

Sensitivity and kinase activity of epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 19 and others to EGFR-tyrosine kinase inhibitors

古山, 和人

<https://hdl.handle.net/2324/1456008>

出版情報：九州大学，2014，博士（医学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）



氏 名：古山 和人

論文題名：Sensitivity and kinase activity of epidermal growth factor receptor (EGFR)
exon 19 and others to EGFR-tyrosine kinase inhibitors
(エクソン 19 その他の EGFR 遺伝子変異の EGFR 阻害薬に対する感受性
評価およびキナーゼ活性の評価)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

日本人では肺腺癌の約半数に EGFR 遺伝子変異が認められ、変異例では EGFR 阻害薬の効果が高い。ゲフィチニブの奏効率はエクソン 19 欠失変異で 81%、L858R 変異で 71%、エクソン 21 の L861Q 変異で約 60%、エクソン 18 の G719X 変異で約 56%と報告されている。T790M 二次耐性変異を含む、エクソン 20 領域の変異は EGFR 阻害薬に耐性である。このように、変異毎に EGFR 阻害薬への感受性が異なることが臨床的に明らかである。しかし、エクソン 19 での頻度の低いバリエーション変異やまれな EGFR 変異については、その臨床的データは乏しい。今回、YFP-EGFR-intracellular domain(ICD)融合蛋白を用いたアッセイにより、様々な EGFR 変異の EGFR 阻害薬に対する感受性を検討した。また、キナーゼ領域のリン酸化を蛍光免疫染色により比較検討した。

EGFR 阻害薬に対する感受性の評価

YFP-EGFR-ICD をヒト細胞株に導入すると YFP-EGFR 融合蛋白は細胞内に発現する。この培養細胞に EGFR 阻害薬を加えると融合蛋白の局在が針状に変化する。この局在変化は EGFR 阻害薬に対する感受性と相関し、局在変化の起きる EGFR 阻害薬の濃度で EGFR 下流のシグナルであるリン酸化 Akt の発現も消失する。この局在変化は蛍光顕微鏡で簡便に観察でき、また融合蛋白は EGFR の細胞外ドメインを欠くために、リガンドの影響を受けない。

野生型の YFP-EGFR をテンプレートとし、様々な EGFR 変異を持つプラスミドを作成した。細胞株 MCF-7 にこれらのプラスミドを導入し、EGFR 阻害薬（ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブ）を添加した。

野生型および del746-750/T790M 耐性変異では、高濃度のゲフィチニブを添加しても蛋白の局在にほとんど変化はなかった。エクソン 19 欠失変異、L858R 変異では低濃度のゲフィチニブで局在が変化した。エクソン 19 領域のいくつかのバリエーション変異では、全く同一の感受性ではなかった。また感受性変異とされているエクソン 19 欠失変異と L858R 変異では、欠失変異のほうがゲフィチニブの感受性は良好であった。

EGFR 変異の相対的なキナーゼ活性の評価

YFP-EGFR-ICD を MCF-7 に導入した後に、Alexa Fluor 594 を用いてリン酸化チロシンの蛍光免疫染色を行った。蛍光顕微鏡にて YFP(EGFR) の蛍光輝度と AF 594 (リン酸化 EGFR) の蛍光輝度を細胞内の同一部位で測定し、相対的なキナーゼ活性の評価を行った。エクソン 19 領域のバリエーション変異は、ほぼ同等に高いリン酸化を認めたが、747-752 欠失変異のみ、他のバリエーション変異よりも極めて低いリン酸化を示した。L858R、L861Q、G719X などの他の変異も野生型と比べて高いリン酸化が認められた。

結語 : EGFR エクソン 19 のバリエーション変異、L858R 変異、L861Q 変異、G719X 変異は各々、EGFR 阻害薬に対する感受性は異なっており、臨床効果に反映される可能性がある。747-752 欠失変異のみキナーゼリン酸化の亢進が認められなかったが、臨床的には他のエクソン 19 欠失変異と同等とされており、別の機序で活性化されている可能性がある。今後も EGFR 変異の特徴を更に検証し、臨床的意義を解明する必要があると考えられる。