

The 23rd Lung Cancer Workshop

肺癌の EGFR-TKI 治療に対するバイオマーカー —EGFR 変異以外を中心に—

杉尾賢二^{1,2}

Biomarkers of Sensitivity for the Treatment of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer

Kenji Sugio^{1,2}

¹Second Department of Surgery, University of Occupational and Environmental Health, Japan; ²Department of Thoracic Oncology, National Kyushu Cancer Center, Japan.

ABSTRACT — Somatic mutations of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in lung adenocarcinoma were significantly associated with response to EGFR-tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as gefitinib and erlotinib. Various kinds of biomarker which show sensitivity or resistance to EGFR-TKI have also been reported. Increased copy numbers of the EGFR gene predicts sensitivity of TKI, in addition to EGFR mutations. Tumors with K-ras mutation rarely show response to EGFR-TKI, which indicates mutation as a resistance marker. Amplification of the MET gene is another mechanism of acquired resistance to EGFR-TKI. Establishment of the biomarker for EGFR-TKI is important to select patients with good response to EGFR-TKI. In addition, the monitoring of acquired resistance mutation in the tumor during EGFR-TKI treatment provides useful genetic information in developing molecular targeting agents.

(JLCC. 2009;49:934-938)

KEY WORDS — Lung cancer, Biomarker, Epidermal growth factor receptor (EGFR), K-ras, MET

Reprints: Kenji Sugio, Department of Thoracic Oncology, National Kyushu Cancer Center, 3-1-1 Notame, Minami-ku, Fukuoka 811-1395, Japan (e-mail: sugio.k@nk-cc.go.jp).

要旨 — 上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor) 遺伝子変異が、チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI: gefitinib, erlotinib) の治療効果と極めて強い関連があることが示され、一方、EGFR 変異以外にも、EGFR-TKI の感受性や耐性を規定する種々のバイオマーカーが報告されてきた。EGFR 増幅・コピー数増加は、欧米を中心にバイオマーカーとしての意義が示されてきたが、日本においては EGFR 変異を凌駕するものではない。K-ras 変異例で EGFR-TKI に奏効する症例はほとんどなく、本治療に対する耐性のバイオマーカーと考えられる。MET 遺伝子増幅・コピー数増加は、EGFR-

TKI 治療過程で生じ耐性に関与する。EGFR-TKI の適応をより明確にするためには、感受性の高い患者を選択するための効果予測のバイオマーカーを同定・確立することが重要であるとともに、効果が期待できない症例を除外することも、致命的な有害事象を回避する上でも重要である。また、EGFR-TKI 治療中の耐性変異のモニタリングも重要で、現在開発中の種々の新規分子標的薬の適応を決定するための有用な遺伝子情報となるであろう。

索引用語 — 肺癌, バイオマーカー, 上皮成長因子受容体 (EGFR), K-ras, MET

¹産業医科大学第2外科; ²国立病院機構九州がんセンター呼吸器科。

別刷請求先: 杉尾賢二, 国立病院機構九州がんセンター呼吸器

科, 〒811-1395 福岡市南区野多目 3-1-1 (e-mail: sugio.k@nk-cc.go.jp).

はじめに

近年の分子標的研究の進歩により、分子標的薬に対する治療効果予測が遺伝子学的に可能となり、肺癌治療における個別化治療が現実のものとなってきた。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異が、チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI: gefitinib, erlotinib) の治療効果と極めて強い関連があることが示され、EGFR 変異の有無が EGFR-TKI の感受性予測因子としてのバイオマーカーとなることは肺癌治療における大きなトピックスであった。一方、EGFR 変異以外にも、EGFR-TKI の感受性や耐性を規定する種々のバイオマーカーが報告されてきた。EGFR-TKI の適応をより明確にするためには、感受性の高い患者を選択するための効果予測のバイオマーカーを同定・確立することが重要であるとともに、効果が期待できない症例を除外することも致命的な有害事象を回避する上で重要である。EGFR-TKI の感受性・耐性の予測因子として EGFR 遺伝子変異が挙げられるが、ここでは、EGFR 変異以外のバイオマーカーについて、我々の施設 (産業医科大学) の解析結果を含めて解説する。

EGFR 増幅・コピー数増加

日本では、EGFR 変異が EGFR-TKI 感受性のバイオマーカーとしての地位を確立したのに対して、欧米では EGFR 遺伝子の増幅 (コピー数の増加) が感受性のバイオマーカーとして重要視されてきた。その検出方法は、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) もしくは quantitative real time PCR である。Hirsch らは、FISH 陽性を high polysomy と gene amplification とし、陰性を disomy と low trisomy とし、EGFR 変異症例での EGFR-TKI の奏効率を解析し、FISH 陽性、陰性の奏効率は各々 26%、11% で、FISH 陽性例で有意に生存延長が認められた。¹ 一方、Takano らは、quantitative real time PCR にて EGFR 増幅を 3 コピー以上とそれ未満に分類

し、gefitinib 奏効率は 3 コピー以上の症例で 72%、3 コピー未満の症例で 38% と報告している。同時に EGFR 変異も解析し、gefitinib 奏効率は EGFR 変異症例では 82%、野生型で 11% とより顕著な差を認めている。ちなみに、EGFR 増幅例 (3 コピー以上) での EGFR 変異率は 76% (22/29) で、EGFR 3 コピー未満での EGFR 野生型の率は 54% (20/37) であり、したがって、一致率は 63% となる。² Table 1 にこれまでの報告をまとめているが、^{1,7} 日本の腺癌症例では、EGFR 変異率が高く、かつ、EGFR-TKI に対する感受性が高いことが retrospective にも prospective^{8,9} にも示されており、少なくとも日本においては、EGFR 増幅 (コピー数増加) は EGFR 変異を凌駕するバイオマーカーではない。

K-ras 変異

K-ras 遺伝子は、第 12 染色体 (12p12) に位置する癌遺伝子であり、そのシグナルは EGFR や HER2 の下流に位置している。K-ras 遺伝子は点突然変異により活性化され、その変異はコドン 12, 13, 61 に起こるが、多くはコドン 12 である。これらの K-ras 遺伝子変異は、EGFR 変異と同様に腺癌に特異的に起こっているが、人種差については EGFR 変異と異なり、欧米人の腺癌では約 30% に認められるのに対し、¹⁰ 日本人では 10~15% 程度である。¹¹ また、喫煙との関係も EGFR 変異と反対であり、EGFR 変異が非喫煙者に高頻度に認められるのに対し、K-ras 変異は重喫煙者ほど高頻度であることが従来から指摘されている。そして、EGFR 変異と K-ras 変異はお互いに排他的関係にあることが報告されている。¹²

我々の施設では、肺腺癌切除例 488 例について EGFR 変異と K-ras の遺伝子変異解析を行い、EGFR 変異は 37.7%、K-ras 変異は 10.0% に認め、その変異がいずれも陽性のものはなく、これまでの報告と同様に排他的関係にあった。EGFR 変異は、非/低喫煙者に有意に多いのに対し、K-ras 変異は、重喫煙者で多く認められた (Figure 1)。経過中に gefitinib 治療を施行した症例を除いた症例

Table 1. EGFR Copy Number and Sensitivity to EGFR-TKI

Author	Method	TKI	Response rate		Reference
			Copy number High	Low	
Hirsch (SWOG) (2005)	FISH	Gefitinib	26%	11%	1
Cappuzzo (2005)	FISH	Gefitinib	36%	3%	4
Tsao (BR.21) (2005)	FISH	Erlotinib	20%	2%	7
Hirsch (ISEL) (2006)	FISH	Gefitinib	16.4%	3%	6
Takano (2005)	Quantitative PCR	Gefitinib	72%	38%	2
Bell (IDEAL, INTACT) (2005)	Quantitative PCR	Gefitinib	29%	15%	3
Dziedziszko (2006)	Quantitative PCR	Gefitinib	12%	10%	5

での予後解析において、手術後の無再発生存（disease-free survival：DFS）、および全生存（overall survival：OS）ともに、K-ras 変異群で有意に予後不良であった（DFS： $p=0.0134$ ，OS： $p=0.0451$ ）（Figure 2）。これは、第I期症例に限るとより顕著であった（DFS： $p<0.0001$ ，OS： $p<0.0001$ ）。すなわち K-ras 変異自体は、予後不良因子（prognostic factor）と考えられる。術後再発症例において gefitinib 治療を施行した 31 例の解析では、K-ras 変異を有する 4 例に gefitinib 治療奏効例はなく、一方、K-ras 変異のない 27 例での奏効例は 15 例でありその全ては EGFR 変異例であった。すなわち、K-ras 変異は EGFR-TKI に対して耐性のバイオマーカーといえる。Gefitinib 治療開始を起点とした生存解析にても、K-ras 変異例は有意に予後不良であった（ $p=0.0070$ ）。

Miller らは、erlotinib に対する奏効率は、EGFR 変異例で 83%（15/18）、EGFR CISH（chromogenic *in situ* hybridization）陽性例で 23%（10/43）、K-ras 変異例では奏

効例を認めていない（0/18）。¹³ 彼らの示した waterfall plot を見ると、K-ras 変異例のうち 12 例が stable disease（SD）であることは議論の余地があるが、progression-free survival（PFS）、OS ともに不良であり、少なくとも survival benefit はないと考えられる。BR.21 試験のサブ解析でも K-ras 変異は、erlotinib 治療に対して survival benefit はないと結論している。

これまでに報告された症例と我々の施設での症例を集計したのが Table 2^{6,13-22} であるが、K-ras 変異症例での EGFR-TKI の治療奏効例は、わずかに Hirsch らの 2 例のみであり、¹⁸ 報告例の集計では 124 例の K-ras 変異例で、EGFR-TKI 奏効例はその 2 例のみであり、1.6% にすぎない。K-ras 野生型の場合には 550 例中 141 例の奏効（25.6%）であり、EGFR-TKI の感受性は EGFR 変異を主とするバイオマーカーに規定されると考えられる。すなわち、K-ras 変異は EGFR-TKI に対する negative predictive factor であるとともに unfavorable prognostic factor と考えられ、EGFR-TKI 治療に対し、積極的な適応からは除外すべきであろう。

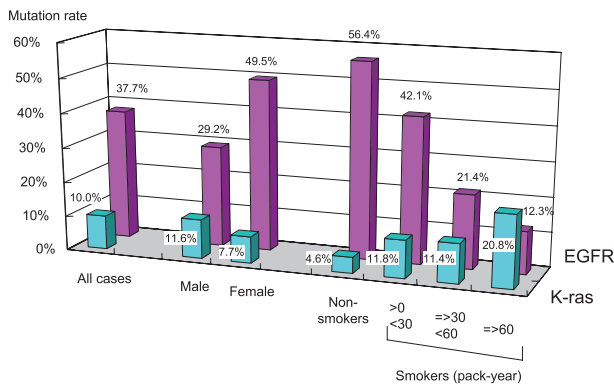


Figure 1. The mutation rate of EGFR and K-ras genes in lung adenocarcinoma patients.

MET 遺伝子増幅・コピー数増加

MET 遺伝子は、hepatocyte growth factor（HGF）の受容体であり、tyrosine kinase domain を有し、第7染色体（7q31）に存在する。2007年に Engelman らが、もともと EGFR exon19 deletion を有する gefitinib 感受性細胞株（HCC827）から作成した耐性株（HCC827GR）において、MET 遺伝子の増幅を見だし、MET 増幅により ERBB3 シグナルが活性化され gefitinib 耐性となることを示した。²³ 彼らは、EGFR-TKI 耐性腫瘍の 22%（4/18）に MET 増幅を認めた。また、Bean らも同様に EGFR-TKI 耐性腫瘍の 21%（9/43）に MET 増幅を認め報告し

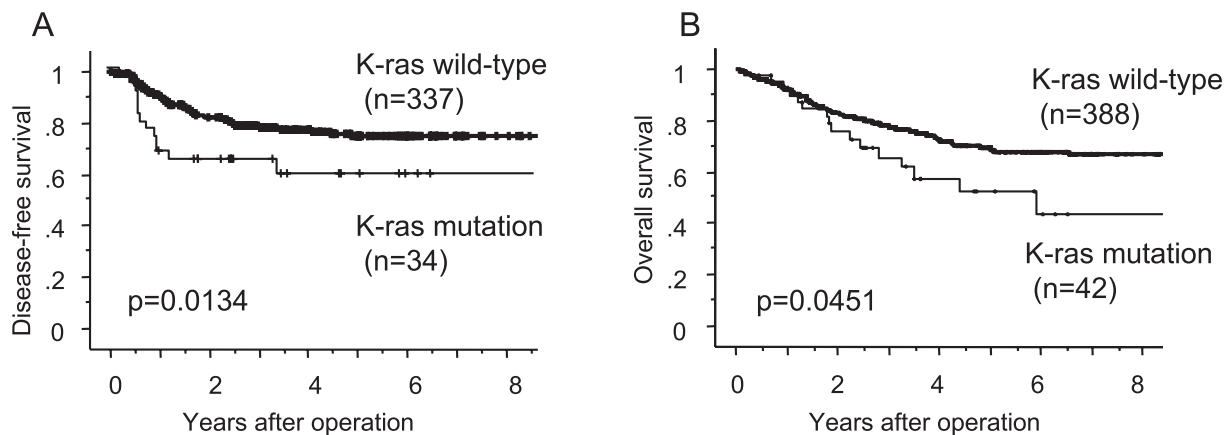


Figure 2. Prognosis for adenocarcinoma patients in relation to K-ras status who did not receive TKI (gefitinib)-treatment. A: Disease-free survival, B: Overall survival.

Table 2. K-ras Mutation as a Negative Predictive Biomarker for EGFR-TKI

Author	TKI	Response rate		Reference
		Mutation	Wild-type	
Pao (2005)	Gefitinib/Erlotinib	0/9	21/50	21
Hirsch (ISEL) (2006)	Gefitinib	0/6	7/87	6
Endoh (2006)	Gefitinib	0/6	24/46	15
Giaccone (2006)	Erlotinib	0/10	4/15	16
Han (2006)	Gefitinib	0/9	16/60	17
Cappuzzo (2007)	Gefitinib	0/1	-	14
Hirsch (2007)	Gefitinib	2/36	19/102	18
Jackman (2007)	Erlotinib	0/6	5/35	19
Massarelli (2007)	Gefitinib/Erlotinib	0/16	7/54	20
van Zandwijk (2007)	Gefitinib	0/3	3/12	22
Miller (2008)	Erlotinib	0/18	20/62	13
Present study	Gefitinib	0/4	15/27	
Total		2/124 (1.6%)	141/550 (25.6%)	

ている。²⁴ MET 増幅は、EGFR T790M 変異と同時に起こりうることを示されている。また、EGFR-TKI 未治療の腫瘍における MET 増幅は、Bean らは 3.2% (2/62)²⁴ に、Beau-Faller らは 20% (10/49) に検出している。²⁵ MET 増幅の解析は、quantitative real time PCR もしくは FISH にて行われており、各論文によって増幅の判定基準が異なることもあり、一概に比較できない面もあるが、MET 増幅は腫瘍形成時にある程度の頻度で起こっていると考えられる。

EGFR-TKI 初回治療に際して、MET 増幅の程度と EGFR-TKI 治療効果に関するデータはほとんどないため、今後の臨床成績の集積が必要となるが、EGFR-TKI 治療経過においては耐性のバイオマーカーとなる。

その他のバイオマーカー

HER2 遺伝子の変異は exon20 内の挿入変異であることが多いが、その変異症例での EGFR-TKI に対する治療奏効例はなかったと報告されている。¹⁷ 一方、HER2 FISH 陽性例は、EGFR 変異を有する症例での TKI 治療に奏効するとの報告²⁶ もあり、変異と増幅を区別して、EGFR-TKI に対するバイオマーカーとしての評価を行うべきであろう。

その他、EGFR-TKI 治療効果のバイオマーカーとして BRAF, PIK3CA, PTEN などが挙げられるが、変異頻度が低いこともありバイオマーカーとしての評価は定まっていない。Endoh らは、PTEN と PIK3CA の発現と EGFR-TKI 治療効果との関連は認めていないが、各々の高発現症例は、低発現症例に比較し、予後良好であることを報告している。¹⁵ EGFR 変異との関係においては、K-ras, MET, HER2, BRAF は EGFR 変異と同時に起こらない排他的関係にあるといわれている。

おわりに

EGFR-TKI に対する感受性や耐性という治療効果が、EGFR 遺伝子変異を主に、種々のバイオマーカーによって極めて正確に予測可能となってきた。すなわち遺伝子型に則した医療 (genotype-based medicine) といえる個別化治療である。²⁷ EGFR-TKI による肺癌治療は、間質性肺炎という重篤な有害事象を呈する危険性があるが、ネガティブセレクションのバイオマーカーの確立は、このようなリスクの回避にも寄与する。また、EGFR-TKI 治療中の耐性変異のモニタリングも重要で、現在開発中の種々の新規分子標的薬の適応を決定するための有用な遺伝子情報ともなるであろう。

REFERENCES

- Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2005;23:6838-6845.
- Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, Tsuta K, Matsuno Y, Tateishi U, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:6829-6837.
- Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol.* 2005;23:8081-8092.
- Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell

- lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:643-655.
5. Dziadziuszko R, Witta SE, Cappuzzo F, Park S, Tanaka K, Danenberg PV, et al. Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3078-3084.
 6. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:5034-5042.
 7. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med.* 2005;353:133-144.
 8. Inoue A, Suzuki T, Fukuhara T, Maemondo M, Kimura Y, Morikawa N, et al. Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J Clin Oncol.* 2006;24:3340-3346.
 9. Tamura K, Okamoto I, Kashii T, Negoro S, Hirashima T, Kudoh S, et al. Multicentre prospective phase II trial of gefitinib for advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutations: results of the West Japan Thoracic Oncology Group trial (WJTOG 0403). *Br J Cancer.* 2008;98:907-914.
 10. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med.* 1990;323:561-565.
 11. Sugio K, Ishida T, Yokoyama H, Inoue T, Sugimachi K, Sasazuki T. ras gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. *Cancer Res.* 1992;52:2903-2906.
 12. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res.* 2004;64:8919-8923.
 13. Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, Li AR, Patel JD, Heelan RT, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol.* 2008;26:1472-1478.
 14. Cappuzzo F, Ligorio C, Jänne PA, Toschi L, Rossi E, Trisolini R, et al. Prospective study of gefitinib in epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridization-positive/phospho-Akt-positive or never smoker patients with advanced non-small-cell lung cancer: the ONCOBELL trial. *J Clin Oncol.* 2007;25:2248-2255.
 15. Endoh H, Yatabe Y, Kosaka T, Kuwano H, Mitsudomi T. PTEN and PIK3CA expression is associated with prolonged survival after gefitinib treatment in EGFR-mutated lung cancer patients. *J Thorac Oncol.* 2006;1:629-634.
 16. Giaccone G, Gallegos Ruiz M, Le Chevalier T, Thatcher N, Smit E, Rodriguez JA, et al. Erlotinib for frontline treatment of advanced non-small cell lung cancer: a phase II study. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6049-6055.
 17. Han SW, Kim TY, Jeon YK, Hwang PG, Im SA, Lee KH, et al. Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res.* 2006;12:2538-2544.
 18. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F, McCoy J, Bemis L, Xavier AC, et al. Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol.* 2007;18:752-760.
 19. Jackman DM, Yeap BY, Lindeman NI, Fidias P, Rabin MS, Temel J, et al. Phase II clinical trial of chemotherapy-naïve patients ≥ 70 years of age treated with erlotinib for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25:760-766.
 20. Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2890-2896.
 21. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med.* 2005;2:e17.
 22. van Zandwijk N, Mathy A, Boerrigter L, Ruijter H, Tielen I, de Jong D, et al. EGFR and KRAS mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro- and prospective observations in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2007;18:99-103.
 23. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316:1039-1043.
 24. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:20932-20937.
 25. Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC, Neuville A, Meyer N, Guerin E, et al. MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort. *J Thorac Oncol.* 2008;3:331-339.
 26. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Shigematsu H, Domenichini I, Bartolini S, Ceresoli GL, et al. Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 2005;23:5007-5018.
 27. Mitsudomi T, Yatabe Y. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Sci.* 2007;98:1817-1824.