

シグナル伝達系と薬剤感受性

西尾和人¹

要旨 —— 肺癌特異的に検出される変異型 EGFR は gain of function であり、下流シグナルの活性化により、発癌に寄与すると推察される。EGFR に対する高い親和性が TKI に対する高い感受性をもたらすと推測されているが、詳細は不明である。EGFR 変異の頻度は、アッセイ系、サンプルに大きく依存するが、EGFR 遺伝子変異と、EGFR-TKI の効果、とくに生存率との関連性は明らかでない。正常型 EGFR を発現する肺癌症例における EGFR-TKI の効果を明らかにすることも今後重要である。(肺癌. 2006;46:241-244)

索引用語 —— 上皮増殖因子受容体、遺伝子変異、プロテインキナーゼ B、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ、交差検定

Signal Transduction and Drug Sensitivity

Kazuto Nishio¹

ABSTRACT —— EGFR mutations observed in lung cancer are gain of function. These mutations activate downstream in the signaling pathway and are considered to play a role in carcinogenesis. It is likely that mutant EGFR shows high affinity to EGFR-targeted tyrosine kinase inhibitors (TKI) but the details remain unclear. Detection of EGFR mutations is largely dependent on the assay system and the quality of specimens. The relationship between EGFR mutation and survival of the patients treated with EGFR-TKI is also unclear. It is important to demonstrate the potential of EGFR-TKIs in patients with lung cancer with no mutational EGFR. (*JLCC*. 2006;46:241-244)

KEY WORDS —— Epidermal growth factor receptor, Mutation, Protein kinase B, Mitogen-activated protein kinase, Cross validation

はじめに

ゲフィチニブ、エルロチニブなど EGFR 特異的チロシンキナーゼ阻害剤が非小細胞肺癌に対し使用され、その有用性が示されつつある。肺癌における EGFR 遺伝子変異と、ゲフィチニブに対する高い反応性が注目され、EGFR 遺伝子をめぐる様々な研究が急速に進展した。本稿では EGFR を標的とするチロシンキナーゼ阻害剤の動向を整理したい。

1. 変異型 EGFR の機能

EGFR の遺伝子変異の機能についての基礎的検討によ

り得られた知見を Table 1 にまとめた。エクソン 18 からエクソン 21 を中心に報告された遺伝子変異は 30 程度にのぼる。ほとんどの EGFR の遺伝子変異の機能としては“gain of function”すなわち活性型変異であると考えられている。すなわち、EGFR の遺伝子の変異がおこることにより、下流のシグナル伝達が亢進し、発癌過程が進行すると考えられる。

EGFR はリガンド TGF- α や EGF などが細胞外に結合することにより、インターナリゼーションがおこり、アダプター蛋白質と複合体を形成し、活性化する。変異型 EGFR では、インターナリゼーションの過程が野生型 EGFR に比べて亢進していると考えられている。また、そ

¹近畿大学医学部ゲノム生物学教室。

別刷請求先：西尾和人，国立がんセンター中央病院計画治療病棟 支援施設 11F，〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1。

¹Pharmacology Division, National Cancer Center Research Insti-

tute, Japan.

Reprints: Kazuto Nishio, 11F Shien-Lab, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan.

© 2006 The Japan Lung Cancer Society

Table 1. Recent Progress in Biological Evidence Regarding Mutant EGFR

Gain of function (both of deletional mutations and deletional mutations)
Prolonged half life — resistance to proteolysis
Oncogenic?
Variation in the effect to cellular sensitivity
Increased affinity to EGFR-TKI?
Identification of functional phosphorylation sites
Activation of PI3K and AKT
Increased dimerization (heterodimerization?)
No standardized detection assay for clinical samples
Acquired mutation in exon 20

の過程で再利用（リサイクル）が分解されるが、分解の過程が変異型 EGFR では低下しているとの報告もある。その分解の過程に関与する c-Cbl などの役割についても検討がなされている。¹

EGFR のさらに下流のシグナルとしては、従来から、MAP キナーゼの経路、PI3 キナーゼ—AKT の経路が重要であると考えられてきたが、変異型 EGFR においては AKT 経路の役割がより重要になっていると示唆される報告が多い。しかし活性型 EGFR の下流は MAP キナーゼの経路、PI3 キナーゼ—AKT の経路の両者が活性化されており、TKI に対する反応性のみ低下するとの報告もみられる。² 一般に gain of function をともなう遺伝子変異は onco-genetic であり、癌細胞の悪性度が増し、その増殖は亢進する。一方、各種の変異型 EGFR の遺伝子導入細胞においては、明らかな増殖速度の亢進が認められるわけではない。また、変異型 EGFR を発現する肺癌症例では変異を有しない肺癌に比べて、予後が悪くなるという明確なデータは示されていない。むしろ、限定された病期において、予後が良好ではないかという議論もある。いずれにしろ発癌過程における変異型 EGFR の機能はまだ必ずしも明らかではない。以上のように gain of function に基づく変異型 EGFR の発癌における役割は示唆されているが、その証明はなされていない。

2. 変異型 EGFR と EGFR-TKI に対する感受性・耐性

変異型 EGFR の機能の生物学的機能について考察したが、注目されている点は変異型 EGFR を有する細胞において EGFR-TKI に対し高い感受性を示すことである。それらは、基礎的には変異型 EGFR 遺伝子導入実験で、

EGFR-TKI に対する高感受性の獲得が示されている。³ また、臨床サンプルで報告された各種変異型 EGFR の遺伝子導入実験によって、種々の EGFR の変異型により EGFR-TKI に対する感受性が異なることが示唆されている。すなわち、EGFR 遺伝子変異陽性細胞であっても、変異の部位により感受性獲得の程度が異なり、場合によっては、変異を有していても感受性が変わらない場合もあるということが示唆される。さらに、エクソン 20 上の 790 番目の変異の場合は、この変異型遺伝子の導入により EGFR-TKI に対する耐性が獲得されることが報告された。⁴

これらの EGFR 遺伝子変異をもつ細胞において EGFR-TKI に対する高い感受性獲得の機序は、細胞レベルでは、EGFR-TKI による EGFR のリン酸化阻害が低濃度でおこること、またコンピュータを用いたドッキングシミュレーションから、変異型 EGFR の TKI に対する高い親和性が推測されている。しかし実際の EGFR 蛋白質での親和性を測定してみると、理屈どおりにはいかないことも報告される。⁵ ある測定系では、すなわち、野生型 EGFR と変異型 EGFR 蛋白質と TKI との結合親和性は変わらない、あるいは、その差が大きな感受性の違いを説明できるほど大きくない結果が得られる。これらは測定系の問題なのか、本来の変異型 EGFR の特徴なのか不明であるが、変異型 EGFR を発現する細胞における感受性獲得の機序についてはなお慎重に検討する必要がある。

3. 感受性予測因子としての変異型 EGFR

多くの施設の臨床サンプルの EGFR 遺伝子変異の検討により、EGFR の遺伝子変異の頻度は約 10~30% であり、東洋人にその頻度が高く、大腸癌、食道癌等に若干の EGFR 遺伝子変異の報告がみられるものの、ほぼ肺癌に集中して EGFR 遺伝子変異が認められる。

EGFR は病理学的には、ごく早期の肺癌から認められることも示唆されるが、臨床的な予後との関連性では、少なくとも早期 (IB 期まで) 症例における EGFR 変異と予後との関連性は否定的であると考えられている。組織別には、若干大細胞癌、扁平上皮癌で認められたという報告もあるが、ほぼ肺腺癌特異的である。BAC あるいは BAC feature と EGFR 遺伝子変異との関連性も示唆されており、エクソン 19 の欠失型変異が多いと推測している研究グループもある。

EGFR 遺伝子変異とゲフィチニブに対する奏功率との関連性では、EGFR 変異を有する肺癌患者において高い奏功率が示されている。一方、TTP や OS の指標としては、IDEAL、INTACT にエントリーされた症例では EGFR 変異陽性群と陰性群で差がないこと、タルセバ投

Table 2. Cross Validation of EGFR Mutation

Samle	EGFR							
	Exon 18		Exon 19		Exon 20		Exon 21	
	DFCI	VUMC	DFCI	VUMC	DFCI	VUMC	DFCI	VUMC
DanaFarber								
1	WT	NE	del746_750	WT	WT	SNP787	WT	WT
2	WT	NE	WT	WT	SNP 787	SNP787	SNP836	SNP836
3	WT	WT	WT	WT	WT	NE	WT	WT
4	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
6	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
7	WT	WT	E740, del747_749, A760F	E749_T751 Del *	WT	WT	WT	WT
8	WT	WT	del746_750	E746_T750 Del	SNP 787	SNP787	WT	WT
9	WT	WT	WT	WT	WT	SNP787	WT	WT
VUMC								
1	ND	WT	deletion	Del Ex19 ?	ND	WT	WT	WT
2	WT	WT	deletion	Del Ex19 ?	WT	SNP787	WT	WT
3	ND	WT	low PCR	WT	ND	WT	low PCR	WT
4	ND	WT	low PCR	WT	ND	WT	low PCR	WT
5	ND	WT	WT	WT	ND	SNP787	WT	WT
6	***	WT	***	Del Ex19 ?	***	SNP787	***	WT
7	ND	WT	low PCR	Del Ex19 ?	ND	SNP787	low PCR	WT
8	ND	WT	WT	Del Ex19 ?	ND	SNP787	WT	WT
9	WT	WT	deletion	Del746_750	WT	SNP787	?	WT
10	ND	WT	WT	WT	ND	SNP787	WT	WT
11		WT	low PCR	Del Ex19 ?		SNP787	low PCR	WT
12	WT	WT	WT	WT	ND	WT	?	WT
13	*	WT	*	Del Ex19 ?	*	WT	*	WT

* difficult to determine where deletion starts exactly since mutation peaks are very small

NE = not available because of low product

*** = We got an unusual pattern in all exons for this sample. Not clear why.

? possible mutation = await secondary confirmation

Giaccone IASLC '05

与群とプラセボを比較した BR.21 研究⁶においても、同様の結果である。一方、コロラド大学らのグループでは、EGFR 変異の有無では説明できなかった症例で、FISH 陽性群と陰性群では治療効果に差があると報告している。これらの予想に反する結果については、様々な論議がなされている。EGFR 遺伝子変異の解析を実施できた症例に限られている。解析の方法、感度、精度に差がある等である。後者について、次項で説明する。

4. EGFR 遺伝子変異解析の方法、感度、精度

従来の EGFR 遺伝子解析は主に手術切除標本を用いて行われてきた。またその奏効率との解析はレトロスペクティブに行われてきた。

現在行われている臨床試験においては、EGFR 遺伝子変異の有無によって選択される患者を対象とする前向き試験も試みられている。その場合、TBLB などによる生検組織を解析対象とする場合が多く、組織量が少ない、正常細胞の混入など EGFR 遺伝子変異の検出はより困

難となっている。EGFR の変異の検出法はダイレクトシーケンズが主流であったが、その検出感度はあまり高くなく、サンプル中に正常に比して癌細胞の割合が少ない場合には、変異遺伝子の検出は困難になる。そこで、腫瘍をダイレクトシーケンズあるいはマクロシーケンズ（肉眼的に腫瘍部分だけを選択する方法）によりエンリッチメントすることによりその感度を上げることが比較的多く用いられるようになってきている。PCR-SSCP 法による点突然変異の検出も行われている。

また、EGFR 遺伝子変異検出系については、30 以上の特許、バイオカンパニー、ベンチャーが参画しており、どのアッセイ系を使用するか迷うところになっている。一方、臨床的には、高感度、特異的で、迅速で、低コストなものが望まれるであろう。また、国際的にも同一基準での EGFR 変異測定が望まれる。

前述の BR21 研究においての 1 つの論議は、変異を認めた症例のうち、エクソン 19 の欠失、エクソン 21 の点突然変異 (L858R) をあわせても 50% にみたく、その他

が53%にのぼる。従来の報告では、これら2つの変異がEGFR遺伝子変異の80%程度をしめることから、測定方法の違いなのか、検査サンプルのバイアスなのか、さらには、これら一部の症例で、臨床試験全体を語ってよいのかということが議論されている。2005年世界肺癌会議において、Free大学のGiaccone教授は、Table2のようなcross-validationデータを発表した。すなわちダナファーマ癌研究所とFree大学で同一サンプルを別々にEGFR遺伝子の検出を行い検討した結果である。結果が異なるケースもみられた。このようなcross over検証研究と、それぞれのアッセイ系の感度特異性の検定は、今後の研究で必要と考えられる。

5. 他の因子

前述のように、本年度のASCO, AACRにおいてEGFR遺伝子変異とTTP, OSの関連性が示されなかったデータが相次いで発表されたことにより、もはやEGFR遺伝子変異の測定をする必要がないという議論もなされている。一方、EGFR-TKIの有効性を示すため、選択された患者群での臨床試験の必要性も検討されている。一方、わが国においては、SD, NC症例におけるEGFR-TKIの臨床的有用性を示すことも重要である。そういった意味で、EGFR遺伝子変異以外、あるいはEGFR遺伝子変異とは独立した、治療予後マーカーが求められている。我々が見出した新しい効果予測マーカーはその範疇にあるが、現在慎重に検証研究をすすめている。

6. 今後の展開

ゲフィチニブとエルロチニブはどう違うかについて

は、臨床的に興味ある課題であると思われる。これに対する回答として基本的には、(1)EGFR変異型に対する作用の違い、(2)野生型EGFRに対する作用の違い、(3)EGFR-TKI耐性細胞における作用の違い、(4)その他にわけて論じることが可能である。

感受性予測因子、肺障害予測マーカーなどについては、今後も検討されていく必要があるが、臨床試験における検証研究がますます重要と考えられる。

REFERENCES

1. de Melker AA, van der Horst G, Borst J. Ubiquitin ligase activity of c-Cbl guides the epidermal growth factor receptor into clathrin-coated pits by two distinct modes of Eps15 recruitment. *J Biol Chem.* 2004;279:55465-55473.
2. Sakai K, Fukumoto H, Arao T, et al. Dimerization and the signal transduction pathway of a small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor. *FASEB.* (in press).
3. Arao T, Fukumoto H, Takeda M, et al. Small in-frame deletion in the epidermal growth factor receptor as a target for ZD6474. *Cancer Res.* 2004;64:9101-9104.
4. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005;352:786-792.
5. Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol.* 2005;23:329-336.
6. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med.* 2005;353:133-144.