

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 長野 匡晃

【背景】DNA シークエ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、次世代シークエンサー (next generation sequencer: NGS) が 2005 年に開発された。この NGS の発展により大量シークエンシングの実現性と低コスト化が進んだことで、がん患者から得られたサンプルを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クエンズ」が近年盛んに行われている。これにより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) の変異に関する報告が急速に増え、ドライバー遺伝子変異に基づき治療薬を選択する戦略が可能になってきたが、その一方で、意義のある疾患原因として確定できない遺伝子変異 (variant of unknown significance: VUS) の種類と数も急速に増加している。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、見つかってきた VUS の機能評価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。*ERBB2* 遺伝子変異はこれまでに様々な癌腫で報告されており、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、未だ多くの変異が VUS として分類されている。そこで我々は、次世代シークエ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 *ERBB2* 変異の機能解析を網羅的行った。

【方法】まず、cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) に蓄積されている MSK-IMPACT と TCGA の 2 つのデータベースを用いて、様々な癌腫での *ERBB2* 遺伝子増幅・遺伝子変異の発生頻度およびその関係性について比較検討を行った。

次に、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を網羅的に評価した。MANO 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方法であり、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 (3T3 細胞、Ba/F3 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。

ERBB2 変異に対する薬剤感受性評価は、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 薬剤を使用して解析した。トラスツズマブは 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り、そのほかの 5 薬剤は細胞内のチロシンキナーゼドメインに結合してリン酸化を阻害することで下流シグナルを抑制するチロシンキナーゼ阻害剤である。ラパチニブは EGFR および ERBB2 に対する阻害剤であり、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、既に臨床的に認可されている。サピチニブは 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り、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分子標的薬である。また、アフアチニブとネラチニブは 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り、第 I 相ないし第 II 相臨床試験で ERBB2 変異を有する癌に対して奏功することが報告されている。オシメルチニブは EGFR 阻害薬として臨床で使用されているが、近年 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。これらの薬剤を、変異遺伝子がそれぞれ導入された Ba/F3 細胞を等量ずつ混ぜた後に様々な濃度で投与し、72 時間後に細胞を回収して MANO 法で網羅的に解析した。薬剤によって感受性に違いがあると考えられた ERBB2 変異については、アラマーブルー法を用いて正確な IC₅₀ 値を測定し、詳細な解析を加えた。さらに、*in vivo* での薬剤感受性評価実験も行った。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注射後、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 薬剤を 2 日毎に腹腔内投与し、腫瘍体積の変化を経時的に測定した。腫瘍は 12 日後に摘出し DNA を抽出後、*in vitro* と同様に MANO 法を用いて各遺伝子変異の相対的な細胞数の変化を評価した。

ERBB2 L755P 変異については、アフアチニブとオシメルチニブの 2 薬剤での薬剤感受性を *in vivo* で詳細に解析した。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注射後、アフアチニブ、オシメルチニブの 2 薬剤を低用量 (アフアチニブ: 8 mg/kg、オシメルチニブ: 8 mg/kg) と高用量 (アフアチニブ: 40 mg/kg、オシメルチニブ: 20 mg/kg) でそれぞれ 2 日毎に腹腔内投与し、腫瘍体積の変化を経時的に評価した。また、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、血中薬物濃度について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した。

最後に、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、ERBB2 非同義変異 55 種類の解析と同様に、MANO 法を用いて形質転換能と薬剤感受性の評価を行った。

統計学的分析として、*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。

MANO 法を用いた 55 種類の ERBB2 遺伝子変異の形質転換能を評価する実験では、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た。 G776V、G778_S779insG、L841V という 3 種類の非同義変異が形質転換能を有することは、今回の実験で新たに明らかとなった。

in vitro での MANO 法を用いた薬剤感受性を評価する実験では、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。 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。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、多くの ERBB2 変異はサピチニブに対する IC₅₀ 値が 100 nmol/L 以上であり、全体的として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、大多数の ERBB2 変異に対して良好な感受性を示したが、ERBB2 L755P 変異に対するアファチニブ・ネラチニブの IC₅₀ 値はそれぞれ 8.94 nmol/L、7.03 nmol/L であり、他の ERBB2 変異の IC₅₀ 値が概して 1 nmol/L 以下であることと比較して高値であった。対照的に、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、ERBB2 A775_776insYVMA 変異に対する IC₅₀ 値が 170 nmol/L であり、L755P 変異を含めた他の ERBB2 変異の IC₅₀ 値が概して 50 nmol/L 以下であることと比較すると、きわめて高値であった。

in vivo での薬剤感受性の実験では、まず、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。また、MANO 法を用いた詳細な解析から、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。

ERBB2 L755P を発現した 3T3 細胞をアファチニブ、オシメルチニブの低用量・高用量でそれぞれ加療する *in vivo* 実験では、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が、オシメルチニブ低用量群では有意な低下を認めた。薬物血中濃度を測定したところ、オシメルチニブ低用量を単回投与後に測定した最大濃度 C_{max} は 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。これに対して、アファチニブ低用量では最大濃度 $C_{max} = 343$ 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り、L755P 変異に対してはオシメルチニブの方がアファチニブよりも感受性が高いことが示された。

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 種類が形質転換能を有すると今回の実験では判断された。また、複合変異の薬剤感受性については、アファチニブおよびネラチニブでは L755S を含む複合変異の IC_{50} 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。一方、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_{50} 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。

【結語】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。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、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 変異についてはオシメルチニブのみ感受性が高く、一方で、エクソン 20 挿入変異に対して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 MANO 法を用いて同様の解析を行い、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。