

遺伝子発現解析による非小細胞肺癌の ゲフィチニブに対する感受性予測

柿内聡司¹・矢野聖二¹・曾根三郎¹

要旨 — **目的.** 上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブ (イレッサ[®]) は再発を来した進行非小細胞肺癌に有効な薬剤であるが, その効果は一部の症例に限られる. EGFR の活性型変異が本薬剤の劇的な抗腫瘍効果と関連するが, stable disease (SD) 症例では検出されないことが知られている. SD 症例の中には長期生存例が存在することから, complete response/partial response (CR/PR) 症例だけでなく長期 SD 症例をも予測しうるバイオマーカーの同定が急務となっている. そこでわれわれは本薬剤の感受性と関連する分子の同定と, 遺伝子発現に基づいた感受性予測システムの構築を目的に以下の検討を行った. **方法.** ゲフィチニブ治療前に採取した再発非小細胞肺癌生検組織 33 検体の遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイによって取得し, random permutation test によって感受性群, 耐性群で発現の異なる遺伝子を同定した. 次に weighted vote 法によりこれらの遺伝子の発現パターンに基づいた感受性予測スコアを算出し, leave-one-out cross validation と追加症例によってシステムの正確性を検証した. **結果.** 感受性群と耐性群で発現の異なる 51 遺伝子を同定し, うち 12 遺伝子の発現に基づいて感受性を予測するスコアリングシステムを構築した. このシステムによって PR, PD 症例全例の感受性が正しく判定された. また, SD 症例については time to progression (TTP) が 4 ヶ月以上の症例は感受性, 4 ヶ月未満の症例は耐性と判定された. **結論.** 遺伝子の発現パターンによって, ゲフィチニブにより腫瘍の縮小もしくは長期間腫瘍の増大を阻止できる症例とこれらの効果が期待できない症例の予測が可能であることが示唆された. (肺癌, 2006; 46:245-251)

索引用語 — ゲフィチニブ, 個別化医療, 遺伝子発現, DNA マイクロアレイ, 非小細胞肺癌

Prediction of Sensitivity of Non-small Cell Lung Cancers to Gefitinib by Gene Expression Profiling

Soji Kakiuchi¹; Seiji Yano¹; Saburo Sone¹

ABSTRACT — **Objective.** Gefitinib (Iressa), an inhibitor of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase (EGFR-TK), has shown favorable anti-tumor activity to a subset of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). However, gefitinib failed to significantly prolong survival in comparison to placebo in an unselected population. Consequently, selection of patients who would benefit from this treatment is clinically important. EGFR-activating mutations are potent markers of dramatic response, but do not seem to be associated with stable disease. Because stable disease seems to contribute to the overall survival benefit derived from EGFR-TKI treatment, EGFR mutations do not qualify to be used as a predictive biomarkers for selection of NSCLC patients for treatment with EGFR inhibitors. The goal of this study was to identify gene expression that correlated with gefitinib sensitivity, and to establish a prediction system of clinical outcome of NSCLC patients treated by gefitinib. **Methods.** To establish a scoring system to predict the response of NSCLC patients to gefitinib, we used a genome-wide DNA microarray to

¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子制御内科.

School.

¹Department of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate

© 2006 The Japan Lung Cancer Society

analyze 33 biopsy samples of advanced NSCLC from patients who had been treated with gefitinib monotherapy. We carried out a random permutation test to identify a set of genes expressed differentially responders and non-responders. The gefitinib response score (GRS) reflecting gene expression was calculated by a weighted vote method and this numerical scoring system was validated by the leave-one-out approach and independent test cases. **Results.** We identified 51 genes the expression of which differed significantly between responders and non-responders to the drug. We selected the 12 genes that showed the most significant differences to establish a numerical scoring system for predicting response to gefitinib treatment. This system clearly separated the responders and non-responders without any overlap, and accurately predicted responses to the drug in additional NSCLC cases. Moreover, this system enabled separation of intermediate tumor responses (SD) into two groups, one representing patients who succeeded in maintaining the tumor-static effect for a long period and the other representing patients who failed to do so; the former group was a good target for this treatment and the latter was not. **Conclusion.** Our results suggest that the clinical outcome of NSCLC patients treated with gefitinib could be predicted by gene expression profile. (*JJLC*. 2006;46:245-251)

KEY WORDS — Gefitinib, Personalized medicine, Gene expression, DNA microarray, Non-small cell lung cancer

はじめに

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブ（イレッサ）は進行非小細胞肺癌の一部の症例に対して劇的な臨床効果が認められる。しかしその一方で、患者選択を行わなかった場合、プラセボと比較し有意な生存期間の延長が認められないことが示され、¹ 治療前に本薬剤の有効性を予測できるバイオマーカーの同定が急務となっている。

近年、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により癌の個性を遺伝子発現パターンとして認識することが可能になり、個々の症例の予後や薬剤感受性を予測する試みがなされるようになってきた。本稿では遺伝子発現に基づいた非小細胞肺癌のゲフィチニブに対する感受性予測システムについて紹介する。

感受性予測の必要性

ゲフィチニブは、従来の抗癌剤が奏功しなかった再発非小細胞肺癌を対象とした臨床試験において有効性が示されたほか、劇的な著効例が経験されたこと、経口投与が可能であることなどから大きな期待を受けて爆発的に使用された。しかしその奏効率は他の抗癌剤と同様に約20～30%程度に過ぎないことから、^{2,3} 過半数が無効な治療を受けていることになる。本薬剤による治療が一日薬価約7,000円にもものぼることから、無制限な使用は医療経済的にも重大な問題である。また、有害事象として急性肺障害・間質性肺炎（interstitial lung disease: ILD）が我が国では約5.8%に発症し、約2.3%が死亡したことが判明し、⁴ 本薬剤の使用になんらかの制限が必要と考えられるようになった。

ゲフィチニブによるILDは西日本胸部腫瘍臨床研究機構（West Japan Thoracic Oncology Group: WJTOG）によって行われた多変量解析によると、男性、喫煙歴、特発性間質性肺炎の合併の3つが危険因子として挙げられた。⁵ また、IDEAL1の多変量解析²等にて女性、腺癌、喫煙歴のない患者などに本薬剤の有効率が高いことが示されている。臨床の現場ではこれらの疫学的なデータをもとに、有効性が見込めかつ致死的な有害事象のリスクの低い患者を選別し本薬剤を投与することになる。しかし、選択肢が限られる再発を来した進行非小細胞肺癌の治療においては、本薬剤に対する期待は極めて大きい。疫学的なデータからは傾向はつかめるものの、実際に個々の患者と向き合ったとき、本薬剤を投与すべきか悩ましいケースが多い。つまり集団としてどうなのかではなく個々の症例で有効なのかどうかという情報が求められており、疫学的なアプローチだけでなく個々の患者における本薬剤の有効性を予測するシステムの構築が求められている。

EGFRの活性型変異と感受性

ゲフィチニブの感受性と関連する因子として、まず標的分子であるEGFRの発現量と感受性との関連を検討した結果、両者に相関がないことが報告された。³ 相反する報告も散見されるものの、⁶ 少なくとも患者選択に資するマーカーとはなり得ないと考えられる。また、臨床背景としては、女性、腺癌、非喫煙者に効果が高いことが知られているが、その機序は不明であった。

2004年、非小細胞肺癌患者のEGFRチロシンキナーゼドメインに、以下へのシグナル伝達が増強される活性型変異が同定された。^{7,8} この遺伝子異常は非小細胞肺癌の

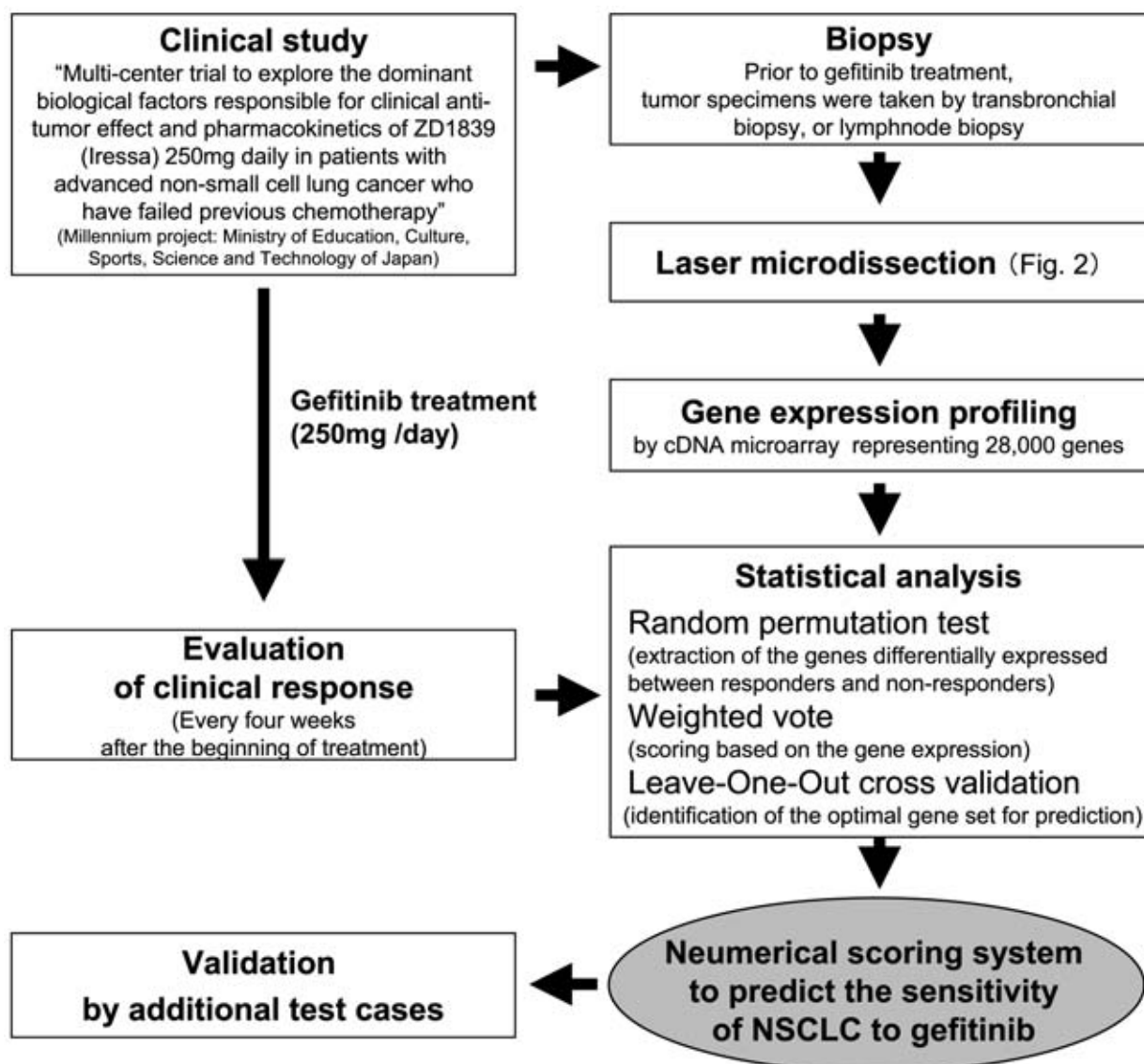


Figure 1. Schematic presentation of the strategy for establishing a scoring system to predict the efficacy of gefitinib treatment based on the gene expression profile.

うち、日本人・女性・腺癌・非喫煙者というゲフィチニブに感受性の高い患者群に高頻度に認められ、実際に本薬剤が著効した症例の約80%に遺伝子変異が認められた。つまり、肺腺癌の中には、活性型変異によるEGFRシグナル伝達系の亢進を特徴とするサブクラスが存在し、そのサブクラスこそがゲフィチニブの著効する患者群であることが示された。また、肺腺癌の発生への関与が報告されているK-rasの活性型変異とEGFRの活性型変異が完全にexcludeされることから、これらの知見は肺腺癌の分子生物学的分類や、発癌のメカニズムの観点からも非常に興味深い発見である。

しかし、感受性予測のバイオマーカーとしてはいくつ

かの問題点を指摘されている。まず、有効症例でも約20%にはEGFR活性型変異が認められず、変異がない症例でも腫瘍が縮小するか、増大を阻止できる症例(SD以上)が約30%存在することがその後の追試により示された。⁶ゲフィチニブと同様のEGFR阻害剤であるエルロチニブの臨床試験にてSDでも予後の改善効果がみられることが示唆されており、長期間SDを維持できる症例はEGFR阻害剤の適応と考えるべきである。進行非小細胞肺癌の治療において、本邦で使用可能で2nd line以降で有効性が示されている薬剤は本薬剤とドセタキセルのみである現状を考慮すると、EGFRの活性型変異の有無のみでの患者選択は一部の患者から有効な治療を受け

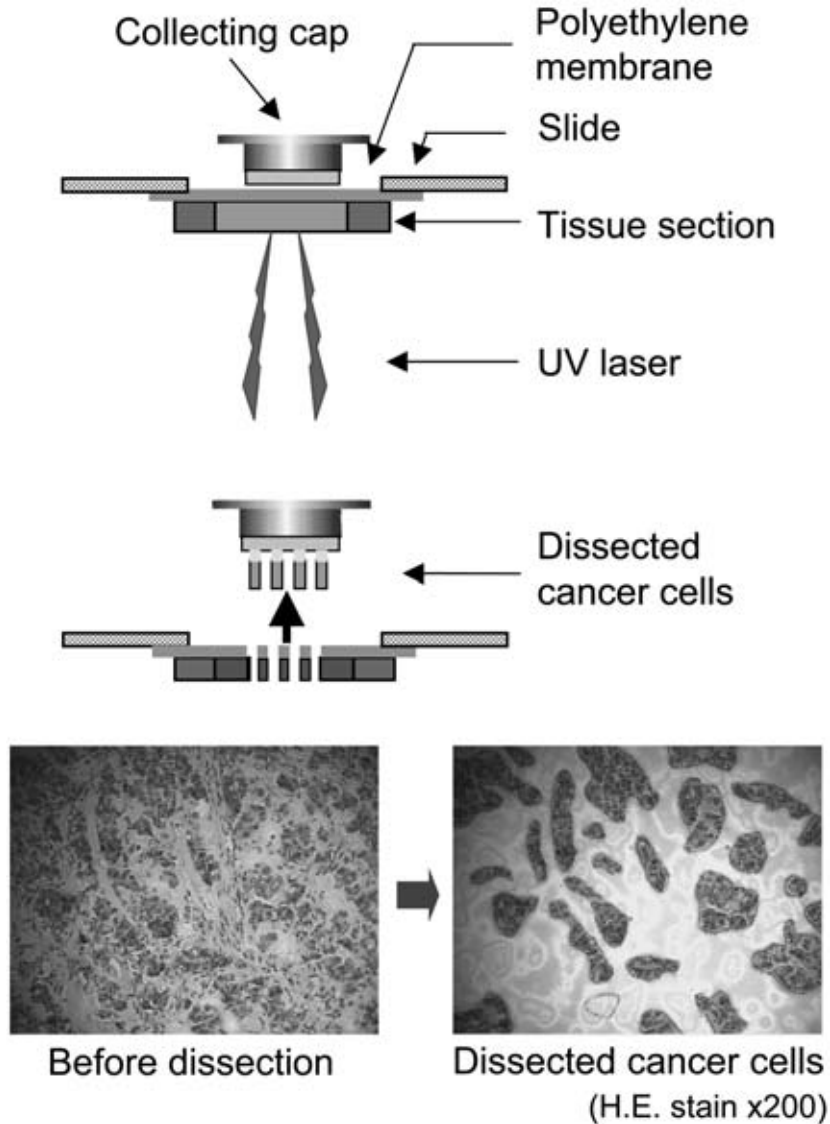


Figure 2. Laser microdissection.

In view of significant differences in the proportions of cancer cells and various types of parenchymal cells that are present from one tumor to another, microdissection is essential to obtain precise gene expression profiles. Therefore we stained 8 μm -thick frozen sections with hematoxylin and eosin and collected cancer cells selectively, using the μCUT laser-microbeam microdissection system (Molecular Machines & Industries AG, Glattbrugg, Switzerland). In this system tissue sections are mounted on a thin supporting polyethylene membrane that will be cut together with the target tissue; a pulsed-ultraviolet (UV) narrow-beam-focus laser cuts out cancer cells along a pre-selected track that can be observed on a video screen.

る機会を奪う恐れがある。

網羅的遺伝子発現解析を用いたゲフィチニブに対する感受性予測の試み

癌は増殖速度、治療応答性、臨床転帰など様々な生物

学的特性が個々の症例によって異なっており、不均一な疾患群であるといえる。ヒトゲノムには 20,000 以上の遺伝子が含まれており、これらの発現の有無や程度によりその細胞の性質が規定されている。したがって癌の個性を単独の遺伝子や分子で説明することは困難であり、そ

Table 1. List of Candidate Genes for Discriminating Responders (PR) and Non-responders (PD) to Gefitinib (The Top 12 of 51 Genes)

Rank	GenBank ID	Symbol	Gene name	Predominantly expressed class
1	AK026315	FLJ22662	hypothetical protein FLJ22662	PD
2	M30704	AREG	amphiregulin	PD
3	AB030656	CORO1C	coronin, actin binding protein, 1C	PD
4	AF283508	AVEN	apoptosis, caspase activation inhibitor	PD
5	AL049417	DUSP3	dual specificity phosphatase 3	PD
6	AI026836	DJ473B4	hypothetical protein DJ473B4	PD
7	AF035444	TSSC3	tumor suppressing subtransferable candidate 3	PD
8	AK002015	RBM7	RNA binding motif protein 7	PD
9	AI381512		EST	PD
10	AI436027	OSMR	oncostatin M receptor	PD
11	AI971137	GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	PD
12	AW070235	COL4A3BP	collagen, type IV, alpha 3 binding protein	PD

のメカニズムの理解には数万に上る遺伝子の発現を網羅的に解析する必要がある。DNA マイクロアレイはガラス基盤上に数万の DNA を高密度に配列したデバイスであり、サンプル由来の cDNA (もしくは cRNA) をハイブリダイゼーションさせることにより数千から数万遺伝子の発現情報を同時に取得することを可能にする技術である。

EGFR の活性型変異は非小細胞肺癌のゲフィチニブに対する感受性を規定する最も重要な因子である。しかし変異の有無のみで多様な疾患群である非小細胞肺癌の本薬剤に対する感受性のすべてを説明できないことは上に述べたとおりである。したがってより広範に感受性に関わる因子を検索する必要がある。筆者らは文部科学省のミレニアムプロジェクトの一環である「総合がん・疾患遺伝子プロジェクト」の疾患遺伝子薬剤反応性研究 (代表 東京大学分子細胞生物学研究所 鶴尾隆教授) として、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により非小細胞肺癌におけるゲフィチニブに対する感受性を規定する遺伝子を同定し、さらに遺伝子の発現パターンに基づいて個々の症例の感受性を予測するシステムの構築を試みた。⁹ なお症例の登録、検体採取、治療は徳島大学病院のほか、近畿大学附属病院 (腫瘍内科 福岡正博教授) で行われ、遺伝子発現解析は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター (中村祐輔教授) にて行われた (Figure 1, 2)。

具体的にはまず従来の化学療法に抵抗性を示した進行非小細胞肺癌患者を対象とした臨床試験を実施し、治療開始前に経気管支生検等により 33 例から腫瘍組織を採取し、DNA マイクロアレイにより各症例における癌細胞の約 28000 遺伝子からなる発現プロファイルを取得した。次に感受性群 (CR/PR 症例) と耐性群 (progressive

disease (PD)) の遺伝子発現パターンを比較し、両群間で発現の異なる 51 遺伝子を同定した。これらはゲフィチニブの感受性と関連する遺伝子と考えられ、耐性症例では EGFR のリガンドで癌細胞のアポトーシスを阻害することが報告されている amphiregulin や、¹⁰ 細胞内での薬物代謝に関与し様々な薬剤の耐性化との関連が報告されている glutamate-cysteine ligase¹¹ などが高発現していた。これらの分子は EGFR 阻害剤の耐性克服の新たな治療標的分子となりうると考えられる。

さらにこれらのうち 12 個の遺伝子 (Table 1) の発現パターンが感受性群に近いのか、耐性群に近いのかを weighed vote 法により数値化し、感受性を予測するスコアリングシステムを構築したところ、感受性群、耐性群の全症例の感受性が正しく判定でき、長期間 SD を維持できた症例は感受性群に近いスコアが、TTP が 3 ヶ月未満の SD 症例は耐性群と同様のスコアが得られた。このことから 12 個の遺伝子の発現パターンをみることで治療の適応となる症例 (CR, PR, 長期 SD 症例) と、本薬剤の投与を避けるべき症例を識別できる可能性が示唆された (Figure 3)。ただし、DNA マイクロアレイによる判定は、時間的にも医療経済的にも一般臨床に応用するのは困難である。そこでわれわれはより簡便で迅速な real time RT-PCR 法による感受性予測法を確立し、実地臨床への応用を目指している。real time RT-PCR 法では DNA マイクロアレイの数十分の一の組織量で十数遺伝子の発現量が測定できるため、経気管支生検組織のような微量の組織でも数切片で判定可能である。また、1~3 日で判定できるため臨床応用可能と考えられ、今後前向き臨床試験を予定している。また、遺伝子数を絞り込んだ上で組織免疫染色などによる感受性予測が実現できれば特殊な設備なしに一般病院で比較的低コストで本薬

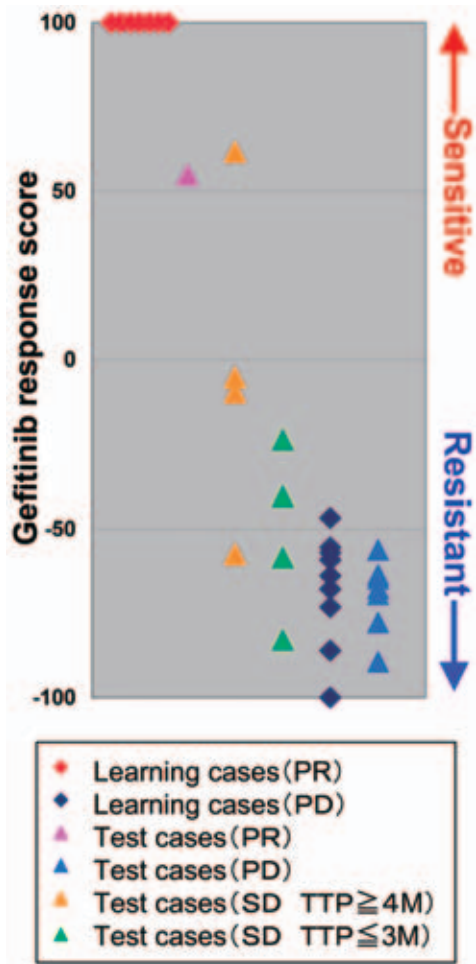


Figure 3. Schematic distinction of learning PR cases, learning PD cases and “test cases” verified by the scoring system to predict the sensitivity of NSCLC to gefitinib based on gene expression. Gefitinib response scores (GRS) to predict the efficacy of gefitinib treatment were calculated based on the relative expression levels of 12 genes listed in Table 1. Patients with positive values were predicted as “responders”, and those with negative values were predicted as “non-responders”. GRS values range from -100 to 100; the higher an absolute value of GRS, the stronger the prediction. Additional (“test”) cases were completely independent of the “learning” cases used for establishing the system. Red diamonds denote prediction scores for learning PR cases and blue diamonds represent learning PD cases. Red triangles indicate test PR cases that had not been used for establishing this scoring system, and blue triangles indicate test PD cases. Yellow triangles indicate test SD cases whose time to progression were over four months (defined as “long SD”), and green triangles indicate test SD cases whose time to progression were within three months (文献9より改変).

剤の感受性を予測することが可能になると期待している。

おわりに

本薬剤の感受性を予測する試みについては上述のほか、FISHによるEGFRの遺伝子増幅の有無^{6,12} 下流のシグナル伝達に関わる分子であるAktのリン酸化など¹³ さまざまなバイオマーカーが報告されている。いずれも単独での臨床応用は困難であるが、複数の方法を組み合わせることにより精度を向上させる試みも検討されている。これらの試みはこれまで疫学的なデータと経験に基づいて薬剤を選択してきた非小細胞肺癌の治療における個別化医療の第一歩となりうると考えている。

また個別化医療の実現には感受性予測だけでなく、有害事象の予測も必要である。SNPsを多型マーカーとして用いた体系的遺伝子多型解析は有害事象情報との相関解析により有害事象を予測する一助になるものと期待される。

REFERENCES

1. <http://www.astrazeneca.com/pressrelease/4245.aspx>
2. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*. 2003;21(12):2237-2246
3. Bailey LR, Kris M, Wolf M, et al. Tumor EGFR membrane staining is not clinically relevant for predicting response in patients receiving gefitinib ('Iressa', ZD1839) monotherapy for pretreated advanced non-small-cell lung cancer; IDEAL1 and IDEAL2. American association for cancer research. 2003
4. イレッサ®錠 250 プロスペクティブ調査 (特別調査) に関する結果と考察. アストラゼネカ. 2004
5. Takeda K. An epidemiological survey for interstitial lung disease induced by gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer, 10th World conference on lung cancer. 2003
6. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(9):643-655
7. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-2139
8. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497-1500
9. Kakiuchi S, Daigo Y, Ishikawa N, et al. Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum Mol Genet*. 2004;13(24):3029-3043

10. Hurbin A, Dubrez L, Coll JL, et al. Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49127-49133
11. Tipnis SR, Blake DG, Shepherd AG, et al. Overexpression of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in HeLa cells increases gamma-glutamylcysteine synthetase activity and confers drug resistance. *Biochem J.* 1999;337(Pt 3):559-566
12. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer-molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med.* 2005;353(2):133-144
13. Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, et al. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1133-1141