

## The 30th Lung Cancer Workshop

## 肺がんのバイオマーカー：分子標的薬耐性を中心に

矢野聖二<sup>1</sup>

## Biomarkers for Lung Cancer: Focusing on Targeted Drug Resistance

Seiji Yano<sup>1</sup><sup>1</sup>Division of Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Japan.

**ABSTRACT** — Several driver oncogenes, including *EGFR* mutations, *ALK* rearrangement, *ROS-1* rearrangement, and *RET* rearrangement, have been identified in lung adenocarcinoma. *EGFR* tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and *ALK*-TKIs have been approved for lung cancer with *EGFR* activating mutations and *ALK* rearrangements, respectively. In addition, many targeted drugs for other oncogenic drivers are also being evaluated for efficacy in clinical trials. *EGFR*-TKIs and *ALK*-TKIs show dramatic therapeutic efficacy against lung cancer with *EGFR* mutation and *ALK* rearrangement, respectively. However, the responders almost invariably acquire resistance to *EGFR*-TKIs within several years. The representative mechanism is a secondary mutation in the target. A new generation of TKIs, which inhibit secondary mutations, has been developed and evaluated for efficacy in clinical trials. Apoptosis resistance is another important mechanism of TKI resistance. *BIM* polymorphism is associated with *EGFR*-TKI resistance in *EGFR* mutant lung cancer. We found that a HDAC inhibitor, vorinostat, could overcome *EGFR*-TKI resistance associated with *BIM* polymorphism. According to this observation, we are currently evaluating the safety and efficacy of treatment with *EGFR*-TKI and vorinostat in an investigator initiated trial (VICTORY-J).

(JLCC. 2016;56:55-60)

**KEY WORDS** — *EGFR*-TKI, *ALK*-TKI, Acquired resistance, T790M mutation, *BIM* polymorphism

**要旨** — 肺腺がんにおいて、*EGFR* 遺伝子変異の発見を皮切りに *ALK* 融合遺伝子や *ROS-1* 融合遺伝子、*RET* 融合遺伝子など、数多くのドライバー遺伝子異常が発見された。*EGFR* チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) と *ALK*-TKI は既に認可されて、一般臨床の場で使用されている。それ以外のドライバーを有する肺がんに対しては、現在対応する分子標的薬による治験が行われており、有効性が検討されている。一方、*EGFR*-TKI や *ALK*-TKI は、それぞれ *EGFR* 変異や *ALK* 融合遺伝子を有する肺がんに対し一旦奏効するが、数年以内に獲得耐性により再発することが次なる臨床的問題となっている。最も代表的な耐性機構は標的遺伝子の 2 次的変異である。2 次

的変異にも有効な次世代 *EGFR*-TKI や *ALK*-TKI も開発が進められている。アポトーシス抵抗性も重要な耐性機構の一つである。東洋人特異的な *BIM* 遺伝子多型は *EGFR*-TKI 耐性を惹起する。我々は、HDAC 阻害薬ポリノスタットを併用することで *BIM* 遺伝子多型に起因した *EGFR*-TKI 耐性を解除しうることを明らかにし、現在 *EGFR*-TKI とポリノスタット併用の医師主導治験 (VICTORY-J) を行い、安全性と有効性を検討している。**索引用語** — *EGFR* チロシンキナーゼ阻害薬、*ALK* チロシンキナーゼ阻害薬、獲得耐性、T790M 変異、*BIM* 遺伝子多型

<sup>1</sup>金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科.

はじめに

肺がんは、わが国の悪性新生物の死亡原因の1位であり、肺がんによる死亡数はいまだに増加し続けている。肺がんにおいては、EGFR 遺伝子変異の発見を皮切りに ALK 融合遺伝子や ROS-1 融合遺伝子、RET 融合遺伝子など、数多くのドライバー遺伝子異常が発見された (Figure 1)。EGFR 遺伝子変異を有する肺がん (EGFR 変異肺がん) には3種類の EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) が、ALK 融合遺伝子を有する肺がん (ALK 肺がん) には2種類の ALK-TKI が認可されて、一般臨床の場で使用されている。EGFR 変異や ALK 融合遺伝子以外のドライバーを有する肺がんに対しては、現在対応する分子標的薬による治験が行われており、有効性が検討されている。一方、EGFR-TKI や ALK-TKI は、それぞれ EGFR 変異や ALK 融合遺伝子を有する肺がんに対し、一旦奏効し一定の延命効果を示すが、獲得耐性により再発することや一部の症例においては初期耐性を示すことが次なる臨床的問題となっている。本稿では、肺がんの分子標的治療の現状を紹介し、耐性機構や耐性克服治療の最近の知見を概説する。

1. 肺がんのドライバー遺伝子異常

肺腺がんに多くのドライバー遺伝子異常が発見されている。2004年にはEGFR-TKIが著効した症例の腫瘍検体のシーケンスなどにより活性型EGFR遺伝子変異 (exon 19欠失とL858R変異)が発見され、EGFR-TKIの真の分子標的であることが確認された。<sup>1</sup> 2007年には、患者腫瘍より作製されたcDNAライブラリーを線維芽細胞に導入し、フォーカス形成させる遺伝子異常としてALK融合遺伝子 (その90%がEML4と融合するEML4-ALK)が発見された。<sup>2</sup> EGFR変異肺がん と ALK肺がんに対しては、それぞれEGFR-TKI (ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ) と ALK-TKI (クリゾチニブ、アレクチニブ) の臨床的効果が確認され、認可されている。さらに、2012年にはRNAシーケンスや未知のパートナーを有する融合遺伝子探索により、ROS-1融合遺伝子やRET融合遺伝子が発見された。<sup>3,4</sup> その後、HER2変異やBRAF変異、NTRK1融合遺伝子、MET exon 14 skipping変異など数多くのドライバー遺伝子異常が発見され、それぞれの分子標的薬による臨床試験が進められている。

BRAF V600E 変異：メラノーマの約50%はBRAF V600E変異を有するが、肺腺がんにおいては1%の症

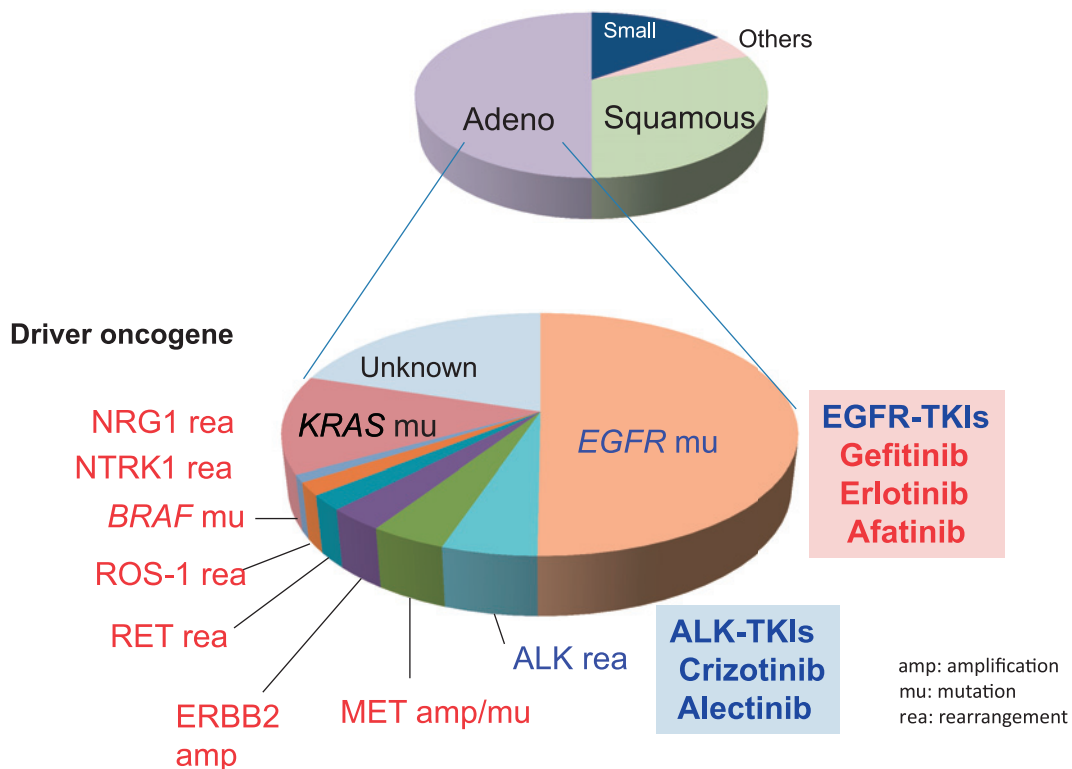


Figure 1. Driver oncogenes in lung cancer.

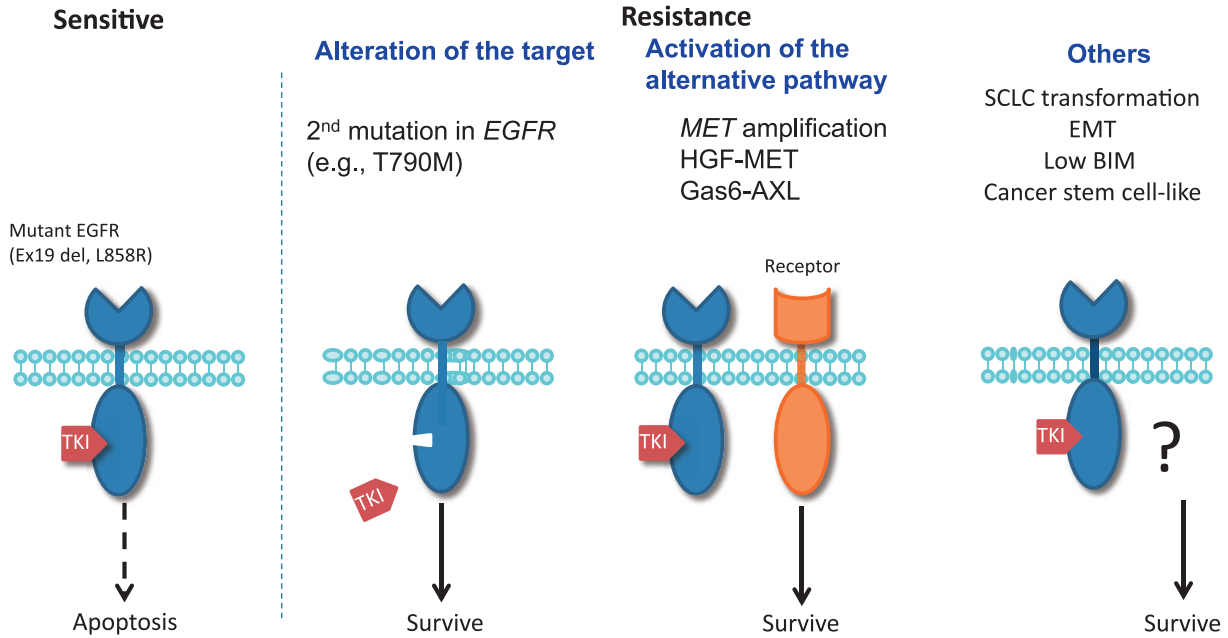


Figure 2. Major mechanisms of resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer.

例が BRAF V600E を有する。BRAF V600E 肺がんにおいて、BRAF 阻害薬 (dabrafenib) と MEK 阻害薬 (trametinib) 併用の奏効率は 63% と、以前に行われた dabrafenib 単独の奏効率 (32%) よりはるかに高く、この併用療法がメラノーマのみならず肺腺がんにおいても、BRAF V600E 変異陽性症例に有効であることが示された。<sup>5</sup>

MET exon 14 skipping 変異：肺腺がんの約 4% に検出される。<sup>6</sup> これは MET の exon 14 の splicing が入る場所に変異・欠失が起こることで、MET のユビキチン化に必要なユビキチンリガーゼ (Cbl) の結合部位がなくなり、MET 蛋白の分解や HGF によるリガンド刺激後のターンオーバーが遅延し、MET 蛋白の過剰発現と同様な活性化が起こると考えられている。MET 阻害活性を有する cabozantinib やクリゾチニブ治療により腫瘍が退縮した症例が報告されている。<sup>7</sup>

RET 融合遺伝子：肺腺がんの約 1% に検出される。<sup>3,4</sup> RET のパートナー遺伝子としては KIF5B や CCDC6 などが知られている。RET 阻害活性を有する cabozantinib による臨床試験において 16 例の成績が発表され、奏効率 38%、病勢制御率 56%、無増悪生存期間 7.0 か月、全生存期間 10.0 か月であった。<sup>8</sup> 半数の症例で副作用のため薬剤減量を要しており、より抗腫瘍効果が高く毒性の低い薬剤の開発が必要と考えられる。日本においては、vandetanib による医師主導治験 (研究代表者：後藤功一博士) の症例登録が完了しており、その結果に期待が集まっている。

我々も、ALK 肺がんに承認されているアレクチニブが RET 阻害活性を有していることから、RET 肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験 (ALL-RET) を計画中で、2016 年 2 月より症例登録開始を予定している。

## 2. 分子標的薬耐性の分子機構

肺がんにおける分子標的薬耐性の主なメカニズムとしては、標的遺伝子の変異 (gatekeeper mutation あるいは second mutation)、標的遺伝子の増幅、側副経路の活性化、標的の下流の活性化、その他のメカニズムなどがある (Figure 2)。標的遺伝子の変異が生じると、標的への薬剤結合性が低下し、生存シグナルを止められなくなり耐性化する。側副経路や標的の下流が活性化されると、薬剤が本来の標的を阻害しても側副経路や下流シグナルにより生存シグナルが補われてしまうため耐性化する。以下に、主な分子標的薬の耐性機構と耐性克服治療開発の現状を示す。

### 1) 第 1 世代 EGFR-TKI に対する耐性機構

EGFR 変異肺がんに対し、第 1 世代 EGFR-TKI (可逆的に EGFR に結合) のゲフィチニブやエルロチニブ、第 2 世代 EGFR-TKI (不可逆的に EGFR に結合) のアファチニブはそれぞれ単独で奏効率 70~80%、無増悪生存期間 9~14 か月程度の効果を示す。その結果、ドライバー遺伝子異常を有さない進行期非小細胞肺がんの全生存期間がおおよそ 12~14 か月であるのに対し、活性型 EGFR 変異陽性非小細胞肺がんが EGFR-TKI で治療された場合の全生存期間は 25 か月以上と、2 倍近く延長された。

しかしながら、ほぼ全例で獲得耐性により再発することや、一部の症例においては初期耐性を示すことが問題となっている。

EGFR-TKIの獲得耐性の約60%はgatekeeper mutation(薬剤結合部位に相当する部位の変異)であるEGFR exon 20のT790M変異により生じる。<sup>9</sup> T790M変異が生じることにより、EGFRとATPとの結合性が高まる結果、EGFR-TKIのEGFRへの結合が低下し薬剤耐性が惹起されると考えられている。<sup>10</sup>

その他の耐性メカニズムとして、MET遺伝子増幅、HGF過剰発現、<sup>11</sup> 小細胞がん転化、EMT、BIM発現低下によるアポトーシス抵抗性などがある。1個の耐性腫瘍の中に異なる機構で耐性化しているがん細胞が混在している場合もある。

## 2) 第3世代EGFR-TKIに対する耐性機構

T790M変異による耐性に対しては、変異EGFR選択的TKI(第3世代EGFR-TKI)の開発が進んでいる。第3世代EGFR-TKIはexon 19欠失やL858R変異に加えてT790M変異のあるEGFRにも阻害活性を有するが、野生型EGFRには阻害活性の弱い薬剤である。CO-1686やAZD9291をはじめとする多くの薬剤の臨床試験が進められている。初期の報告では、第1世代EGFR-TKI治療歴のあるEGFR変異肺がんに対し約60%の奏効率を示し、<sup>12,13</sup> 無増悪生存期間も6か月以上が見込まれている。CO-1686は高血糖が生じることが特徴的である。

既に、第3世代EGFR-TKIに対する耐性メカニズムも解明されつつある。AZD9291の耐性機構としてEGFR exon 20のC797S変異が報告された。<sup>14</sup> AURA studyで採取された7症例の、治療前後のcell free plasma DNAを用いた次世代シーケンスにより発見された。さらに、Ba/F3細胞を用いた*in vitro*の実験で、T790Mとシス(同じallele)に入ったC797SがAZD9291耐性を誘導することが確認されている。C797S変異は、rociletinibにも耐性を誘導する。Digital PCRで、AZD9291治療前にはexon 19欠失とT790Mは検出されるがC797Sはなく、治療後にC797Sも検出されることが確認されている。この報告ではAZD9291耐性の15例中6例40%にC797Sが検出(いずれもexon 19欠失陽性例)されている。2015年9月に開催された世界肺癌学会における症例を追加した報告では、exon 19欠失陽性例では22%、L858R陽性例にも8%にC797Sが検出されたことが発表された。したがって、C797Sはexon 19欠失陽性例に出現する頻度が高いが、頻度は低いながらもL858R陽性例にも出現するといえよう。

## 3) BIM遺伝子多型によるEGFR-TKI耐性と克服に向けた医師主導治験

EGFR-TKIにさらされたEGFR変異肺がん細胞はア

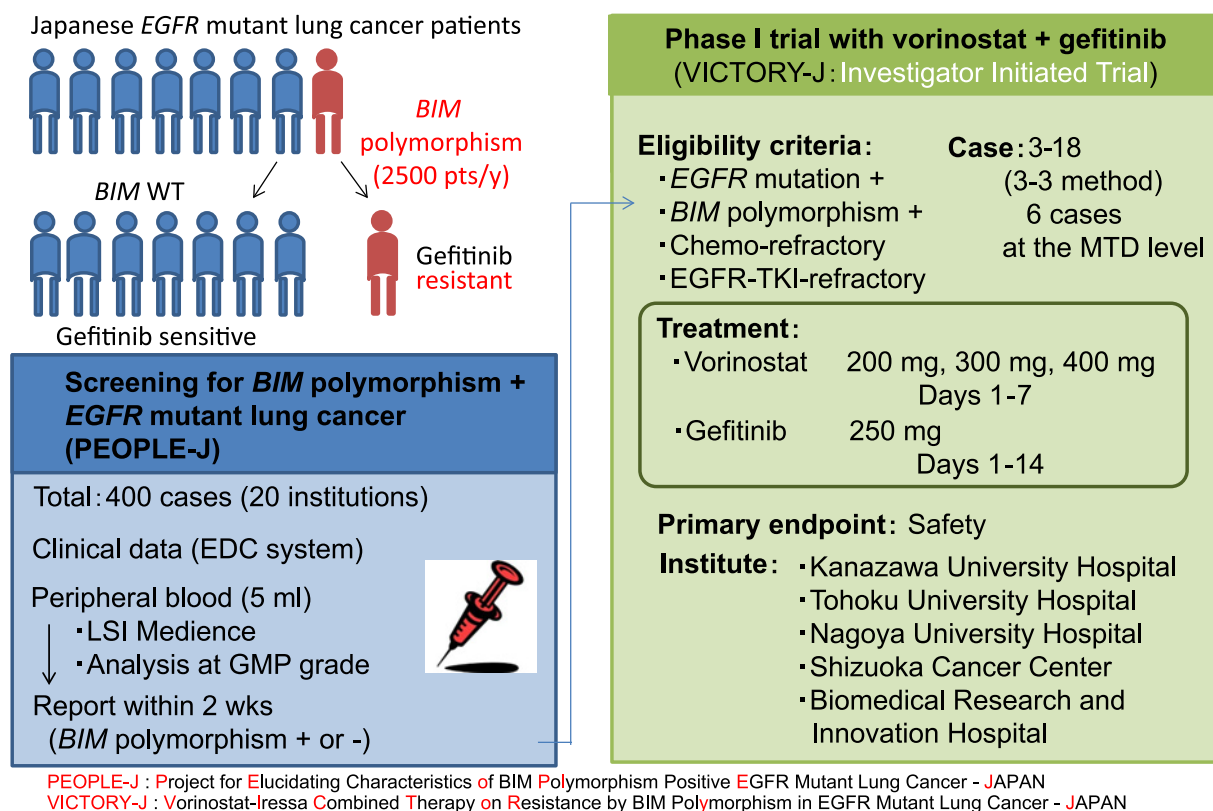
ポトーシスを起こすが、この場合Bcl2ファミリーに属するBIM(BCL2L1とも呼ばれる)がアポトーシスを誘発する因子として知られている。BIM発現の低い肺がん細胞は、活性型EGFR変異を有していてもEGFR-TKI感受性が低い。また、近年BIM遺伝子多型(イントロン2の2.9 kb領域の欠失)が東洋人(13%程度)に特異的に(白人にはほとんどない)みられることが明らかにされた。<sup>15</sup> BIMはERKシグナルによりユビキチン化され分解されるが、EGFR-TKIでERKシグナルが遮断されると分解が抑制され、BIM蛋白質量が増加し細胞はアポトーシスに陥る。すなわちEGFR-TKIががん細胞を死滅させるのである。しかし、BIM遺伝子多型によりEGFR-TKIでERKシグナルが遮断されてもBIM蛋白質発現が低下した状態となり、がん細胞はEGFR-TKIによるアポトーシスに抵抗性となる。EGFR変異肺がんは日本を含む東アジア人に多く、BIM遺伝子多型も東アジア人特異的にみられるが、BIM遺伝子多型はEGFR変異肺がんを含む肺がんには関与していない。<sup>16</sup> 最近のメタ解析は、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺がん症例ではBIM遺伝子多型のないEGFR変異肺がん症例と比較し奏効率には大差がないが、無増悪生存期間が短いことを示しており、<sup>17</sup> BIM遺伝子多型はEGFR-TKI抵抗性因子であり獲得耐性のもととなる細胞数を増加させる役割を果たしているのかもしれない。

我々は、皮膚T細胞性リンパ腫に認可されているヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬(ボリノスタット)が、BIM遺伝子多型を有するがん細胞においてBIM蛋白質発現を回復させEGFR-TKI抵抗性を解除することを明らかにした。<sup>18</sup> 現在、EGFR変異肺がん患者の中からBIM遺伝子多型陽性症例をスクリーニングする研究(PEOPLE-J)、および標準治療に抵抗性を示したBIM遺伝子多型陽性EGFR変異肺がん患者を対象にボリノスタットとゲフィチニブ併用による治療効果の安全性を確認する医師主導治験(VICTORY-J)を実施している(Figure 3)。

## 4) ALK-TKI耐性

ALK肺がんに対し第1世代ALK-TKIであるクリゾチニブは、奏効率60~80%、無増悪生存期間9~10か月程度と、EGFR変異肺がんに対する第1世代EGFR-TKIとほぼ同等の効果を示す。<sup>19</sup>

臨床的に意義が確認されているクリゾチニブ耐性機構としては、ALKキナーゼドメインの遺伝子変異、ALK遺伝子増幅がある。<sup>20</sup> EGFR-TKI耐性とは異なり、ALK-TKI耐性を惹起するALKキナーゼドメインの遺伝子変異は多数知られている。最も代表的なものはEGFRのT790Mに相当するgatekeeper mutationであるL1196M変異であるが、<sup>21</sup> その他C1156Y、G1269A、



**Figure 3.** Study for overcoming BIM polymorphism-associated EGFR-TKI resistance by the combined use of vorinostat in EGFR mutant lung cancer.

F1174L, I1151Tins, L1152R, G1202R, S1206Y 変異などがある。

側副経路の活性化により耐性を惹起するものとして、EGFR リガンドによる EGFR の活性化、SCF (stem cell factor) による増幅 KIT の活性化がある。また、他のドラッグシグナルへのスイッチとして EGFR 遺伝子変異、KRAS 遺伝子変異などが報告されている。

第 2 世代の ALK-TKI としてアレクチニブと ceritinib がそれぞれ日本と米国で承認されている。いずれも、L1196M に阻害活性を有する一方、G1202R は阻害できない。クリゾチニブも G1202R は阻害できないため、G1202R は現在認可されている ALK-TKI の共通の耐性遺伝子異常であると考えられている。しかし、その他の 2 次的遺伝子変異に対してはクリゾチニブ、アレクチニブ、ceritinib は異なる活性スペクトルを有しており、第 2 世代 ALK-TKI 耐性となった場合でも第 1 世代 ALK-TKI のクリゾチニブが効く可能性があることを示している。ALK 選択性の高いアレクチニブに対しては、HGF による MET 活性化が耐性を誘導し、MET 阻害活性も併せ持つクリゾチニブが奏効する可能性もあり、第 2 世代 ALK-TKI 耐性においても MET 遺伝子増幅などの側副経路活性化が関与する場合があることが示唆される。

### おわりに

肺がんの分子標的薬耐性の分子機構解明は、耐性臨床検体を用いたりバーストランスレーショナルリサーチによって近年驚くべきスピードでなされている。耐性克服薬の臨床開発も進んでおり、分子標的薬による肺がん治療成績のさらなる向上が期待される。

本論文内容に関連する著者の利益相反：矢野聖二[研究費]アストラゼネカ(株)

### REFERENCES

1. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, 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.
2. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448:561-566.
3. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med.* 2012;18:375-377.

4. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18:378-381.
5. Planchard D, Groen HJM, Kim TM, Rigas JR, Souquet PJ, Baik CS, et al. Interim results of a phase II study of the BRAF inhibitor (BRAFi) dabrafenib (D) in combination with the MEK inhibitor trametinib (T) in patients (pts) with *BRAF* V600E mutated (mut) metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*. 2015;33(Suppl):abstr 8006.
6. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511:543-550.
7. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov*. 2015;5:850-859.
8. Drilon AE, Sima CS, Somwar R, Smith R, Ginsberg MS, Riely GJ, et al. Phase II study of cabozantinib for patients with advanced *RET*-rearranged lung cancers. *J Clin Oncol*. 2015;33(Suppl):abstr 8007.
9. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Koehler O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2005;352:786-792.
10. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, Woo MS, Greulich H, Wong KK, et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:2070-2075.
11. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res*. 2008;68:9479-9487.
12. Jänne PA, Yang JC, Kim DW, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372:1689-1699.
13. Sequist LV, Soria JC, Goldman JW, Wakelee HA, Gadgeel SM, Varga A, et al. Rocicetinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372:1700-1709.
14. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, et al. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med*. 2015;21:560-562.
15. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med*. 2012;18:521-528.
16. Ebi H, Oze I, Nakagawa T, Ito H, Hosono S, Matsuda F, et al. Lack of association between the BIM deletion polymorphism and the risk of lung cancer with and without EGFR mutations. *J Thorac Oncol*. 2015;10:59-66.
17. Ying HQ, Chen J, He BS, Pan YQ, Wang F, Deng QW, et al. The effect of BIM deletion polymorphism on intrinsic resistance and clinical outcome of cancer patient with kinase inhibitor therapy. *Sci Rep*. 2015;5:11348.
18. Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, et al. EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition. *Cancer Res*. 2013;73:2428-2434.
19. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase I study. *Lancet Oncol*. 2012;13:1011-1019.
20. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers. *Sci Transl Med*. 2012;4:120ra17.
21. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med*. 2010;363:1734-1739.