

対象研究テーマ：肺がんの分子標的薬耐性機構の解明とその克服に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：新たなるEGFR-TKI耐性機構としてのKeap1/Nrf2システム
— その遺伝子診断や治療への応用

研究代表者：筑波大学医学医療系 准教授 石井幸雄

研究成果の概要：

Nrf2は抗癌剤耐性や細胞増殖に関与する転写因子であり、非小細胞肺癌で活性化が見られる。非小細胞肺癌におけるNrf2活性化は、その抑制タンパクであるKeap1の機能欠失か、上皮成長因子受容体(EGFR)シグナリングの亢進によって生じる。このことは、Keap1遺伝子に機能欠失性変異が生じると、EGFRシグナリングに関係なくKeap1依存的なNrf2活性化による細胞増殖が恒常的に生じることを意味し、EGFR阻害薬(TKI)の耐性機構として重要と思われる。本研究では非小細胞肺癌患者を対象に、EGFR-TKI感受性とEGFR遺伝子変異、Keap1遺伝子変異の関連を調べ、Keap1遺伝子変異の検索がEGFR-TKI有効性予測の新たな遺伝子診断法となりうるかを検討した。EGFR-TKI感受性EGFR遺伝子変異を有した腺癌症例でEGFR-TKIが初回より無効であった症例は見られなかった。これらのうち、能転移巣でEGFR-TKIが無効であった症例でKeap1遺伝子変異を検討したところ、脳転移巣のみに機能欠失性Keap1遺伝子変異を認めたことから、Keap1遺伝子変異はEGFR-TKI獲得耐性の一因である可能性が示唆された。Keap1遺伝子は微量検体でも解析できたことより、今後多くの症例でその有用性を検証したい。

研究分野：肺癌、遺伝子診断

キーワード：Nrf2、Keap1、EGFR-TKI、薬剤耐性、遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌細胞において、Nrf2は薬物代謝酵素群、薬剤排出ポンプ、細胞周期関連タンパクなどの発現を誘導し、抗癌剤耐性や癌細胞増殖を助長する(Clin Cancer Res 15: 3423, 2009)。非小細胞肺癌細胞におけるNrf2活性化は上皮成長因子受容体(EGFR)シグナリングの亢進か、抑制タンパクKeap1の機能欠失性変異によって生じる。このことは、肺癌細胞にKeap1遺伝子の機能欠失性変異が生じると、EGFRシグナリングに関係なくKeap1依存的なNrf2活性化による細胞増殖が恒常的に生じることを意味し、EGFR阻害薬(EGFR-TKI)耐性のメカニズムを考える上で、臨床的に極めて重要な所見である。すなわちKeap1/Nrf2系はEGFR-TKI感受性EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者のEGFR-TKI耐性形成の新たな分子機構であり、Keap1遺伝子変異の検索はEGFR-TKI有効性の遺伝子診断として有用なツールとなる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究ではEGFR-TKI耐性非小細胞肺癌におけるKeap1変異の頻度や変異部位を臨床検体で解析し、実際の肺癌患者におけるEGFR-TKI耐性とKeap1遺伝子変異との関連を明らかにするとともに、EGFR-TKI有効性の新規遺伝子診断法としてのKeap1遺伝子変異測定の有用性を検証する。更に、気管支鏡下肺生検等の微量臨床検体からのKeap1遺伝子変異検索法を確立することを目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

EGFR-TKI(イレッサ、タルセバ)の投与された非小細胞肺癌患者で、病理検体の研究使用に対する包括同意を得られている症例を対象とした。EGFR-TKIの臨床効果はRECIST基準に準じて判定した。

これらの症例において経気管支生検、胸腔鏡下生検、剖検などから得られた肺癌組織検体を用いて、Nrf2活性化、Keap1遺伝子変異、EGFR遺伝子変異を解析した。Nrf2活

性化については、パラフィン包埋標本における免疫組織化学法にて *in situ* で解析した。Keap1 遺伝子変異、EGFR 遺伝子変異は、パラフィン包埋標本より DNA を抽出し、直接シーケンス法にて解析した。

EGFR-TKI の効果が持続している症例、EGFR-TKI が初回より無効な症例、および EGFR-TKI に耐性を獲得した症例に分け、それぞれの症例における Nrf2 活性化の程度や、Keap1 遺伝子変異の有無および変異部位を確認し、EGFR-TKI 耐性との関連について検討した。

4. 研究成果

1) 非小細胞肺癌では、腺癌、扁平上皮癌ともに殆どの症例で Nrf2 に対する免疫染色が陽性であった。

2) 検体からの Keap1 遺伝子変異解析では、アミノ酸変異を伴う Keap1 遺伝子変異は2例でどちらも腺癌であった。変異はどちらも Keap1 の Kelch 領域という Nrf2 結合領域に存在した。EGFR 遺伝子変異陽性で、肺原発巣に Keap1 遺伝子変異を有した症例は認めなかったが、脳転移巣で Keap1 遺伝子変異を認めた症例が1例あった。同症例では肺病巣に対し EGFR-TKI は有効であったが、使用中に癌性髄膜炎を発症したことから、脳病変に同剤は有効でなかったものと判断した。

3) 1例のみの検討であるが、気管支鏡下肺生検による微少臨床検体から Keap1 遺伝子の解析は可能であった。

以上より、非小細胞肺癌では腺癌のみならず、扁平上皮癌でも Nrf2 活性化が認められた。過去の報告とあわせると、腺癌では Keap1 遺伝子異常、扁平上皮癌では Nrf2 の遺伝子異常によりそれぞれ Nrf2 活性化が生じる可能性が高いと思われた。Kelch 領域に生じた Keap1 遺伝子変異は、過去の報告とも併せ機能欠失性変異であると考えられた。Keap1 遺伝子変異のあった転移巣で EGFR-TKI が無効であった症例より、Keap1 が EGFR-TKI 獲得耐性の新たなメカニズムとなりうる可能性が示されたが、今回の検討では EGFR-TKI 感受性 EGFR 遺伝子変異がありながら、EGFR-TKI に耐性を示した症例が殆どなく、EGFR-TKI 耐性と Keap1 遺伝子変異の関連性を明らかにするためには今後多くの症例の集積が必要と思われた。Keap1 遺伝子変異は EGFR 遺伝子変異のように EGFR-TKI 感受性との相関が確立されたものはまだないので、現時点ではシーケンスで少なくとも Kelch 領域全般は調べる必要があるが、TBLB 等による微少標本でも解析は可能であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

Yamadori T, Ishii Y, Homma S, Morishima Y, Kurishima K, Itoh K, Yamamoto M, Minami Y, Noguchi M, Hizawa N. Molecular mechanisms for regulation of Nrf2-mediated cell proliferation in non-small cell lung cancers. *Oncogene*, 31: 4768-4777 (2012)

Yamadori T, Ishii Y, Homma S, Kurishima K, Minami Y, Noguchi M, Hizawa N. Resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer with Keap1 gene mutation. *International Cancer Conference Journal* 1: 63-66 (2012)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筑波大学医学医療系・教授 石井幸雄

(2) 研究分担者

筑波大学医学医療系・講師 森島祐子

本間晋介

大阪府立病院機構大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター腫瘍内科・医長

山鳥忠宏

(3) 本研究所担当者

腫瘍内科・教授 矢野聖二