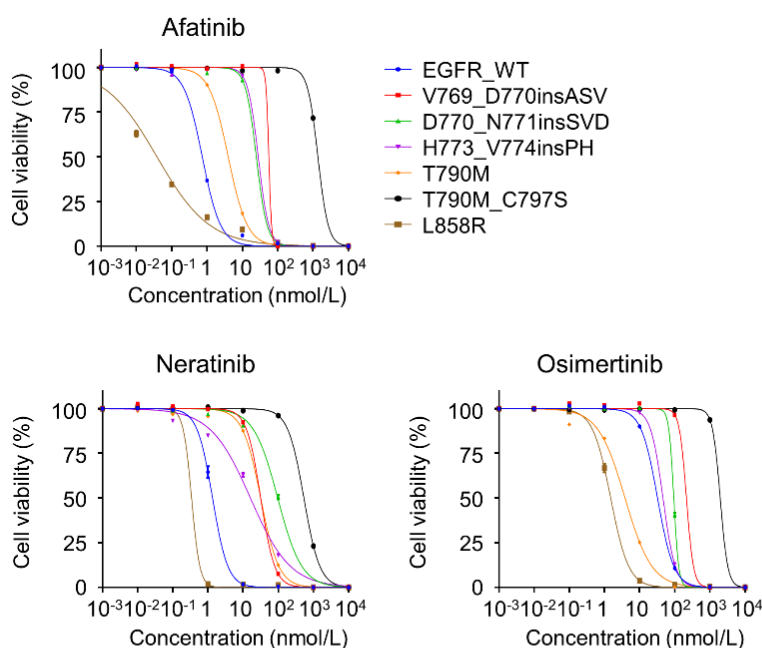


図 13 アラマーブルー法による ERBB2 変異の薬剤感受性試験

左図の縦軸は細胞の生存率を示しており、横軸は各薬剤の濃度を示している。右表は各変異の IC<sub>50</sub> 値を示す。

アファチニブやオシメルチニブは一般には EGFR 変異に対して使用される薬剤であるため、EGFR 変異についてもアラマーブルー法で同様に薬剤感受性試験を行い、ERBB2 変異の結果と比較した。既報と同様 [7, 41]、ERBB2 エクソン 20

挿入変異に対するアファチニブ・ネラチニブの IC<sub>50</sub> 値は EGFR エクソン 20 挿入変異に対する IC<sub>50</sub> 値よりも低かったが、一方で、ERBB2 A775\_776insYVMA に対するオシメルチニブの IC<sub>50</sub> 値は EGFR V769\_D770insASV と同程度であり、他の EGFR エクソン 20 挿入変異に対する IC<sub>50</sub> 値よりも高いという結果であった (図 14)。



| IC <sub>50</sub> (nmol/L) | EGFR_WT | V769_D770insASV | D770_N771insSVD | H773_V774insPH | T790M | T790M_C797S | L858R  |
|---------------------------|---------|-----------------|-----------------|----------------|-------|-------------|--------|
| Afatinib                  | 0.733   | 55.8            | 24.7            | 28.1           | 3.97  | 1390        | 0.0384 |
| Neratinib                 | 1.35    | 31.6            | 96.3            | 16.1           | 31.6  | 534         | 0.342  |
| Osimertinib               | 32.4    | 215             | 94.0            | 46.3           | 3.85  | 1960        | 1.51   |

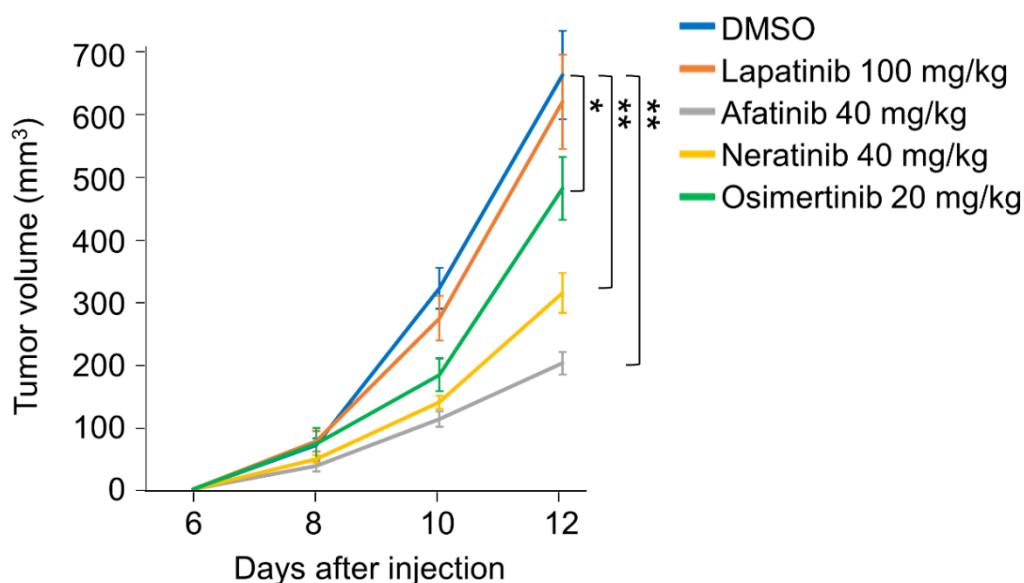
図 14 3 薬剤に対する各 EGFR 変異の薬剤感受性試験

図の縦軸は細胞の生存率を示しており、横軸は各薬剤の濃度を示している。下表は各変異の IC<sub>50</sub> 値を示す。

### *in vivo*での ERBB2 変異の薬剤感受性評価

表 1 に示した GFP、野生型 ERBB2、55 種類の ERBB2 変異、3 種類の EGFR 変異、合計 60 種類の遺伝子をそれぞれ発現している 3T3 細胞を等量ずつ混ぜてモード

マウスの皮下に en bloc 注射した。2 日毎に 2%DMSO、ラパチニブ (100 mg/kg)、アファチニブ (40 mg/kg)、ネラチニブ (40 mg/kg)、オシメルチニブ (20 mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与し (各群 10 匹ずつ)、12 日間治療を行った。トラスツズマブとサピチニブについては、*in vitro* での MANO 法を用いた薬剤感受性試験において ERBB2 変異に対する効果が概して弱かったことから、*in vivo* でのさらなる検討は行わないこととした。図 15 に示すように、コントロール群と比較してアファチニブ・ネラチニブ・オシメルチニブ群は 12 日後の腫瘍体積が有意に減少していたが、ラパチニブ群は有意差を認めなかった。



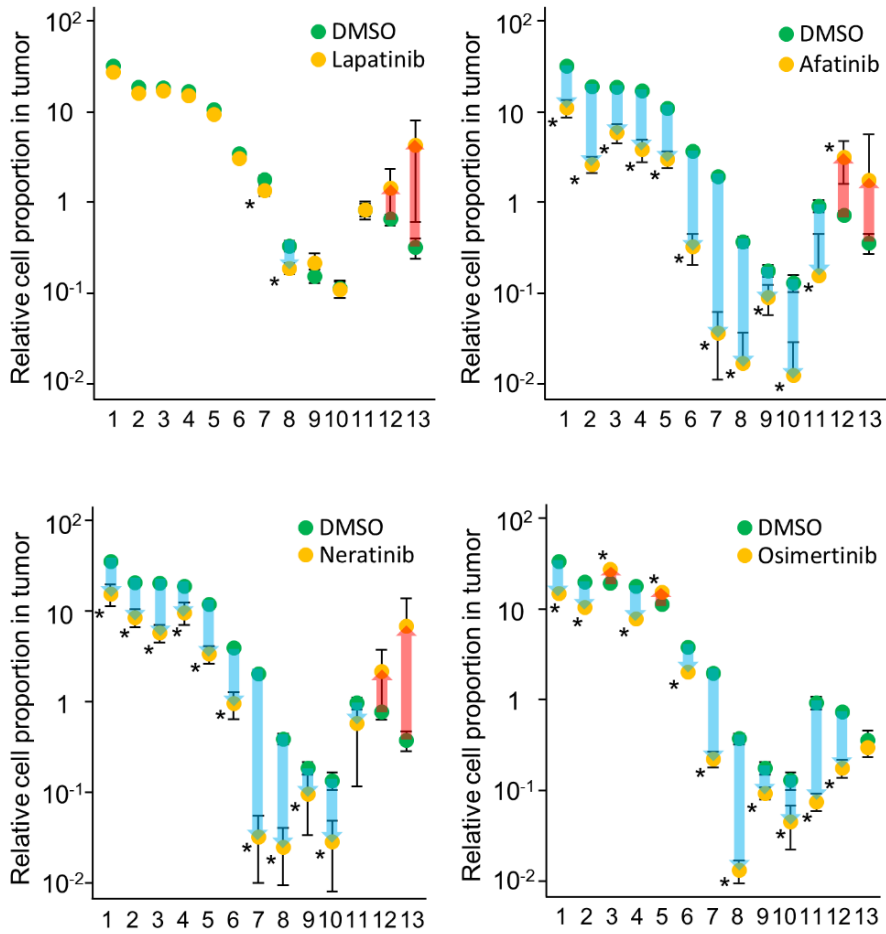
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

図 15 腫瘍体積の推移

縦軸は腫瘍の体積を、横軸は細胞を皮下注射してからの日数を示す。Day12において、DMSO 群と比較して統計学的に腫瘍体積の有意な減少を認めた群を\*印で示す。Error bars は標準偏差を示す

12 日目にマウスから腫瘍を摘出し、MANO 法を用いてそれぞれの変異を発現する細胞の相対的な割合を計算した。コントロール群で 13 種類の変異が全体の割合の 1%以上を占めており、評価しうると判断した。そこで、この 13 種類の変異について各治療群での相対的な割合をそれぞれ比較した (図 16)。ラパチニブ群では ERBB2 V777L、L841V 変異の 2 種類のみ相対的な割合がコントロール群と比較して有意に低下しており、薬が奏功していると考えられた。アファチニブとネラチニブの各群では、EGFR T790M\_L858R、T790M\_C797S 変異で割合が上昇しているのに対し、ERBB2 変異はすべて有意に割合が低下していた。オシメルチニブ群では、ERBB2 E770\_A771insAYVM、A775\_776insYVMA 変異で割合が上昇しており、薬に耐性であると考えられた。





|   |                  |    |                 |    |                  |
|---|------------------|----|-----------------|----|------------------|
| 1 | L755P            | 6  | P780_Y781insGSP | 11 | EGFR_L858R       |
| 2 | G776>VC          | 7  | V777L           | 12 | EGFR_T790M_L858R |
| 3 | A775_G776insYVMA | 8  | L841V           | 13 | EGFR_T790M_C797S |
| 4 | G776>LC          | 9  | L755S           |    |                  |
| 5 | E770_A771insAYVM | 10 | T862A           |    |                  |

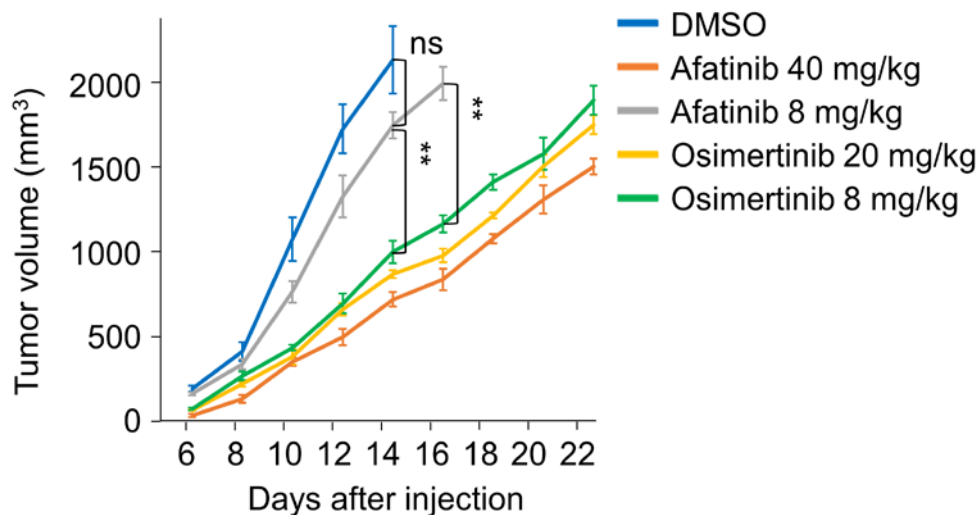
\*  $p < 0.05$

図 16 各変異を発現する細胞の相対的割合の変化

各薬剤で治療した際の各変異の細胞割合の変化を DMSO 群と比較したものである。縦軸は各変異を発現する細胞の相対的な割合を示しており、横軸は各変異の種類を示す。青矢印は DMSO 群と比較して治療群で細胞割合が減少していることを示しており、赤矢印は増加していることを示す。有意な増加・減少を示した変異は\*印で示している。

L755P 変異については、*in vitro* ではアファチニブとネラチニブが感受性に乏しいという結果であったのに対し、*in vivo* では細胞の相対的割合が有意に低

下したという結果であった。これは、*in vivo*での薬剤の血中濃度が高かったことによる違いなのではないかと考え、L755P 変異を有する 3T3 細胞を用いて *in vivo*での腫瘍縮小効果についてアファチニブとオシメルチニブの 2 薬剤を使用してさらなる比較検討を行った。L755P 変異を発現する 3T3 細胞をマウスの皮下に注射し、2 日毎に 2%DMSO、アファチニブ低用量 (8 mg/kg)、アファチニブ高用量 (40 mg/kg)、オシメルチニブ低用量 (8 mg/kg)、オシメルチニブ高用量 (20 mg/kg)をそれぞれ腹腔内投与した (各群 5 匹ずつ)。図 17 に示すように、コントロール群と比較してアファチニブ低用量群は腫瘍体積に有意な低下を認めなかった (それ以外の群はすべて有意に低下していた)。



\*\*  $p < 0.01$

図 17 L755P 変異を発現する 3T3 細胞をマウスに注射した際の腫瘍体積の推移  
縦軸は腫瘍の体積を、横軸は細胞を皮下注射してからの日数を示す。Day14, 16 において、Afatinib 低用量群と比較して Osimertinib 低用量群は統計学的に腫瘍体積の有意な減少を認めた。Error bars は標準偏差を示す

さらに、これらの2薬剤の薬物血中濃度についても測定を行った（図18）。オシメルチニブ低用量（8 mg/kg）を単回投与後に血中濃度を時間ごとに測定したところ、最大濃度  $C_{max} = 230$  nmol/L であり、これは臨床で実際にオシメルチニブをヒトに投与した時の最大濃度とほぼ一致するものであった [42, 43]。これに対して、アファチニブ低用量（8 mg/kg）では最大濃度  $C_{max} = 343$  nmol/L であり、これは臨床でヒトに投与した時の最大濃度よりも若干高い値であった [44, 45]。

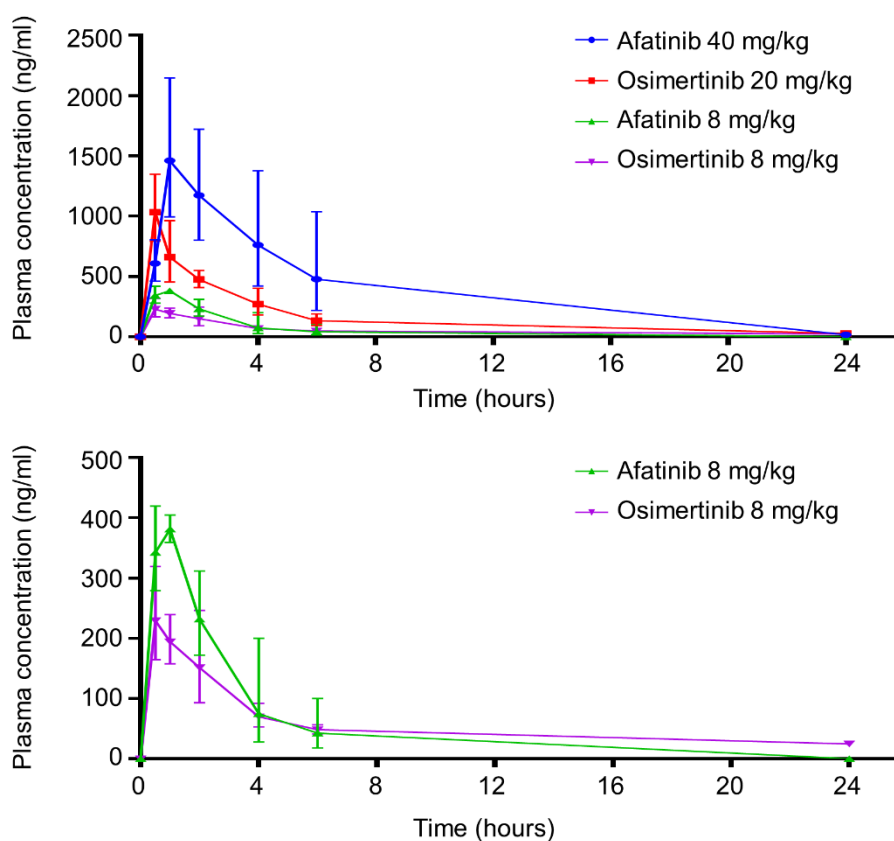


図18 アファチニブとオシメルチニブの血中濃度の推移

縦軸は各薬剤の血中濃度を、横軸は各薬剤をマウスに腹腔内投与してからの時間を示す。

## ERBB2 複合変異 (compound mutation) の解析

同一遺伝子に2つ以上の変異を認めることを複合変異 (compound mutation) と呼ぶ。肺癌における *EGFR* 遺伝子変異陽性症例では、複合変異を 14-30%に認めることが知られており [46, 47]、*ERBB2* 遺伝子にも同様の複合変異が認められるのではないかと推測した。実際、COSMIC データベースで表 2 に示す様な 17 種類の *ERBB2* 複合変異が認められた。

表 2 *ERBB2* 複合変異の種類と癌腫

| Name              | Barcode | Cancer type                  |
|-------------------|---------|------------------------------|
| P39L_G776V        | CAACAT  | stomach cancer               |
| G135E_I767M       | CGTGTT  | colorectal cancer            |
| R143Q_D277H_S310F | TGATGT  | bladder urothelial carcinoma |
| D277G_S310F       | TAACTA  | bladder urothelial carcinoma |
| D277Y_S310Y       | TACAGT  | bladder urothelial carcinoma |
| S310F_T733I       | TTCAGT  | bladder urothelial carcinoma |
| S310F_L755S       | TATGTG  | breast cancer                |
| S310F_V777L       | CTGACC  | breast cancer                |
| S310F_V842I       | TTGACA  | breast cancer                |
| S310Y_G660D       | AAAATT  | biliary tract cancer         |
| S310Y_D769Y       | TAGCGT  | colorectal cancer            |
| S656F_I767M       | TATTCA  | bladder urothelial carcinoma |
| I767M_D769Y       | AAGGTT  | breast cancer                |
| R678Q_L755M       | GATTGT  | breast cancer                |
| L755S_V842I       | GGTTCT  | small intestine cancer       |
| L755S_V842I_R897Q | TAGATT  | breast cancer                |
| V777L_V842I       | ATGGAC  | colorectal cancer            |

*S310F* 変異が複合変異の中では一番頻度が多く、COSMIC に登録されている *S310F* 変異陽性の 33 症例中 6 症例が複合変異として存在していた。癌腫別では、乳癌が 6 症例と最も多く、膀胱尿路上皮癌 (5 症例) がそれに続いた。複合変異

の形質転換能についてもフォーカスフォーメーションアッセイ (図 19) と MANO 法 (図 20) を用いて評価を行った。

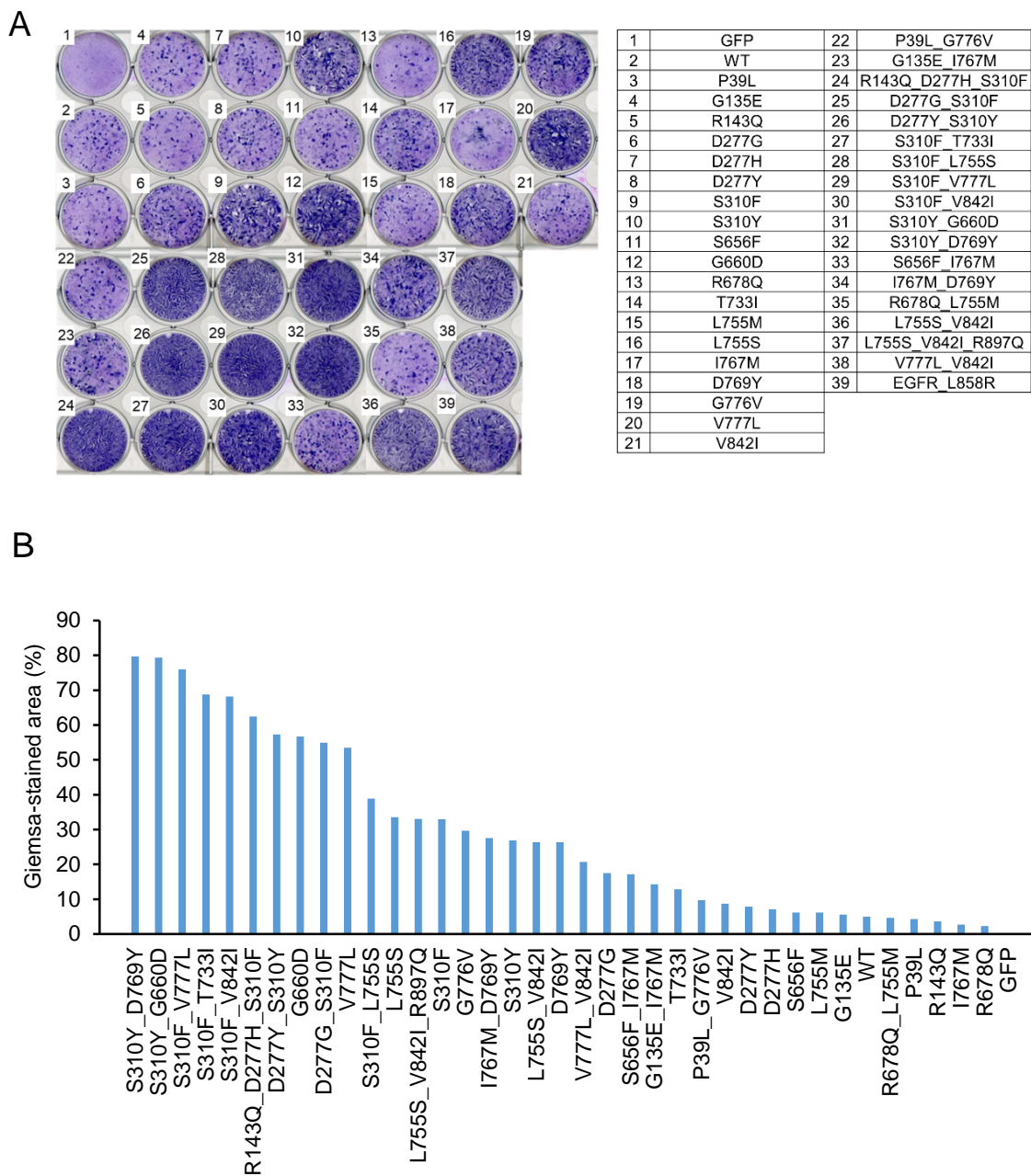


図 19 ERBB2 複合変異のフォーカスフォーメーションアッセイ

(A) 右表に示されている各変異をレトロウイルスで感染させた 3T3 細胞を 5%ウシ血清で 14 日間培養し、ギムザ液にて染色を行った。

(B) Image J を用いて染色された面積を計算し、染色面積が大きい変異順に並べた。

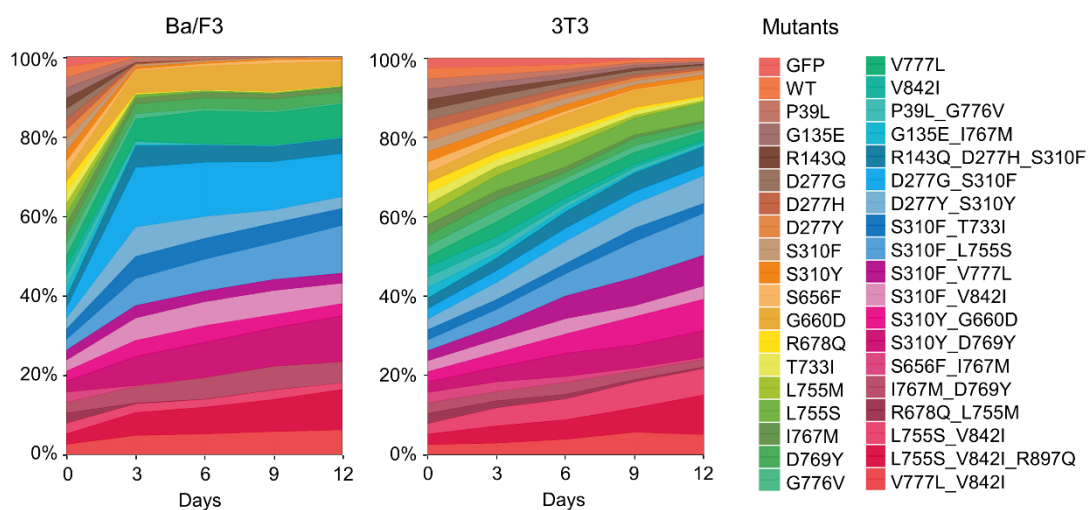
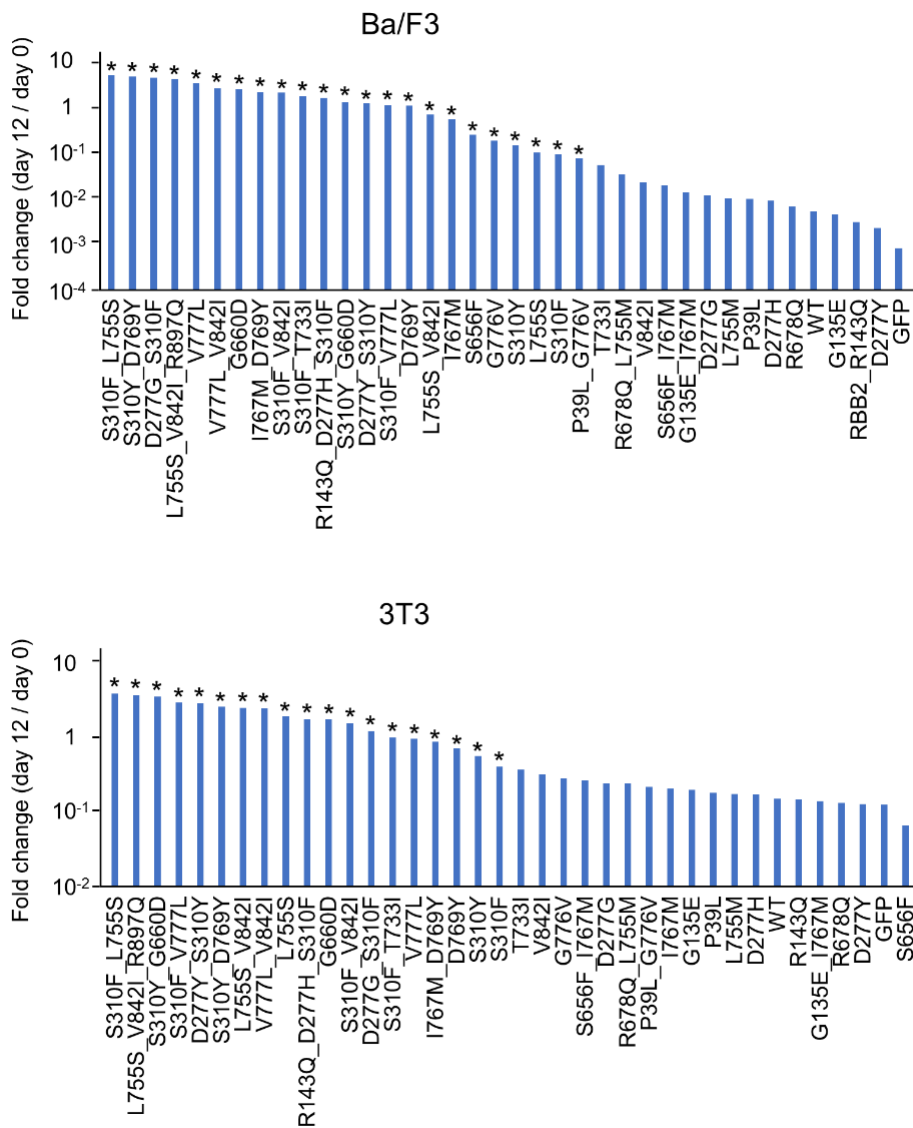


図 20 各 ERBB2 複合変異の割合の経時的変化

横軸は日数を示しており、3 日毎に各 ERBB2 遺伝子変異を有するアッセイ細胞の相対的な割合を計算した。縦軸は全体を 100%として各 ERBB2 遺伝子変異の割合を示している。

Day 0 をコントロールとして各変異の Day 12 におけるバーコード数の fold change を表したものが、図 21 である。ERBB2 複合変異の細胞増殖能は概して単独の ERBB2 変異よりも強い傾向があり、17 種類の複合変異の内、13 種類が 3T3 および Ba/F3 細胞の両方で形質転換能を有すると今回の実験では判断された (図 22)。



\*  $p < 0.05$

図 21 各 ERBB2 複合変異の Day 12 における fold change

縦軸は各変異の Fold change を示しており、横軸は各変異を Fold change の大きい順に並べている。この Fold change の計算は triplicate (N=3)で行っており、ERBB2 野生型の fold change と比較して統計学的に有意差があった変異は\*印で示している。

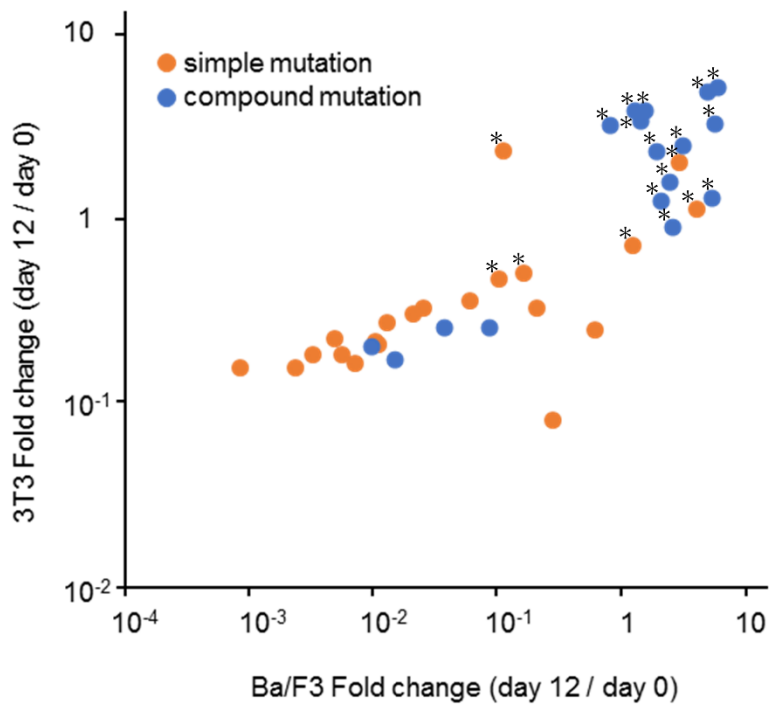


図 22 MANO 法を用いて評価した ERBB2 複合変異の形質転換能

各 ERBB2 変異の fold change を Ba/F3 (横軸)、3T3 (縦軸) としてプロットした図。\*印は両アッセイ細胞で形質転換能を有すると判断された ERBB2 変異を示す。

次に、MANO 法 (図 23) およびアラマーブルー法 (図 24) を用いて ERBB2 複合変異の薬剤感受性評価を行った。G135E、D277H 変異は Ba/F3 細胞が形質転換しなかった (IL-3 非依存性に増殖しなかった) ため、解析から除外した。L755S 変異を有する 3 種類の複合変異のオシメルチニブに対する IC<sub>50</sub> 値は 50 nmol/L 以下であり、野生型 ERBB2 を含めた他の変異と比較しても大きな差はなく、感受性良好であると考えられた。アフアチニブおよびネラチニブでは L755S を含む複合変異の IC<sub>50</sub> 値が 5 nmol/L 以上であり、他の変異と比較して感受性に乏しいことがわかった。



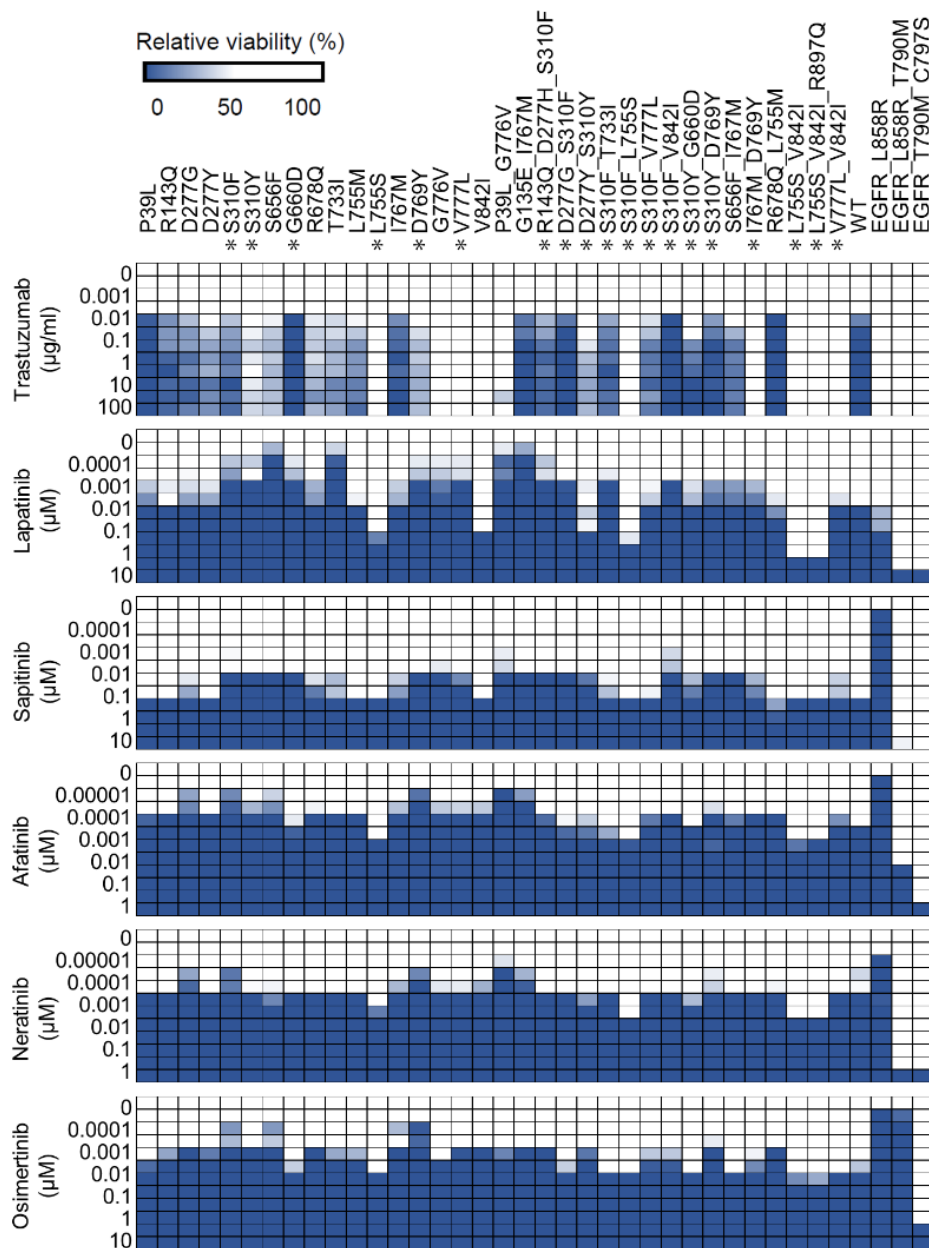
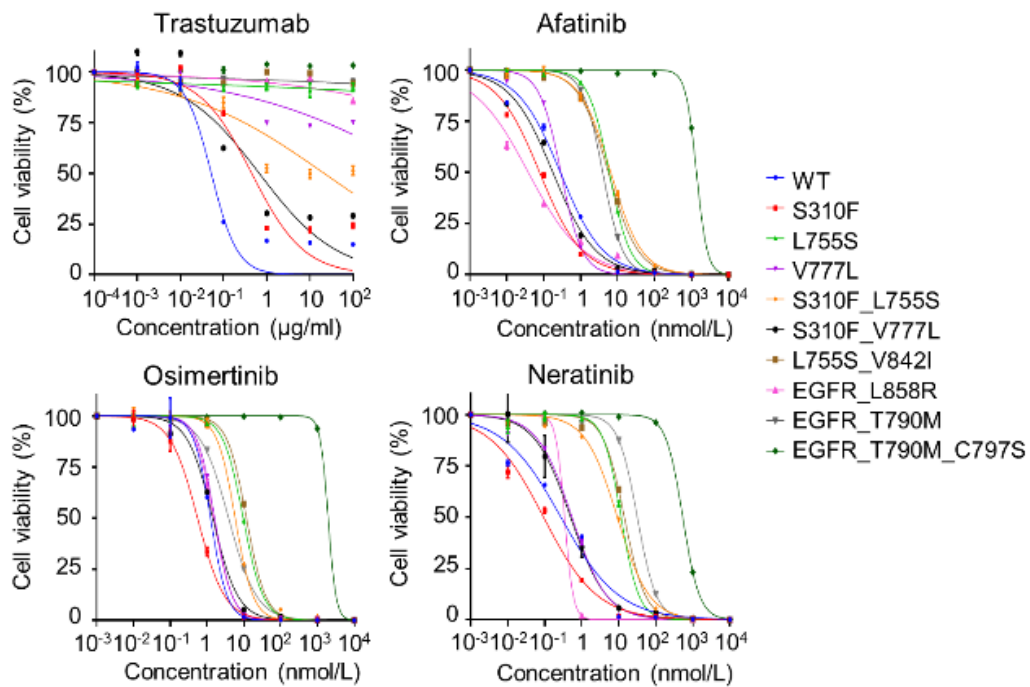


図 23 MANO 法による ERBB2 複合変異の薬剤感受性評価

縦軸は各薬剤の濃度を示しており、下に行くほど濃度が高くなっている。横軸は各変異を示しており、\*印は MANO 法で形質転換能があると判断された変異である。薬剤を加えない場合と比較して細胞数が 50%以上減少している場合は青色で表示され、減少割合が高くなるほど青色が濃くなる。



| IC <sub>50</sub> | WT     | S310F  | L755S | V777L | S310F_L755S | S310F_V777L | L755S_V842I | EGFR_L858R | EGFR_T790M | EGFR_T790M_C797S |
|------------------|--------|--------|-------|-------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------------|
| Trastuzumab      | 0.0521 | 0.450  | -     | -     | 21.5        | 0.38        | -           | -          | -          | -                |
| Afatinib         | 0.283  | 0.0778 | 5.95  | 0.293 | 6.55        | 0.178       | 5.64        | 0.0384     | 3.97       | 1390             |
| Neratinib        | 0.272  | 0.0927 | 9.55  | 0.543 | 9.12        | 0.499       | 14.1        | 0.342      | 31.6       | 534              |
| Osimertinib      | 1.25   | 0.551  | 9.64  | 1.61  | 5.82        | 1.43        | 11.8        | 1.51       | 3.85       | 1960             |

図 24 アラマーブルー法による ERBB2 複合変異の薬剤感受性評価

図の縦軸は細胞の生存率を示しており、横軸は各薬剤の濃度を示している。下表は各変異の IC<sub>50</sub> 値を示す。

さらに、MANO 法の結果から ERBB2 の単独変異と複合変異でトラスツズマブに対する感受性が大きく異なると予想されたものについて、アラマーブルー法で詳しく評価したのが図 25 であり、S310 変異を有する複合変異はトラスツズマブの薬剤感受性が単独変異と比べて様々に変化することがわかった。特に、トラスツズマブに耐性のキナーゼドメインの変異が S310 変異と複合変異を形成することで感受性が若干ではあるものの改善することが示唆された。

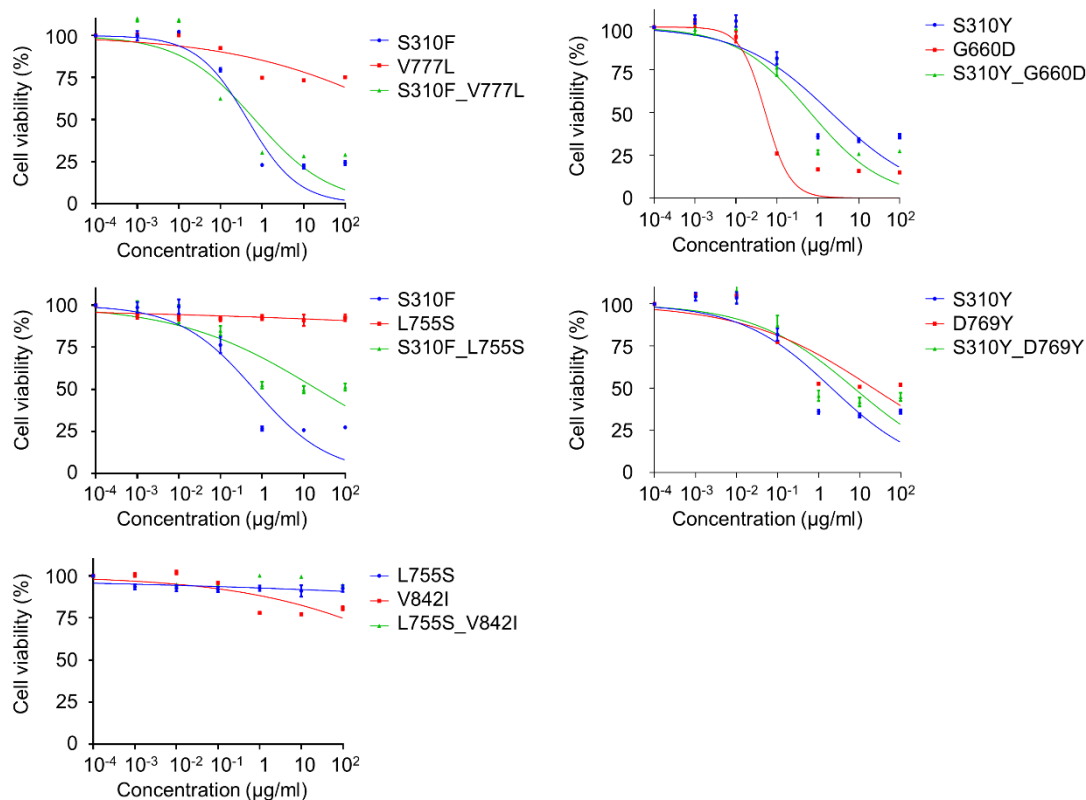


図 25 ERBB2 変異に対するトラスツズマブの薬剤感受性試験

図の縦軸は細胞の生存率を示しており、横軸は各薬剤の濃度を示している。

### ERBB2 変異の薬剤感受性のまとめ

図 26 は、これまでの結果を踏まえて ERBB2 変異に対する分子標的薬の薬剤感受性の結果をまとめたものである。トラスツズマブとラパチニブは細胞外ドメインに存在する多くの ERBB2 変異に対しては奏功するが、チロシンキナーゼドメインに存在する ERBB2 変異の多くには効果が乏しかった。サピチニブに関しては、明らかな耐性変異は認められなかったが、全体的に ERBB2 変異に対する感受性が乏しい傾向を認めた。アファチニブとネラチニブは、大多数の ERBB2 変

異に対して良好な感受性を示したが、L755 変異を含めたいくつかの変異に対しては感受性にやや乏しいという結果であった。オシメルチニブはL755 変異を含めた多くの ERBB2 変異に奏功すると考えられたが、E770\_A771insAYVM と A775\_776insYVMA 変異に対しては耐性を示した。

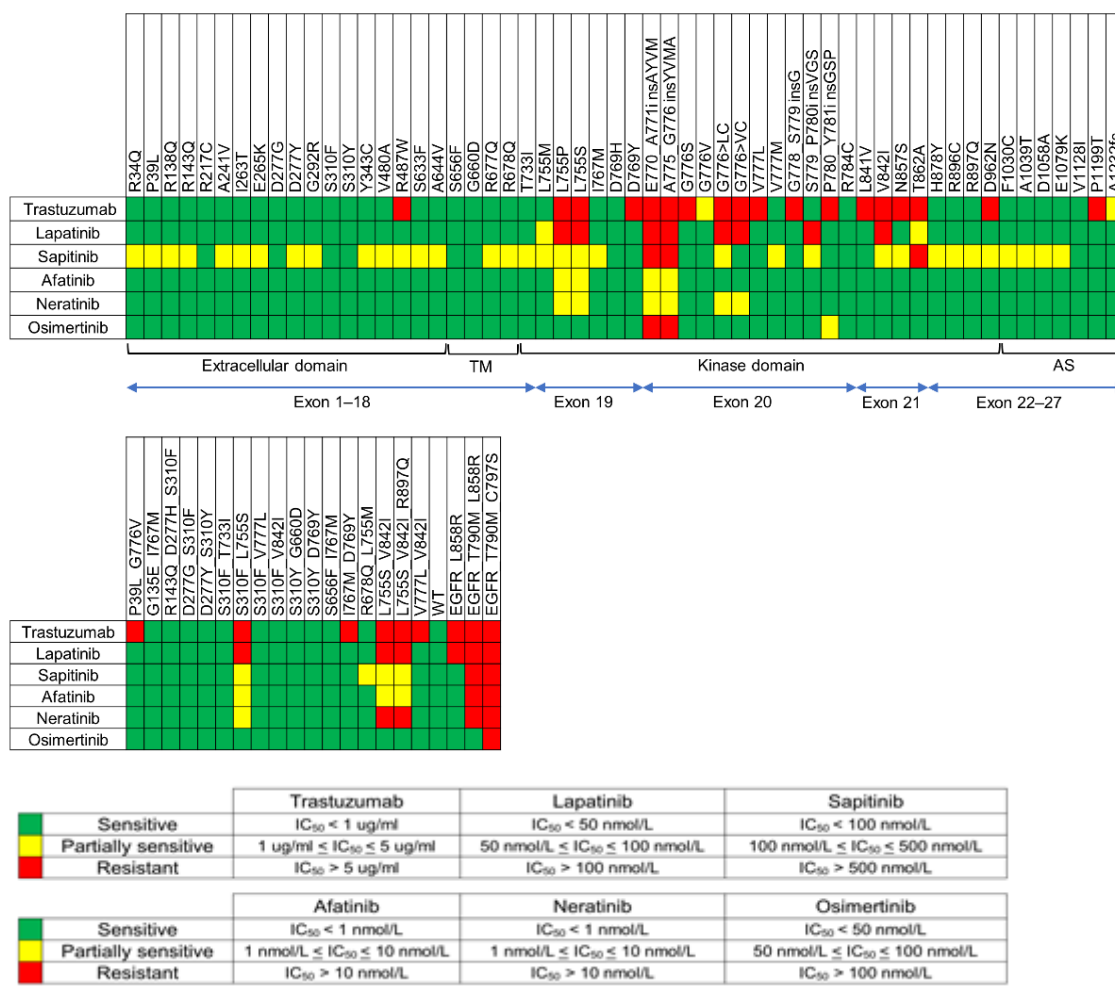


図 26 ERBB2 変異の薬剤感受性まとめ

各 ERBB2 変異の分子標的薬に対する感受性をまとめたのが上図である。緑色は感受性あり、黄色は感受性にやや乏しい、赤色は耐性であることを示す。感受性の有無は各薬剤の濃度と各変異の  $IC_{50}$  値に基づいて判定を行った(下図)。

## 考察

今回の実験において 3T3 および Ba/F3 細胞の両方で形質転換能が確認された 18 種類の ERBB2 変異の内、16 種類 (89%) はチロシンキナーゼドメインに存在した。これまでの研究結果からトラスツズマブとラパチニブはチロシンキナーゼドメインに存在する ERBB2 変異に対して感受性に乏しいということがわかっており [48, 49]、形質転換能のある ERBB2 変異を有する癌に対する治療としては、トラスツズマブとラパチニブは推奨されないと考える。最近報告された MyPathway というバスケット型試験でも、*ERBB2* 変異を有する癌患者 36 例のうち、トラスツズマブとペルツズマブの 2 剤併用療法が奏功したのは 4 例のみ (11%) であった [50]。また、*ERBB2* 遺伝子増幅を示す癌に対してトラスツズマブやラパチニブを使用する際には、*ERBB2* 変異の有無について評価することが必要であると考え [51]。膀胱尿路上皮癌においては、*ERBB2* 遺伝子増幅と変異を同時に有する症例の割合が他の癌腫と比較して高いため特に注意を要する。実際、MSK-IMPACT データベースに登録されている *ERBB2* 遺伝子増幅と遺伝子変異が共に陽性の 41 例の内、19 例 (46. 3%) はトラスツズマブに耐性の *ERBB2* 変異を有しており、ラパチニブについても 12 例 (29. 2%) が感受性に乏しい *ERBB2* 変異であった。

アフアチニブ、ネラチニブ、オシメルチニブの 3 薬剤については、今回の実験

から ERBB2 変異の大多数について奏功することが示されたが、L755 変異やエクソン 20 挿入変異などいくつかの ERBB2 変異では薬剤ごとに異なる感受性を示すことがわかった。これまでの研究結果では、アファチニブとネラチニブは L755 変異に対して奏功するとされてきたが [19, 26, 52]、今回の実験では、これらの 2 薬剤に対する L755 変異の IC<sub>50</sub> 値は、他の ERBB2 変異よりも高いことが示された。また、*in vivo* でもアファチニブ低用量 (8 mg/kg) では L755P 変異を有する腫瘍の抑制効果は認められなかったことから、アファチニブやネラチニブは L755 変異に対して薬剤感受性が乏しい可能性が示唆された。SUMMIT トライアルでは、L755S 変異を有する乳癌におけるネラチニブによる腫瘍縮小率が S310、V777、エクソン 20 挿入変異と比較して悪い傾向にあり、同様の臨床試験 (Muther トライアル) でもネラチニブの L755S 変異陽性症例に対する奏効率は悪かった (1 人 PR、1 人 SD、4 人 PD) [53]。対照的に、オシメルチニブに対する L755 変異の IC<sub>50</sub> 値は、野生型 ERBB2 よりも低く、他の感受性良好な ERBB2 変異 (S310F や V777L など) と同様の値であったことから、オシメルチニブは L755 変異に対して奏功する可能性が高いことが示唆された。*in vivo* 実験でも低用量のオシメルチニブ (8 mg/kg) は L755P 変異を有する腫瘍に対して有意な増殖抑制効果を示しており、オシメルチニブは L755 変異を有する癌に対する有用な分子標的薬になりうると思われた。トラスツズマブによる加療後の耐性獲得変異として

L755S 変異の出現が近年報告され問題となっていており [33]、オシメルチニブは重要な治療薬となりうるかもしれない。

一方で、E770\_A771insAYVM、A775\_776insYVMA 変異がオシメルチニブに対して耐性を示すことは注意すべきである。実際に、AURA study という EGFR 変異陽性肺腺癌に対してオシメルチニブを投与した臨床試験で、1 人ではあるが耐性獲得変異として *ERBB2* A775\_776insYVMA 変異が治療後に出現したことが報告されている [54]。これに対し、ネラチニブは A775\_776insYVMA 変異の IC<sub>50</sub> 値が 2 nmol/L 以下であり、治療薬として奏功する可能性はある。しかし、野生型 *ERBB2* および野生型 EGFR の IC<sub>50</sub> 値も 0.3 nmol/L、0.7 nmol/L と低値であることを考慮すると、副作用の観点から慎重に評価していく必要がある。SUMMIT トライアルでも、*ERBB2* エクソン 20 挿入変異に対してネラチニブは乳癌に対しては奏功しているが肺癌に対しては効果に乏しかったという結果であり、組織移行性や血中濃度により影響される可能性がある。これはアファチニブに関しても同様であり、いくつかの報告で A775\_776insYVMA 変異に対してアファチニブは有効であると主張されてきたが [25, 41]、A775\_776insYVMA 変異を有する肺癌に対して行われた NICHE トライアルという臨床試験では、奏効率が目標の 50%に届かなかったため打ち切りとなっており [55]、効果があるかどうかは議論の余地がある。今後の臨床試験でのさらなる評価が期待される。

ERBB2 複合変異についての報告はいくつか存在するが [56]、発生頻度を含めて網羅的に ERBB2 複合変異について評価したものは我々が知りうる限り今回が初めてである。ERBB2 変異陽性例の内、複合変異を有する割合は MSK-IMPACT データベースで 6.1%、TCGA データベースで 8.1%という結果であり、複合変異の形質転換能は単独変異よりも概して強い傾向があった。複合変異になる、すなわち 2 つ以上の変異を有することで細胞増殖に有利に働く可能性があることが示唆された。また、今回の実験から、複合変異は分子標的薬に対する効果が単独変異の時と比べて変化するものがいくつか存在するということがわかった。第一に、アファチニブ・ネラチニブに対して感受性良好な単独変異が L755S 変異と複合変異を形成すると耐性化することが示唆された。一方で、オシメルチニブは L755S 変異を有する複合変異に対しても感受性良好であることが今回の実験から明らかとなった。第二に、S310 変異を含む複合変異はトラスツズマブに対して感受性が単独変異と比較して大きく異なる傾向があることが示唆された。トラスツズマブは ERBB2 の細胞外ドメイン IV に結合してリガンド非依存性の 2 量体化を阻害して抗腫瘍効果を示すモノクローナル抗体であり [57, 58]、S310 変異は ERBB2 の細胞外ドメイン II の疎水性相互作用を引き起こすことでリガンド非依存性に 2 量体化を促進するため、トラスツズマブが非常に有効であることが既に報告されている [25]。今回の実験で、トラスツズマブに耐性のキナーゼ



ドメイン変異が S310 変異と複合変異を形成することで感受性が改善した機序としては、S310 変異によりリガンド非依存性の 2 量体化が促進されることでトラスツズマブの ERBB2 への結合も促進され、NK 細胞や単球を中心とした抗体依存性細胞障害作用やエンドサイトーシスが誘導されて細胞増殖シグナルが減少したことが考えられる [58]。ただ、トラスツズマブがどうやって抗腫瘍効果をあらわすのかについては完全に解明されておらず、ERBB2 複合変異への抗腫瘍効果の機序とともに今後研究されるべき課題である。

## 本研究の限界

今回の実験では下記に示すような問題点が挙げられる。まず、*ERBB2* 変異をアッセイ細胞にレトロウイルスで発現させる今回の実験系では、通常の状態と比較して ERBB2 タンパクが過剰発現した状態となるため、特に形質転換能を評価する際には過剰発現している ERBB2 タンパクの影響を考慮しなくてはならない。そこで、今回の実験では *ERBB2* 変異の形質転換能を評価するためのコントロールとして野生型 ERBB2 タンパクを過剰発現している細胞を使用した。第 2 として使用している細胞株の問題がある。今回の実験系で使用したアッセイ細胞である 3T3 細胞や Ba/F3 細胞はマウス由来の細胞株であり、ヒト由来の細胞株は

使用していない。今回の実験でこれらのアッセイ細胞を用いた理由としては、不死化されており増殖能が速いこと、これまでの研究データの蓄積が多く存在すること、形質転換能を持つ遺伝子変異を導入することで速やかに形質転換を起こすため評価が容易であること、などが挙げられる。また、ヒトの組織由来の細胞株（例えば気管支上皮細胞など）は、ヒトテロメア逆転写酵素（hTERT）やサイクリン依存性キナーゼ（CDK4）などを導入して不死化した後に、TP53 のドミナント・ネガティブ変異や EGFR L858R 変異などを導入して初めて形質転換を引き起こすため [59, 60]、実験系の樹立および得られたデータの評価が非常に難しいという問題がある。しかし、MANO 法で得られたデータを臨床応用していくためには、様々なヒト組織由来の細胞株を用いた実験系の確立が重要であり、今後の大きな課題であると考えられる。第 3 に、臨床データが不足している点が挙げられる。特にアファチニブやオシメルチニブは *ERBB2* 変異に対してこれまで大きな臨床試験が行われていないため、SUMMIT トライアルのようなバスケット型試験で評価していくことが望まれる。第 4 に、今回の実験では、*ERBB2* 複合変異が cis 体/trans 体どちらで存在するのかを正確に評価できなかった。これは、今回見つけた複合変異がすべて異なるエクソン上に存在していたためゲノム上での変異同士の距離が遠く、評価が困難であったことに由来する。我々は *EGFR* 複合変異の多くが cis 体で存在することを既に報告しており [7]、*ERBB2* 複合変異に

についても同様に cis 体で存在しているのではないかと推測している。第 5 として、*in vivo* 実験の際に分子標的薬を経口ではなく腹腔内投与した点が挙げられる。多くの分子標的薬は臨床の現場では経口投与されており、今回の質量分析の結果からも、腹腔内投与した場合は血中濃度が経口投与時よりも高い傾向が示唆されている [42, 44]。そのため、今回の実験結果をヒトに応用するには慎重な検討が必要であると考え。最後に、*PIK3CA* や *ERBB3* 変異のような薬剤感受性に影響を与えうると他の変異と、*ERBB2* 変異は併存することが様々な癌腫で知られており [31, 53]、今回の実験ではこれらの他の変異が与えうる影響については評価していない。

## 今後の展望

従来の研究では、一度に機能解析できる遺伝子変異が多くとも 10 種類程度であったが、今回の研究では、MANO 法を用いることで、多数の VUS を含む 55 種類の *ERBB2* 遺伝子変異について形質転換能および薬剤感受性を網羅的に評価することができた。MANO 法の大きなメリットの一つとして、異なるバーコードを持つ遺伝子変異ベクターを作成すれば、100 種類を超える遺伝子変異であってもまとめて機能評価することができる点が挙げられる。今後もクリニカルシーケンスの普及とともに VUS が急速に増加してくることが予想されるため、それらを MANO 法によって迅速に評価し、臨床応用につなげていくことが期待される。また、もう一つの大きな長所として、新規薬剤の有用性について速やかに評価することができるという点が挙げられる。オシメルチニブの *ERBB2* 変異に対する有用性はこれまでほとんど評価されていなかったが、オシメルチニブは L755 変異を含む多くの *ERBB2* 変異に対して有用であることが本研究から示唆され、今後の臨床応用が期待される結果であった。今後開発されてくる新規の分子標的薬についても、MANO 法を用いて耐性変異や感受性変異を速やかにスクリーニングすることで、患者ごとの最適な癌治療を提供することができる可能性を秘めていると考えられた。

## 結論

本研究では、MANO 法という新しいハイスループット機能解析法を用いて ERBB2 遺伝子変異の形質転換能および薬剤感受性評価を網羅的に行うことができた。

MANO 法は、ERBB2 変異を含めた様々ながん原遺伝子変異の機能解析を行う上で実用性の高い方法であると考えられ、個別化医療を実現するため今後のさらなる発展と応用が期待される。

## 謝辞

本研究にあたり、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻呼吸器外科講座  
中島淳教授には、ひとかたならぬご指導ご鞭撻を賜りました。謹んで御礼申し上げ  
ます。

本研究の遂行にあたり、国立がん研究センター研究所細胞情報学分野 間野  
博行先生、高阪真路先生には、多岐にわたる直接的なご指導を頂きました。深く  
感謝申し上げます。

終わりに、様々な点で本研究の遂行にご尽力くださった国立がん研究センタ  
ー研究所細胞情報学分野および東京大学大学院医学系研究科法医学講座の皆様  
に深謝致します。

## 引用文献

1. J. D. Watson, F. H. Crick, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738, 1953.
2. F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467, 1977.
3. A. M. Maxam, W. Gilbert, A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 560–564, 1977.
4. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511, 543–550, 2014.
5. E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor,

- J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzner, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen, J. Szustakowki, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921, 2001.
6. A. Zehir, R. Benayed, R. H. Shah, A. Syed, S. Middha, H. R. Kim, P. Srinivasan, J. Gao, D. Chakravarty, S. M. Devlin, M. D. Hellmann, D. A. Barron, A. M. Schram, M. Hameed, S. Dogan, D. S. Ross, J. F. Hechtman, D. F. DeLair, J. Yao, D. L. Mandelker, D. T. Cheng, R. Chandramohan, A. S. Mohanty, R. N. Ptashkin, G. Jayakumaran, M. Prasad, M. H. Syed, A. B. Rema, Z. Y. Liu, K. Nafa, L. Borsu, J. Sadowska, J. Casanova, R. Bacares, I. J. Kiecka, A. Razumova, J. B. Son, L. Stewart, T. Baldi, K. A. Mullaney, H. Al-Ahmadie, E. Vakiani, A. A. Abeshouse, A. V.



- Penson, P. Jonsson, N. Camacho, M. T. Chang, H. H. Won, B. E. Gross, R. Kundra, Z. J. Heins, H. W. Chen, S. Phillips, H. Zhang, J. Wang, A. Ochoa, J. Wills, M. Eubank, S. B. Thomas, S. M. Gardos, D. N. Reales, J. Galle, R. Durany, R. Cambria, W. Abida, A. Cercek, D. R. Feldman, M. M. Gounder, A. A. Hakimi, J. J. Harding, G. Iyer, Y. Y. Janjigian, E. J. Jordan, C. M. Kelly, M. A. Lowery, L. G. T. Morris, A. M. Omuro, N. Raj, P. Razavi, A. N. Shoushtari, N. Shukla, T. E. Soumerai, A. M. Varghese, R. Yaeger, J. Coleman, B. Bochner, G. J. Riely, L. B. Saltz, H. I. Scher, P. J. Sabbatini, M. E. Robson, D. S. Klimstra, B. S. Taylor, J. Baselga, N. Schultz, D. M. Hyman, M. E. Arcila, D. B. Solit, M. Ladanyi, M. F. Berger, Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 23, 703–713, 2017.
7. S. Kohsaka, M. Nagano, T. Ueno, Y. Suehara, T. Hayashi, N. Shimada, K. Takahashi, K. Suzuki, K. Takamochi, F. Takahashi, H. Mano, A method of high-throughput functional evaluation of EGFR gene variants of unknown significance in cancer. *Sci Transl Med* 9, eaan6566, 2017.
  8. R. Tamaskovic, M. Schwill, G. Nagy-Davidescu, C. Jost, D. C. Schaefer, W. P. Verdurmen, J. V. Schaefer, A. Honegger, A. Pluckthun, Intermolecular biparatopic trapping of ErbB2 prevents compensatory activation of PI3K/AKT via RAS-p110 crosstalk. *Nat Commun* 7, 11672, 2016.
  9. D. J. Slamon, W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, et al., Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (New York, N.Y.)* 244, 707–712, 1989.
  10. S. J. McKenzie, K. A. DeSombre, B. S. Bast, D. R. Hollis, R. S. Whitaker, A. Berchuck, C. M. Boyer, R. C. Bast, Jr., Serum levels of HER-2 neu (C-erbB-2) correlate with overexpression of p185neu in human ovarian cancer. *Cancer* 71, 3942–3946, 1993.
  11. M. F. Press, M. C. Pike, G. Hung, J. Y. Zhou, Y. Ma, J. George, J. Dietz-Band, W. James, D. J. Slamon, J. G. Batsakis, et al., Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 54, 5675–5682, 1994.

12. D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, L. Norton, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* 344, 783-792, 2001.
13. C. E. Geyer, J. Forster, D. Lindquist, S. Chan, C. G. Romieu, T. Pienkowski, A. Jagiello-Gruszfeld, J. Crown, A. Chan, B. Kaufman, D. Skarlos, M. Campone, N. Davidson, M. Berger, C. Oliva, S. D. Rubin, S. Stein, D. Cameron, Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* 355, 2733-2743, 2006.
14. J. Baselga, J. Cortes, S. B. Kim, S. A. Im, R. Hegg, Y. H. Im, L. Roman, J. L. Pedrini, T. Pienkowski, A. Knott, E. Clark, M. C. Benyunes, G. Ross, S. M. Swain, Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 366, 109-119, 2012.
15. A. Goldhirsch, R. D. Gelber, M. J. Piccart-Gebhart, E. de Azambuja, M. Procter, T. M. Suter, C. Jackisch, D. Cameron, H. A. Weber, D. Heinzmann, L. D. Lago, E. McFadden, M. Dowsett, M. Untch, L. Gianni, R. Bell, C.-H. Köhne, A. Vindevoghel, M. Andersson, A. M. Brunt, D. Otero-Reyes, S. Song, I. Smith, B. Leyland-Jones, J. Baselga, 2 years versus 1 year of adjuvant trastuzumab for HER2-positive breast cancer (HERA): an open-label, randomised controlled trial. *The Lancet* 382, 1021-1028, 2013.
16. D. Cameron, M. Casey, C. Oliva, B. Newstat, B. Imwalle, C. E. Geyer, Lapatinib plus capecitabine in women with HER-2-positive advanced breast cancer: final survival analysis of a phase III randomized trial. *Oncologist* 15, 924-934, 2010.
17. Hickinson DM, Klinowska T, Speake G, Vincent J, Trigwell C, Anderton J, Beck S, Marshall G, Davenport S, Callis R, Mills E, Grosios K, Smith P, Barlaam B, Wilkinson RW, Ogilvie D, AZD8931, an equipotent, reversible inhibitor of signaling by epidermal growth factor receptor, ERBB2 (HER2), and ERBB3: a unique agent for simultaneous ERBB receptor blockade in cancer. *Clinical Cancer Research* 16, 1159-1169, 2010.

18. P. Stephens, C. Hunter, G. Bignell, S. Edkins, H. Davies, J. Teague, C. Stevens, S. O'Meara, R. Smith, A. Parker, A. Barthorpe, M. Blow, L. Brackenbury, A. Butler, O. Clarke, J. Cole, E. Dicks, A. Dike, A. Drozd, K. Edwards, S. Forbes, R. Foster, K. Gray, C. Greenman, K. Halliday, K. Hills, V. Kosmidou, R. Lugg, A. Menzies, J. Perry, R. Petty, K. Raine, L. Ratford, R. Shepherd, A. Small, Y. Stephens, C. Tofts, J. Varian, S. West, S. Widaa, A. Yates, F. Brasseur, C. S. Cooper, A. M. Flanagan, M. Knowles, S. Y. Leung, D. N. Louis, L. H. Looijenga, B. Malkowicz, M. A. Pierotti, B. Teh, G. Chenevix-Trench, B. L. Weber, S. T. Yuen, G. Harris, P. Goldstraw, A. G. Nicholson, P. A. Futreal, R. Wooster, M. R. Stratton, Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 431, 525–526, 2004.
19. R. Bose, S. M. Kavuri, A. C. Searleman, W. Shen, D. Shen, D. C. Koboldt, J. Monsey, N. Goel, A. B. Aronson, S. Li, C. X. Ma, L. Ding, E. R. Mardis, M. J. Ellis, Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov* 3, 224–237, 2013.
20. J. Mazieres, S. Peters, B. Lepage, A. B. Cortot, F. Barlesi, M. Beau-Faller, B. Besse, H. Blons, A. Mansuet-Lupo, T. Urban, D. Moro-Sibilot, E. Dansin, C. Chouaid, M. Wislez, J. Diebold, E. Felip, I. Rouquette, J. D. Milia, O. Gautschi, Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol* 31, 1997–2003, 2013.
21. J. W. Lee, Y. H. Soung, S. H. Seo, S. Y. Kim, C. H. Park, Y. P. Wang, K. Park, S. W. Nam, W. S. Park, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo, S. H. Lee, Somatic mutations of ERBB2 kinase domain in gastric, colorectal, and breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 12, 57–61, 2006.
22. T. Bekaii-Saab, N. Williams, C. Plass, M. V. Calero, C. Eng, A novel mutation in the tyrosine kinase domain of ERBB2 in hepatocellular carcinoma. *BMC cancer* 6, 278, 2006.
23. N. Cancer Genome Atlas Research, Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609–615, 2011.
24. G. Guo, X. Sun, C. Chen, S. Wu, P. Huang, Z. Li, M. Dean, Y. Huang, W. Jia, Q. Zhou, A. Tang, Z. Yang, X. Li, P. Song, X.

- Zhao, R. Ye, S. Zhang, Z. Lin, M. Qi, S. Wan, L. Xie, F. Fan, M. L. Nickerson, X. Zou, X. Hu, L. Xing, Z. Lv, H. Mei, S. Gao, C. Liang, Z. Gao, J. Lu, Y. Yu, C. Liu, L. Li, X. Fang, Z. Jiang, J. Yang, C. Li, X. Zhao, J. Chen, F. Zhang, Y. Lai, Z. Lin, F. Zhou, H. Chen, H. C. Chan, S. Tsang, D. Theodorescu, Y. Li, X. Zhang, J. Wang, H. Yang, Y. Gui, J. Wang, Z. Cai, Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet* 45, 1459–1463, 2013.
25. H. Greulich, B. Kaplan, P. Mertins, T. H. Chen, K. E. Tanaka, C. H. Yun, X. Zhang, S. H. Lee, J. Cho, L. Ambrogio, R. Liao, M. Imielinski, S. Banerji, A. H. Berger, M. S. Lawrence, J. Zhang, N. H. Pho, S. R. Walker, W. Winckler, G. Getz, D. Frank, W. C. Hahn, M. J. Eck, D. R. Mani, J. D. Jaffe, S. A. Carr, K. K. Wong, M. Meyerson, Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14476–14481, 2012.
26. S. M. Kavuri, N. Jain, F. Galimi, F. Cottino, S. M. Leto, G. Migliardi, A. C. Searleman, W. Shen, J. Monsey, L. Trusolino, S. A. Jacobs, A. Bertotti, R. Bose, HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment. *Cancer Discov* 5, 832–841, 2015.
27. S. Breslin, M. C. Lowry, L. O’Driscoll, Neratinib resistance and cross-resistance to other HER2-targeted drugs due to increased activity of metabolism enzyme cytochrome P4503A4. *Br J Cancer* 116, 620–625, 2017.
28. J. De Greve, E. Teugels, C. Geers, L. Decoster, D. Galdermans, J. De Mey, H. Everaert, I. Umelo, P. In’t Veld, D. Schallier, Clinical activity of afatinib (BIBW 2992) in patients with lung adenocarcinoma with mutations in the kinase domain of HER2/neu. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 76, 123–127, 2012.
29. L. Gandhi, R. Bahleda, S. M. Tolaney, E. L. Kwak, J. M. Cleary, S. S. Pandya, A. Hollebecque, R. Abbas, R. Ananthkrishnan, A. Berkenblit, M. Krygowski, Y. Liang, K. W. Turnbull, G. I. Shapiro, J. C. Soria, Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor

- receptor 2-dependent and other solid tumors. *J Clin Oncol* 32, 68–75, 2014.
30. M. G. Kris, D. R. Camidge, G. Giaccone, T. Hida, B. T. Li, J. O’Connell, I. Taylor, H. Zhang, M. E. Arcila, Z. Goldberg, P. A. Janne, Targeting HER2 aberrations as actionable drivers in lung cancers: phase II trial of the pan-HER tyrosine kinase inhibitor dacomitinib in patients with HER2-mutant or amplified tumors. *Ann Oncol* 26, 1421–1427, 2015.
  31. D. M. Hyman, S. A. Piha-Paul, H. Won, J. Rodon, C. Saura, G. I. Shapiro, D. Juric, D. I. Quinn, V. Moreno, B. Doger, I. A. Mayer, V. Boni, E. Calvo, S. Loi, A. C. Lockhart, J. P. Erinjeri, M. Scaltriti, G. A. Ulaner, J. Patel, J. Tang, H. Beer, S. D. Selcuklu, A. J. Hanrahan, N. Bouvier, M. Melcer, R. Murali, A. M. Schram, L. M. Smyth, K. Jhaveri, B. T. Li, A. Drilon, J. J. Harding, G. Iyer, B. S. Taylor, M. F. Berger, R. E. Cutler, Jr., F. Xu, A. Butturini, L. D. Eli, G. Mann, C. Farrell, A. S. Lalani, R. P. Bryce, C. L. Arteaga, F. Meric-Bernstam, J. Baselga, D. B. Solit, HER kinase inhibition in patients with HER2- and HER3-mutant cancers. *Nature* 554, 189–194, 2018.
  32. S. Liu, S. Li, J. Hai, X. Wang, T. Chen, M. M. Quinn, P. Gao, Y. Zhang, H. Ji, D. A. E. Cross, K. K. Wong, Targeting HER2 Aberrations in Non-Small Cell Lung Cancer with Osimertinib. *Clin Cancer Res*, 2018.
  33. W. J. Zuo, Y. Z. Jiang, Y. J. Wang, X. E. Xu, X. Hu, G. Y. Liu, J. Wu, G. H. Di, K. D. Yu, Z. M. Shao, Dual Characteristics of Novel HER2 Kinase Domain Mutations in Response to HER2-Targeted Therapies in Human Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 22, 4859–4869, 2016.
  34. A. B. Hanker, M. R. Brewer, J. H. Sheehan, J. P. Koch, G. R. Sliwoski, R. Nagy, R. Lanman, M. F. Berger, D. M. Hyman, D. B. Solit, J. He, V. Miller, R. E. Cutler, Jr., A. S. Lalani, D. Cross, C. M. Lovly, J. Meiler, C. L. Arteaga, An Acquired HER2T798I Gatekeeper Mutation Induces Resistance to Neratinib in a Patient with HER2 Mutant-Driven Breast Cancer. *Cancer Discov* 7, 575–585, 2017.
  35. T. Akagi, K. Sasai, H. Hanafusa, Refractory nature of normal

- human diploid fibroblasts with respect to oncogene-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13567–13572, 2003.
36. B. Page, M. Page, C. Noel, A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol* 3, 473–476, 1993.
  37. M. T. Chang, T. S. Bhattarai, A. M. Schram, C. M. Bielski, M. T. A. Donoghue, P. Jonsson, D. Chakravarty, S. Phillips, C. Kandoth, A. Penson, A. Gorelick, T. Shamu, S. Patel, C. Harris, J. Gao, S. O. Sumer, R. Kundra, P. Razavi, B. T. Li, D. N. Reales, N. D. Socci, G. Jayakumar, A. Zehir, R. Benayed, M. E. Arcila, S. Chandarlapaty, M. Ladanyi, N. Schultz, J. Baselga, M. F. Berger, N. Rosen, D. B. Solit, D. M. Hyman, B. S. Taylor, Accelerating Discovery of Functional Mutant Alleles in Cancer. *Cancer Discov* 8, 174–183, 2018.
  38. R. K. Kancha, N. von Bubnoff, N. Bartosch, C. Peschel, R. A. Engh, J. Duyster, Differential sensitivity of ERBB2 kinase domain mutations towards lapatinib. *PLoS One* 6, e26760, 2011.
  39. T. Trowe, S. Boukouvala, K. Calkins, R. E. Cutler, Jr., R. Fong, R. Funke, S. B. Gendreau, Y. D. Kim, N. Miller, J. R. Woolfrey, V. Vysotskaia, J. P. Yang, M. E. Gerritsen, D. J. Matthews, P. Lamb, T. S. Heuer, EXEL-7647 inhibits mutant forms of ErbB2 associated with lapatinib resistance and neoplastic transformation. *Clin Cancer Res* 14, 2465–2475, 2008.
  40. K. Uchibori, N. Inase, M. Araki, M. Kamada, S. Sato, Y. Okuno, N. Fujita, R. Katayama, Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nat Commun* 8, 14768, 2017.
  41. T. Kosaka, J. Tanizaki, R. M. Paranal, H. Endoh, C. Lydon, M. Capelletti, C. E. Repellin, J. Choi, A. Ogino, A. Calles, D. Ercan, A. J. Redig, M. Bahcall, G. R. Oxnard, M. J. Eck, P. A. Janne, Response Heterogeneity of EGFR and HER2 Exon 20 Insertions to Covalent EGFR and HER2 Inhibitors. *Cancer Res* 77, 2712–2721, 2017.
  42. D. Planchard, K. H. Brown, D. W. Kim, S. W. Kim, Y. Ohe, E. Felip, P. Leese, M. Cantarini, K. Vishwanathan, P. A. Janne, M. Ranson, P. A. Dickinson, Osimertinib Western and Asian clinical pharmacokinetics in patients and healthy volunteers:

- implications for formulation, dose, and dosing frequency in pivotal clinical studies. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 77, 767–776, 2016.
43. J. W. Yates, S. Ashton, D. Cross, M. J. Mellor, S. J. Powell, P. Ballard, Irreversible Inhibition of EGFR: Modeling the Combined Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Relationship of Osimertinib and Its Active Metabolite AZ5104. *Molecular cancer therapeutics* 15, 2378–2387, 2016.
  44. S. Wind, D. Schnell, T. Ebner, M. Freiwald, P. Stopfer, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Afatinib. *Clinical pharmacokinetics* 56, 235–250, 2017.
  45. R. W. Sparidans, S. van Hoppe, J. J. Rood, A. H. Schinkel, J. H. Schellens, J. H. Beijnen, Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the tyrosine kinase inhibitor afatinib in mouse plasma using salting-out liquid–liquid extraction. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 1012–1013, 118–123, 2016.
  46. E. Y. Kim, E. N. Cho, H. S. Park, J. Y. Hong, S. Lim, J. P. Youn, S. Y. Hwang, Y. S. Chang, Compound EGFR mutation is frequently detected with co-mutations of actionable genes and associated with poor clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 17, 237–245, 2016.
  47. S. Kobayashi, H. M. Canepa, A. S. Bailey, S. Nakayama, N. Yamaguchi, M. A. Goldstein, M. S. Huberman, D. B. Costa, Compound EGFR mutations and response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *J Thorac Oncol* 8, 45–51, 2013.
  48. D. R. Boulbes, S. T. Arold, G. B. Chauhan, K. V. Blachno, N. Deng, W. C. Chang, Q. Jin, T. H. Huang, J. M. Hsu, S. W. Brady, C. Bartholomeusz, J. E. Ladbury, S. Stone, D. Yu, M. C. Hung, F. J. Esteva, HER family kinase domain mutations promote tumor progression and can predict response to treatment in human breast cancer. *Molecular oncology* 9, 586–600, 2015.
  49. R. Mishra, A. B. Hanker, J. T. Garrett, Genomic alterations of ERBB receptors in cancer: clinical implications. *Oncotarget* 8, 114371–114392, 2017.
  50. J. D. Hainsworth, F. Meric-Bernstam, C. Swanton, H. Hurwitz, D. R. Spigel, C. Sweeney, H. Burris, R. Bose, B. Yoo, A. Stein, M.

- Beattie, R. Kurzrock, Targeted Therapy for Advanced Solid Tumors on the Basis of Molecular Profiles: Results From MyPathway, an Open-Label, Phase IIa Multiple Basket Study. *J Clin Oncol* 36, 536-542, 2018.
51. D. J. Zabransky, C. L. Yankaskas, R. L. Cochran, H. Y. Wong, S. Croessmann, D. Chu, S. M. Kavuri, M. Red Brewer, D. M. Rosen, W. B. Dalton, A. Cimino-Mathews, K. Cravero, B. Button, K. Kyker-Snowman, J. Cidado, B. Erlanger, H. A. Parsons, K. M. Manto, R. Bose, J. Lauring, C. L. Arteaga, K. Konstantopoulos, B. H. Park, HER2 missense mutations have distinct effects on oncogenic signaling and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E6205-6214, 2015.
52. X. Xu, C. De Angelis, K. A. Burke, A. Nardone, H. Hu, L. Qin, J. Veeraraghavan, V. Sethunath, L. M. Heiser, N. Wang, C. K. Y. Ng, E. S. Chen, A. Renwick, T. Wang, S. Nanda, M. Shea, T. Mitchell, M. Rajendran, I. Waters, D. J. Zabransky, K. L. Scott, C. Gutierrez, C. Nagi, F. C. Geyer, G. C. Chamness, B. H. Park, C. A. Shaw, S. G. Hilsenbeck, M. F. Rimawi, J. W. Gray, B. Weigelt, J. S. Reis-Filho, C. K. Osborne, R. Schiff, HER2 Reactivation through Acquisition of the HER2 L755S Mutation as a Mechanism of Acquired Resistance to HER2-targeted Therapy in HER2(+) Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 5123-5134, 2017.
53. C. X. Ma, R. Bose, F. Gao, R. A. Freedman, M. L. Telli, G. Kimmick, E. Winer, M. Naughton, M. P. Goetz, C. Russell, D. Tripathy, M. Cobleigh, A. Forero, T. J. Pluard, C. Anders, P. A. Niravath, S. Thomas, J. Anderson, C. Bumb, K. C. Banks, R. B. Lanman, R. Bryce, A. S. Lalani, J. Pfeifer, D. F. Hayes, M. Pegram, K. Blackwell, P. L. Bedard, H. Al-Kateb, M. J. C. Ellis, Neratinib Efficacy and Circulating Tumor DNA Detection of HER2 Mutations in HER2 Nonamplified Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 5687-5695, 2017.
54. S. S. Ramalingam, J. C. Yang, C. K. Lee, T. Kurata, D. W. Kim, T. John, N. Nogami, Y. Ohe, H. Mann, Y. Rukazenzov, S. Ghiorghiu, D. Stetson, A. Markovets, J. C. Barrett, K. S. Thress, P. A. Janne, Osimertinib As First-Line Treatment of EGFR Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 36, 841-849, 2018.



55. E. F. Smit, S. Peters, R. Dziadziuszko, U. Dafni, J. Wolf, B. Wasag, W. Biernat, S. Finn, R. Kammler, Z. Tsourti, M. Rabaglio-Poretti, B. U. Ruepp, H. Roschitzki-Voser, R. A. Stahel, E. Felip, A single-arm phase II trial of afatinib in pretreated patients with advanced NSCLC harboring a HER2 mutation: The ETOP NICHE trial. *Journal of Clinical Oncology* 35, 9070–9070, 2017.
56. M. de Martino, D. Zhuang, T. Klatte, M. Rieken, M. Roupret, E. Xylinas, T. Clozel, M. Krzywinski, O. Elemento, S. F. Shariat, Impact of ERBB2 mutations on in vitro sensitivity of bladder cancer to lapatinib. *Cancer Biol Ther* 15, 1239–1247, 2014.
57. O. Metzger-Filho, EP Winer, I Krop, Pertuzumab: optimizing HER2 blockade. *Clinical Cancer Research* 19, 5552–5556, 2013.
58. PR Pohlmann, IA Mayer, R Mernaugh, Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 15, 7479–7491, 2009.
59. Ramirez RD, Sheridan S, Girard L, Sato M, Kim Y, Pollack J, Peyton M, Zou Y, Kurie JM, Dimaio JM, Milchgrub S, Smith AL, Souza RF, Gilbey L, Zhang X, Gandia K, Vaughan MB, Wright WE, Gazdar AF, Shay JW, Minna JD, Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res* 64, 9027–9034, 2004.
60. Sato M, Vaughan MB, Girard L, Peyton M, Lee W, Shames DS, Ramirez RD, Sunaga N, Gazdar AF, Shay JW, Minna JD, Multiple oncogenic changes (K-RAS (V12), p53 knockdown, mutant EGFRs, p16 bypass, telomerase) are not sufficient to confer a full malignant phenotype on human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 66, 2116–2128, 2006.