

山本 寛 斉

Hiromasa Yamamoto



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 呼吸器・乳腺内分泌外科学

Department of Thoracic, Breast and Endocrinological Surgery, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

プロフィール

昭和51年生まれ

平成12年3月 岡山大学医学部医学科卒業
 平成12年4月 岡山大学医学部附属病院 第二外科 研修医
 平成12年9月 三豊総合病院 外科 研修医
 平成14年9月 岡山大学医学部附属病院 第二外科 医員
 平成17年3月 岡山大学大学院医学研究科修了
 平成17年4月 米国テキサス大学 サウスウェスタンメディカルセンター 博士研究員
 平成19年8月 岡山大学病院 呼吸器外科 医員
 平成20年7月 岡山赤十字病院 外科 医師
 平成21年7月 山口宇部医療センター 呼吸器外科 医師
 平成23年11月 岡山大学病院 呼吸器外科 助教

受賞対象論文

Yamamoto H, Higasa K, Sakaguchi M, Shien K, Soh J, Ichimura K, Furukawa M, Hashida S, Tsukuda K, Takigawa N, Matsuo K, Kiura K, Miyoshi S, Matsuda F, Toyooka S: Novel germline mutation in the transmembrane domain of *HER2* in familial lung adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* (2014) 106, djt338.

研究の背景と経緯

家族性（遺伝性）腫瘍は大腸癌や乳癌で多数報告され、癌関連遺伝子の生殖細胞変異が認められている^{1,2)}が、肺癌での家族性（遺伝性）腫瘍の報告は少ない。一方で孤発性肺癌では、腺癌・非喫煙者・アジア人・女性に上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor, *EGFR*）におけるチロシンキナーゼ領域の体細胞変異の頻度が高いことが知られている³⁾。肺腺癌では *HER2*, *KRAS*, *BRAF* などの遺伝子変異や *EML4-ALK* 融合遺伝子も報告されている⁴⁾。報告されている家族性肺癌家系では、家系内に *EGFR* チロシンキナーゼ領域内の T790M 変異などの生殖細胞変異が認められている上に、肺癌患者では二次的に *EGFR* の exon 19 における欠失や exon 21 の L858R 変異などの体細胞変異が引き起こされている⁵⁻⁸⁾。

我々は常染色体優性遺伝形式により発症し、既知の *EGFR*, *KRAS*, *EML4-ALK* 遺伝子異常を伴わない家族性肺癌家系を経験した。遺伝性疾患において原因遺伝子を同定するためにリンケージ解析のような従来の解析手法を用いる場合は複数の家系が必要となる。しかし、頻度が稀であると考えられる遺伝性肺癌では、複数の家系を収集することは容易ではない。近年、次世代シーケンサーの登場により網羅的解析が可能に

なっており、頻度が稀な遺伝性疾患においても網羅的解析により原因遺伝子が同定されたという報告が認められている⁹⁾。我々は当科で経験した家族性肺癌家系に肺癌発症の原因となる新規の生殖細胞変異が存在すると考え、岡山大学病院倫理委員会での承認後に次世代シーケンサーを利用した網羅的解析により新規遺伝子異常の同定を試みた。

研究成果の内容

発端者である50歳代（解析時）女性とその母はともに岡山大学病院で手術を施行した肺癌患者（ともに多発肺腺癌で、軽度または非喫煙者）であったが、詳細な聴取により家系図を作成すると、各世代に肺癌患者が存在しており、常染色体優性遺伝形式で遺伝していると考えられた。一方、家系内には肺癌以外の癌を発症した患者を2名（腎癌および胃癌）認めたが、2名とも肺癌も発症していた。発端者とその母の肺癌検体と正常肺組織、及び末梢血検体（母は研究開始時点で死亡していたため末梢血検体は発端者のみ）からDNAを抽出した。一方、この家系内の健常人（発端者の父、妹）から末梢血検体を採取し、同様にDNAを抽出した。これらのDNAを使用してエキソームシーケンスを施行しその結果得られた約60,000の変異

から、既知の遺伝子多型 (dbSNP, 1000 genomes, NHLBI exome, 10 personal genome および京都大学の99症例のエキソーム解析データ) は今回の肺癌の原因変異ではないと仮定して除外した。さらに発端者と母に共通の変異を抽出し、父と妹に存在する変異は除外することで疾患原因と考えられる遺伝子変異を29まで絞り込んだ。この29の変異について、アミノ酸置換がタンパク質の機能に及ぼす影響を SIFT, PolyPhen-2, LRT, MutationTaster, PhyloP¹⁰⁻¹⁴⁾ という各ソフトウェアにより検討した結果、*HER2* 遺伝子の膜貫通領域内に新規遺伝子変異 (G660D) を発見した (図)。この遺伝子変異は罹患者の正常肺組織または末梢血由来のDNAでも認められることから生殖細胞変異であると考えられた。サンガーシーケンスを施行することによりこの変異を再度確認した。*HER2* 異常は特に乳癌や胃癌における遺伝子増幅が知られている¹⁵⁾ が、この家系内でこれらの癌の発症は認められていない。エキ

ソームシーケンスの解析結果から、発端者と母の腫瘍では *HER2* の遺伝子増幅は認められなかったことを確認した。*HER2* G660D が既に報告されているかを cBioPortal for Cancer Genomics (<http://www.cbioportal.org/public-portal/>) で確認したが、どの臓器の癌においても報告されておらず、新規遺伝子変異と考えられた。*HER2* のキナーゼ領域における体細胞変異は孤発性肺腺癌において既に報告されている^{16,17)} ため、今回同定された G660D 変異が孤発性肺腺癌でも認められるかを検討した。対象は当科で2007年から2010年に手術を施行した原発性非小細胞肺癌315例 (肺腺癌253例) で、膜貫通領域をコードする *HER2* exon 17 をサンガーシーケンスにより解析した。G660D 変異は認められなかったが、腺癌1例に *HER2* 膜貫通領域の体細胞変異 (V659E) を認めた。その1例は同時多発肺腺癌で、非喫煙者であった。そこで G660D および V659E 変異 *HER2* 蛋白が機能性であるかを検討した。

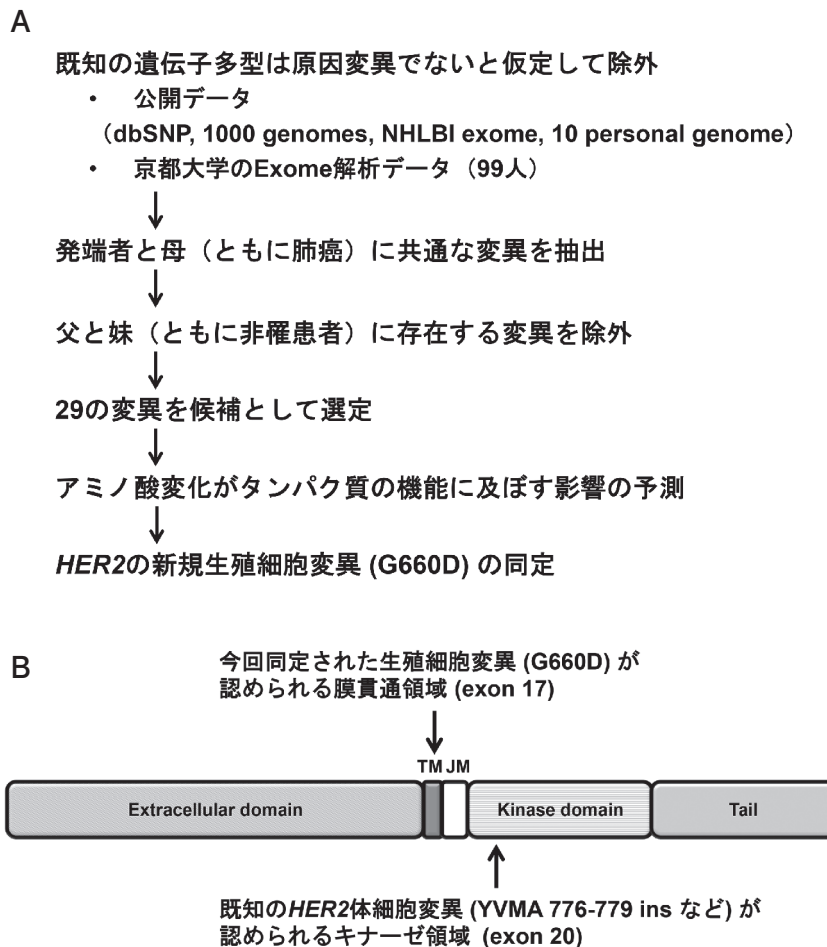


図 A : 家族性肺癌の原因遺伝子同定の過程, B : *HER2* 変異が存在する部位。TM, transmembrane domain ; JM, juxtamembrane domain.

HEK 293T 細胞に野生型および変異型 (G660D, V659E) HER2 を導入したところ, どちらの変異型 HER2 蛋白も野生型に比べて安定で, 下流のシグナルである Akt および p38 が活性化されていることが判明した. Akt は PI3 kinase を介して HER2 により活性化されることが知られている^{18,19)}. また, p38 は非喫煙者および軽度喫煙者から発生する肺腺癌の生存能力に寄与することが明らかとなっている^{20,21)}. また, 今回同定した *HER2* 遺伝子変異の部位 (V659, G660) は UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) によると脊椎動物において保存されている部位であった. 進化の過程でアミノ酸配列が保存されてきたことは V659 および G660 が機能的に重要であることを示している. これらの結果から, *HER2* 膜貫通領域の遺伝子変異 (G660D, V659E) は家族性・孤発性肺癌発症の原因となると考えられる.

研究成果の意義

他臓器の家族性腫瘍と比較して稀と思われる家族性肺癌の原因遺伝子を同定することができた. 複数の家系収集が困難と思われるこの疾患において, 1 家系だけの解析で原因遺伝子を同定できたのは次世代シーケンサーの登場と進歩により, より安価・より短時間で網羅的解析が可能になったためである²²⁾. また今回の研究では家族性肺癌のみならず孤発性肺癌においても解析を進めた結果, 孤発性肺癌では *HER2* G660D 変異を確認出来なかったものの, 隣接したコドンの変異 (V659E) を発見した. このことは家族性腫瘍の遺伝解析が孤発性腫瘍の研究進展にも寄与することを示している.

今回の研究で明らかになった G660D 変異を持つ 2 名の肺癌患者と, V659E 変異を持つ 1 名の肺癌患者はいずれも多発肺腺癌であり, 非喫煙者または軽度喫煙者であった. このことは機能解析において変異型 *HER2* が, 非喫煙者および軽度喫煙者における肺腺癌に関与する p38 を活性化していたこととも一致している. 近年, 非喫煙者における肺腺癌, しかも多発癌症例は増加してきている. *EGFR* 遺伝子変異を有する症例も多く認められるが, 多発肺腺癌の全ての原因ではなく, 他の発癌機構が存在すると考えられる. 今回の研究成果は, 多発肺癌の発癌機構の解明への契機となる可能性がある.

今後の展開や展望

今回の研究では, 同定された *HER2* G660D および V659E の機能解析に 293T 細胞を用いたが, 肺組織における発癌の観点から, ヒト正常気管支上皮細胞に導入して同様の解析を行う必要があると考えられ, 現在我々は解析を進めている. また, *in vivo* での解析を行うため, *HER2* G660D 及び V659E を組み込んだノックインマウスを作成中である. *HER2* G660D は生殖細胞変異であるため, マウスにおいても全身性に発現させることで肺癌を発症するのかを検証するとともに, 他臓器に癌を発症しないのか (特に乳癌や胃癌) を検証する. この家系での肺癌は *HER2* が driver mutation であると考えられるので, *HER2* を標的とした治療が有効であるかを検討する. すなわち, *HER2* を標的とするトラスツズマブやペルツズマブなどが G660D や V659E にも効果を示すのかを検討する. 今回発見した *HER2* 膜貫通領域の変異の頻度は少ないと思われるが, 変異の部位が二量体形成に関与することから, 従来のものとは異なるタンパク質が *HER2* との二量体形成のパートナーである可能性があり, そのパートナーから開始するシグナル伝達経路が新たな肺癌形成の原因となっている可能性が考えられる. 今回の *HER2* 変異のみでは孤発性肺癌 (特に多発肺腺癌) の発癌機構の解明に一般化することは困難かもしれないが, *HER2* 二量体形成のパートナーとして新たな蛋白が同定されれば, その蛋白そのものの異常によっても同様の発癌が起こりうるため, 多発肺癌の発症・経過の解明と新たな治療戦略の構築に繋がると考えられる.

文 献

- 1) Heinen CD : Genotype to phenotype : analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families. *Mutat Res* (2010) 693, 32-45.
- 2) Wang F, Fang Q, Ge Z, Yu N, Xu S, Fan X : Common BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families : a meta-analysis from systematic review. *Mol Biol Rep* (2012) 39, 2109-2118.
- 3) Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, et al. : Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* (2005) 97, 339-346.
- 4) Pao W, Girard N : New driver mutations in non-small-cell

- lung cancer. *Lancet Oncol* (2011) 12, 175-180.
- 5) Bell DW, Gore I, Okimoto RA, Godin-Heymann N, Sordella R, Mulloy R, Sharma SV, Brannigan BW, Mohapatra G, Settleman J, Haber DA : Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet* (2005) 37, 1315-1316.
 - 6) Ikeda K, Nomori H, Mori T, Sasaki J, Kobayashi T : Novel germline mutation : EGFR V843I in patient with multiple lung adenocarcinomas and family members with lung cancer. *Ann Thorac Surg* (2008) 85, 1430-1432.
 - 7) Ohtsuka K, Ohnishi H, Kurai D, Matsushima S, Morishita Y, Shinonaga M, Goto H, Watanabe T : Familial lung adenocarcinoma caused by the EGFR V843I germ-line mutation. *J Clin Oncol* (2011) 29, e191-192.
 - 8) van Noesel J, van der Ven WH, van Os TA, Kunst PW, Weegenaar J, Reinten RJ, Kancha RK, Duyster J, van Noesel CJ : Activating germline R776H mutation in the epidermal growth factor receptor associated with lung cancer with squamous differentiation. *J Clin Oncol* (2013) 31, e161-164.
 - 9) Yamaguchi T, Hosomichi K, Narita A, Shirota T, Tomoyasu Y, Maki K, Inoue I : Exome resequencing combined with linkage analysis identifies novel PTH1R variants in primary failure of tooth eruption in Japanese. *J Bone Miner Res* (2011) 26, 1655-1661.
 - 10) Kumar P, Henikoff S, Ng PC : Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* (2009) 4, 1073-1081.
 - 11) Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR : A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* (2010) 7, 248-249.
 - 12) Chun S, Fay JC : Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res* (2009) 19, 1553-1561.
 - 13) Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D : MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* (2010) 7, 575-576.
 - 14) Siepel A, Pollard KS, Haussler D : New methods for detecting lineage-specific selection ; in *Research in Computational Molecular Biology*. Apostolico A, Guerra C, Istrail S, Pevzner PA, Waterman M (eds), Springer Berlin Heidelberg, Berlin (2006) pp190-205.
 - 15) Martin V, Cappuzzo F, Mazzucchelli L, Frattini M : HER2 in solid tumors : more than 10 years under the microscope : where are we now? *Future Oncol* (2014) 10, 1469-1486.
 - 16) Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmudar K, Suzuki M, Lee H, Wistuba II, Fong KM, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Minna JD, et al. : Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* (2005) 65, 1642-1646.
 - 17) Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Teague J, Stevens C, O'Meara S, Smith R, Parker A, Barthorpe A, Blow M, et al. : Lung cancer : intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* (2004) 431, 525-526.
 - 18) Baselga J, Swain SM : Novel anticancer targets : revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* (2009) 9, 463-475.
 - 19) Engelman JA : Targeting PI3K signalling in cancer : opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* (2009) 9, 550-562.
 - 20) Mountzios G, Planchard D, Besse B, Validire P, Girard P, Devisme C, Dimopoulos MA, Soria JC, Fouret P : Mitogen-activated protein kinase activation in lung adenocarcinoma : a comparative study between ever smokers and never smokers. *Clin Cancer Res* (2008) 14, 4096-4102.
 - 21) Planchard D, Camara-Clayette V, Dorvault N, Soria JC, Fouret P : p38 Mitogen-activated protein kinase signaling, ERCC1 expression, and viability of lung cancer cells from never or light smoker patients. *Cancer* (2012) 118, 5015-5025.
 - 22) Cirulli ET, Goldstein DB : Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet* (2010) 11, 415-425.

平成26年9月受理
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1
電話 : 086-235-7265 FAX : 086-235-7269
E-mail : h.yamamoto@md.okayama-u.ac.jp