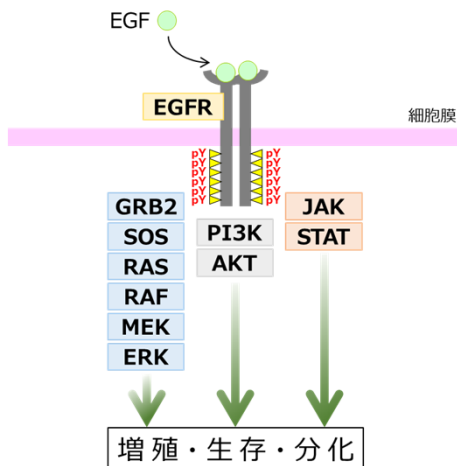


変異体強制発現細胞株を用いた試験例.1

● 変異 EGFR 強制発現細胞株

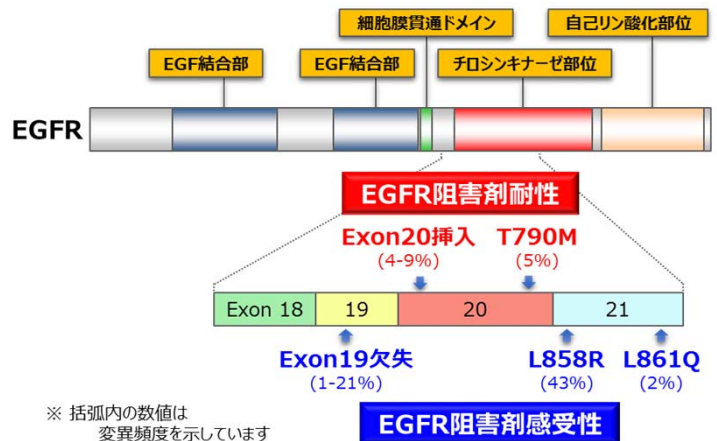
■ EGFRのシグナル伝達経路 ■

EGFRは、シグナル伝達において重要な役割を果たしている膜タンパク質です。上皮成長因子（EGF）などのリガンドの結合により二量体を形成して自己リン酸化します。このリン酸化部位にGRB2などのアダプター分子が結合してRAS/RAF/ERK経路、PI3K/AKT経路、JAK/STAT経路を活性化して増殖、生存、分化などの細胞応答を引き起こします。



■ EGFR変異とEGFR阻害剤の関係 ■

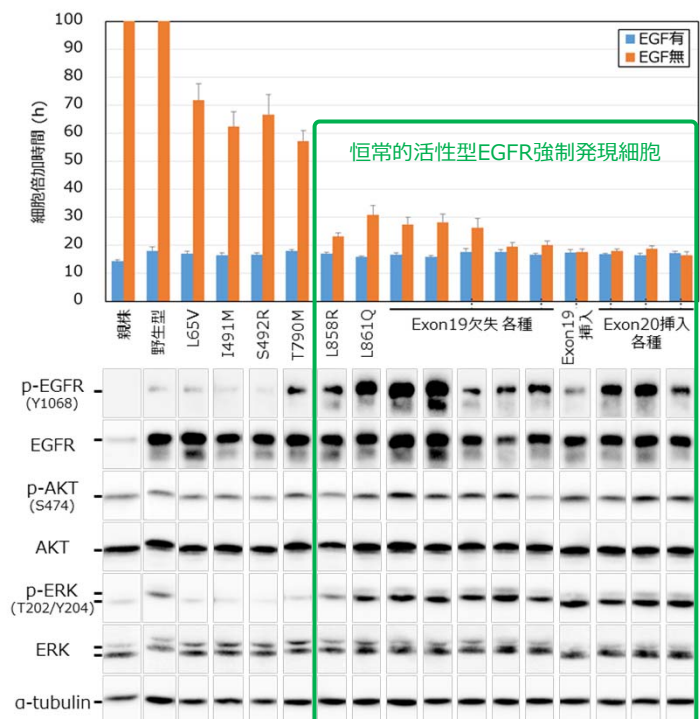
EGFRの変異は、がん化やがんの浸潤・転移に関与しています。非小細胞肺癌や大腸がんをはじめとする様々ながん細胞ではEGFRが過剰に発現しているため、その増殖が活発になります。EGFR阻害薬であるゲフィチニブ（商品名イレッサ）、エルロチニブ（商品名タルセバ）は肺癌の治療に広く使用されており、これらの効果とEGFR変異との関係は臨床で広く知られています。EGFRのT790MやExon20の挿入変異は阻害薬に対して耐性を、L858RやL861Q、Exon19の欠失変異では感受性を示すことが報告されています。



機能性の評価

■ 細胞増殖能と増殖シグナル ■

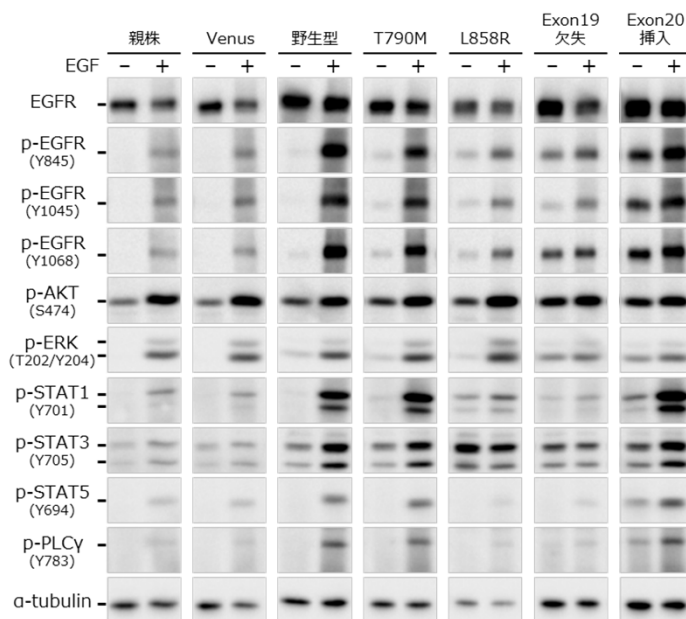
遺伝子導入の親株として用いているMCF10AがEGF依存的に増殖する細胞であることを利用して、EGF依存的な細胞増殖に関わる遺伝子の機能を細胞レベルで評価することができると考えられます。右側上の棒グラフは、EGFの受容体であるEGFRの様々な変異体の安定発現細胞株について、EGF存在下（■色）あるいは非存在下（■色）における倍加時間を示しています。EGF非存在下において親株と野生型EGFR強制発現細胞の増殖速度は大きく低下しましたが、恒常的活性型EGFRを強制発現させた細胞ではEGFの有無に関係なく増殖し、他の変異EGFR強制発現細胞の増殖はEGF依存性でした。右側下のパネルは、EGF非存在下において、EGFRとその下流で細胞増殖に関与するERKの活性化状態を、各リン酸化部位特異的抗体を用いたウェスタンブロットで調べたものです。恒常的活性型EGFR強制発現細胞ではEGF非存在下にも関わらずEGFRが自己リン酸化（Y1068）され、さらにERKのリン酸化（T202/Y204）も亢進されていることから、細胞増殖シグナルがONになっていることが分かりました。このように、変異体の機能アッセイを多数の発現細胞株で横断的に行うことによって、化合物感受性試験などをより多面的に評価することが可能です。



導入遺伝子が機能的に発現 🙌

■ 細胞内シグナル伝達系 ■

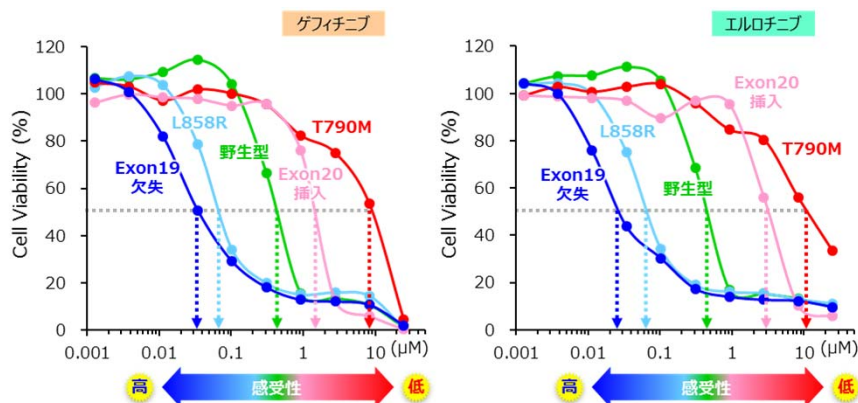
各変異EGFR強制発現細胞 (T790M、L858R、Exon19欠失、Exon20挿入) について、EGFを含まない培地で前培養した細胞を無刺激 (-) あるいはEGFで5分間刺激 (+) し、EGFRシグナル伝達系に関する分子の活性化状態をウェスタンブロットにより解析しました。親株および蛍光タンパク質Venus発現細胞に比べ、野生型EGFR強制発現細胞ではEGFRとその下流分子 (AKT、ERK、STAT1/3/5、PLC γ) がEGF刺激によって強くリン酸化されていました。これは、機能的なEGFRの発現量増加により細胞内に強いシグナルが発生した結果と考えられます。変異EGFR強制発現細胞ではそれぞれ異なったリン酸化のパターンを示し、Exon19欠失とExon20挿入ではEGF刺激の有無に関係なくEGFR、AKT、ERK、PLC γ のリン酸化が亢進しており、L858RではEGF刺激による下流分子のリン酸化の亢進に加え、EGF非存在下におけるSTAT3のリン酸化が他の細胞に比べて亢進していました。これらの変異はいずれも恒常的活性型であることが知られていますが、その変異型によりシグナル伝達系が異なった変化をする可能性を示しています。このように、当変異EGFR強制発現細胞はシグナル伝達系を比較検討することで、がん標的分子の探索などに利用できると考えられます。



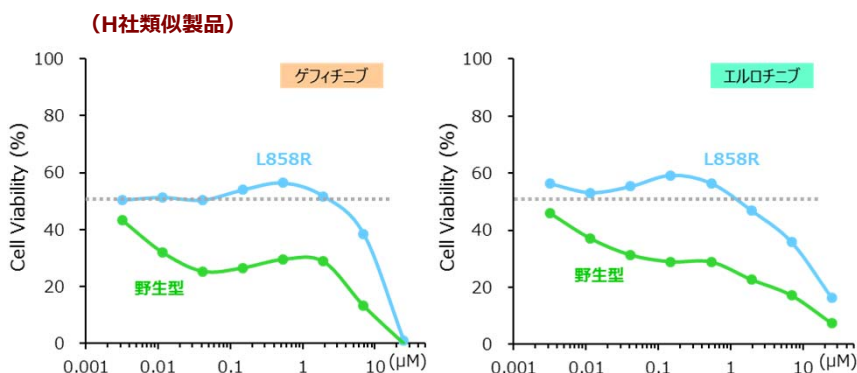
がん標的分子の探索に有用

EGFR阻害剤に対する感受性の評価

ゲフィチニブあるいはエルロチニブを処理した各変異EGFR強制発現細胞 (T790M、Exon20挿入、L858R、Exon19欠失) の増殖試験を行いました。T790MならびにExon20挿入は野生型EGFR強制発現細胞と比較してEGFR阻害剤に対する感受性が低下する一方、L858RならびにExon19欠失は感受性が上昇しました。これらの結果は臨床報告と一致しており、当変異EGFR強制発現細胞を用いて、生体内のがん組織の状態を反映した評価が可能であることを示唆しています。

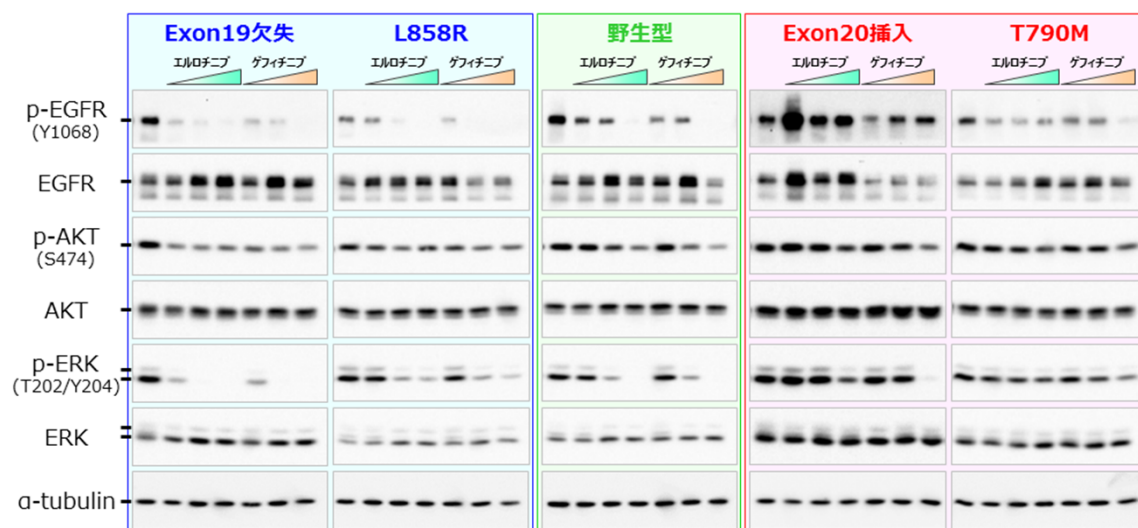


臨床報告と一致

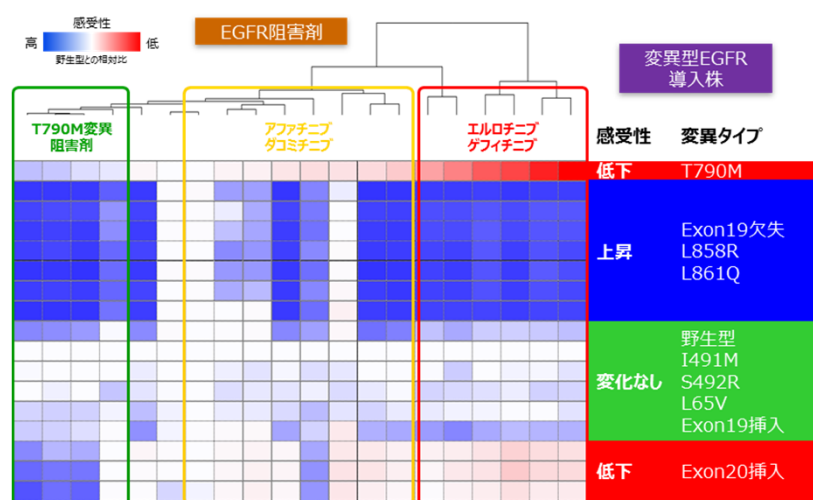


当製品と他社製品の比較を行うために、H社より変異EGFR (L858R) 導入細胞の類似製品を購入し、ゲフィチニブとエルロチニブに対する細胞増殖阻害試験を行ったところ、両阻害剤に対する感受性の増大は観察されませんでした。これらの結果は臨床報告とは一致せず、当変異遺伝子強制発現細胞の優位性が示されました。

EGFR阻害剤に対する感受性の評価

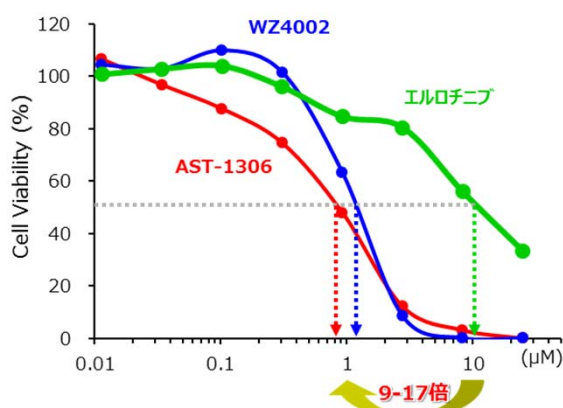


各変異EGFR強制発現細胞（T790M、Exon20挿入、L858R、Exon19欠失）のゲフィチニブあるいはエルロチニブ感受性について、ウエスタンブロットにより解析しました。EGFRの自己リン酸化レベルとERKのリン酸化レベルは、野生型EGFR強制発現細胞と比べてExon19欠失ならびにL858Rでは低用量のEGFR阻害剤で減少しましたが、Exon20挿入ならびにT790Mでは高濃度側にシフトしていました。この結果は、前述の増殖試験の結果と相関していました。



各変異EGFR強制発現細胞に対するEGFR阻害剤の影響を検証するため、細胞増殖を指標に試験を行いました。野生型EGFR強制発現細胞における IC_{50} 値との相対比をもとにクラス解析を行い、各変異EGFR強制発現細胞のEGFR阻害剤に対する感受性プロファイルを取得しました。その結果、EGFRのみをターゲットとする第一世代のEGFR阻害剤（ゲフィチニブ、エルロチニブ）のグループ、チロシナーゼのマルチターゲットの第二世代（アファチニブ、ダコミチニブ）のグループ、およびEGFRの耐性変異をターゲットとする第三世代のグループに分類することができました。

EGFR阻害剤耐性変異細胞の評価



EGFR阻害剤（ゲフィチニブ、エルロチニブ）に耐性を示す変異EGFR（T790M）強制発現細胞を用いてT790M阻害剤（WZ4002、AST-1306）の評価試験を行い、エルロチニブの IC_{50} 値と比較しました。その結果、WZ4002やAST-1306はエルロチニブと比較して有意に高い細胞増殖阻害活性を示しました。このことから、当変異EGFR強制発現細胞を用いた変異特異的阻害剤の評価や薬剤スクリーニングが可能であることが示唆されました。

変異特異的阻害剤の評価や
スクリーニングに最適 🙌