

## 総 説

EGFR 変異陽性非小細胞肺癌における分子標的治療薬の  
薬剤感受性と耐性化に関するこれまでの  
取り組みと今後の展望

副 島 研 造

山梨大学大学院総合研究部内科学講座呼吸器内科学教室

**要 旨**：肺癌は全世界において、癌による死因の第一位で、上皮増殖因子受容体に対するチロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）の開発およびEGFR 遺伝子変異の発見は、極めて難治性であった肺癌診療に大きなパラダイムシフトをもたらした。しかし、EGFR-TKIによる治療も一定期間後には必ず耐性化を生じ、またEGFR 遺伝子変異の中にはマイナー変異も少なからず存在し、それらに有効な治療薬の開発は困難であり、未だに肺癌は難治性癌の代表的疾患である。

EGFR-TKIはこれまで第1世代から第3世代まで、耐性化の歴史の中で開発されてきたが、耐性化の機序は複雑で多岐に渡っており、すべてに対応することは不可能である。またマイナーな変異については、症例数の稀少さから個々の変異に対して薬剤開発を行うことは極めてハードルが高い。

EGFR-TKIにおける獲得耐性機序の解明とその克服、およびEGFR 遺伝子変異の中でも稀少なため有効な薬剤開発が遅れている変異に対する基礎的検討や臨床研究についてのこれまでの我々の取り組み、さらに現状の課題と今後の展望について概説する。

**キーワード** 肺癌, 上皮増殖因子受容体, チロシンキナーゼ阻害剤, 獲得耐性, 稀なEGFR 遺伝子変異

## はじめに

2002年、世界初の固形がんに対する分子標的治療薬として、上皮増殖因子受容体(EGFR) 特異的なチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)である gefitinib が非小細胞肺癌(NSCLC) に対して、世界に先駆けて本邦において上市された。当初はEGFR が90%前後のNSCLCにおいて発現していることを根拠に開発が進められたが、実際に効果が認められる症例は2~3割であり、多くは無効で逆に重篤な間質性肺炎の発症など問題が多かった。しかし、2004年に複数の研究グループから gefitinib の有効性が

EGFR 遺伝子のTK ドメインにおける特定の変異と関連があることが報告された<sup>1,2)</sup>。さらにその後の様々なグループからの報告により、EGFR 遺伝子変異は、日本人を含むアジア人の肺腺癌で20~30%に認められるのに対して、欧米人では10%程度であること、また特定のEGFR 遺伝子変異を有する症例では奏効率が70~80%であるのに対し、遺伝子変異のない症例では無効であることが明らかとなった。一方、 gefitinib および同じ第1世代EGFR-TKIである erlotinib は、いずれも無増悪生存期間(PFS) が10ヶ月程度であり、最終的にはほぼ全例で耐性化を生じる。その後、耐性化克服のために第2世代、第3世代のEGFR-TKIが開発されているが、耐性化は不可避である。本総説では、EGFR-TKIにおける耐性機序の解明

とその克服, および EGFR 遺伝子変異の中でも頻度が稀で, 有効な薬剤開発が遅れている遺伝子変異に対する基礎的検討や薬剤開発について, これまでの我々の取り組みを中心に概説する。

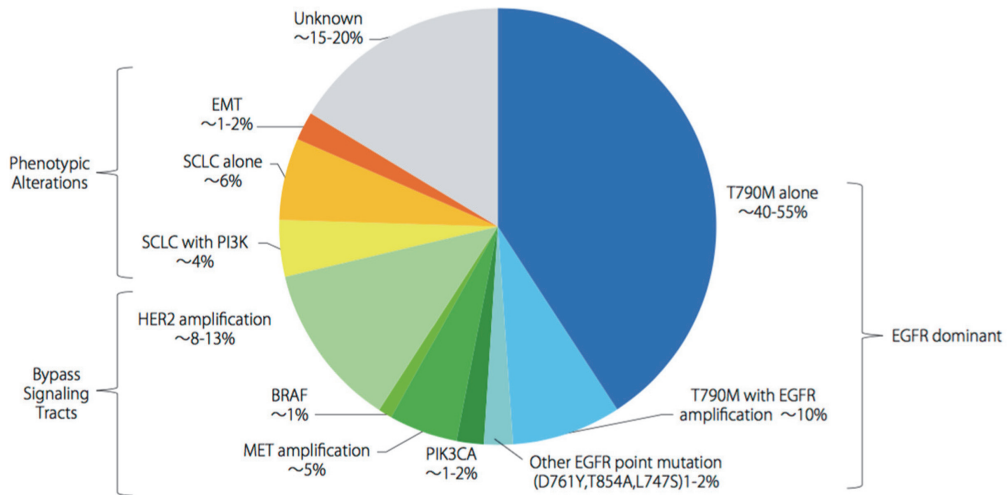
## 1. EGFR-TKI の耐性機構

EGFR 遺伝子変異のうち, exon19 の欠失や exon21 の L858R 点変異は, 変異の大半を占め, NSCLC における EGFR-TKIs の感受性と関連しており, これらの変異を持つ患者の約 80% が EGFR-TKIs が奏効する。しかし, 初めは EGFR-TKI が奏効する NSCLC の患者のほとんど全てが, 最終的には獲得耐性を持つようになる<sup>3,4)</sup>。EGFR-TKIs への獲得耐性のメカニズムを明らかにするための多くの検討がなされ, これまでの研究で, 2つの主要な EGFR-TKI 耐性メカニズムが特定されている。1つは EGFR 遺伝子自体の第二の変異, すなわち EGFR の exon20 の EGFR T790M 変異<sup>5,6)</sup>, もう1つは MET 遺伝子の増幅や MET のリガンドである肝細胞増殖因子 (HGF) の過剰発現

による (HGF)-MET 経路の活性化や BRAF 変異, HER2 増幅等に伴うバイパス経路の活性化で, 特に前者は EGFR-TKIs への獲得耐性の約 50% を占めている<sup>7-11)</sup>。これらのメカニズムに加えて, 上皮間葉遷移<sup>12)</sup>, EGFR の増幅, 小細胞肺癌への転換<sup>11)</sup> など, EGFR-TKI への抵抗性を獲得するさまざまなメカニズムが報告されているが, 獲得耐性のメカニズムの約 30% は未知であった (図 1)。

## 2. EGFR-TKI 耐性機構解明の取り組み

このような状況の中, 新たな耐性機構の解明のため, 我々も独自に様々な検討を行ってきた。1つの取り組みとして, 我々は, 元々ゲフィチニブ感受性の肺癌細胞株である PC9 および HCC827 を用いて, gefitinib に長期間曝露することで gefitinib 耐性細胞株モデルを確立した。gefitinib 耐性の PC9 (PC9 GR) 細胞において, FGFR1 および FGF2 の発現が, 初期の PC9 (PC9 na) 細胞に比べて増加していることを見出した。すなわち PC9 GR 細胞の増殖



日本肺癌学会 肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き第3.05版より

図 1. EGFR-TKIs による獲得耐性の機序と頻度

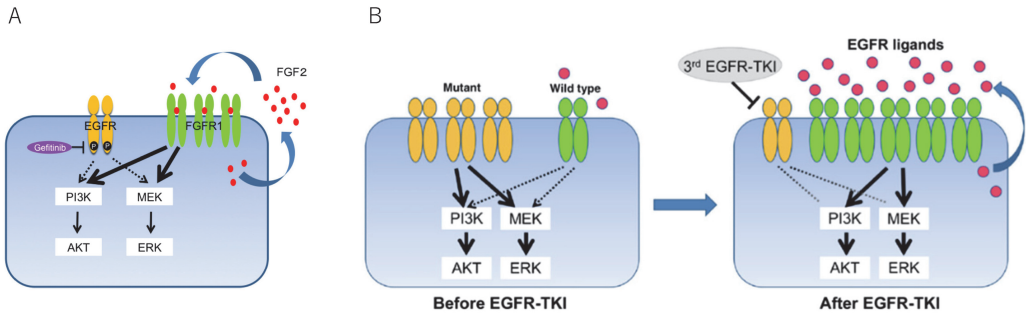


図 2. EGFR-TKI によるその他の獲得耐性の機序

A : Gefitinib による FGF2-FGFR1 の autocrine 機構を介した耐性機序

B : Osimertinib による野生型 EGFR 増幅とそのリガンドの過剰産生を介した耐性機序

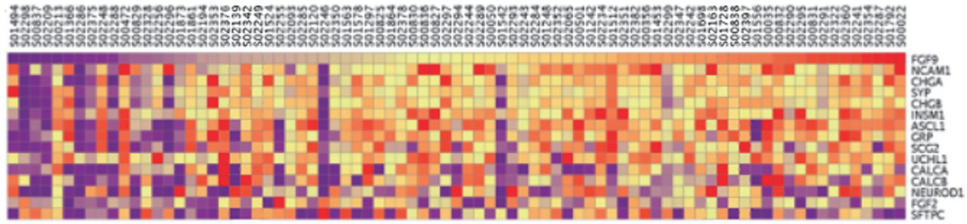
は FGF2-FGFR1 経路に依存していることが明らかとなった<sup>13)</sup>。siRNA または FGFR 阻害剤 (PD173074) による FGF2 または FGFR1 の阻害は、PC9 GR 細胞の gefitinib 感受性を回復させた。我々は自律的なループを介した FGF2-FGFR1 の活性化が EGFR-TKIs への耐性獲得の新しいメカニズムであり、このループを標的とすることで、非小細胞肺癌患者の一部における EGFR-TKIs への獲得耐性を克服できることを証明した (図 2A)。

また第 1 世代および第 2 世代の EGFR-TKI の耐性機構の約 50% を占める EGFR T790M 変異に対する阻害薬として開発された第 3 世代の EGFR-TKI である osimertinib の耐性機構については、より複雑で他の癌遺伝子の変異や融合遺伝子の形成など様々な耐性機構が報告されている。我々は osimertinib の耐性機構についても、その作用機序から推察されるユニークな耐性機構を明らかにした。第 3 世代の EGFR-TKIs は、一般的に野生型のタンパク質に対してはほとんど影響がない変異選択的な阻害剤である。我々は全エクソームシーケンシングにより、第 3 世代の EGFR-TKIs への獲得耐性に関するいくつかの新しいメカニズムを特定した<sup>14)</sup>。Src-AKT 経路が獲得耐性に寄与することを明らかにするとともに、EGFR の変異アレルではなく、野生型アレルの増幅が獲得耐性を

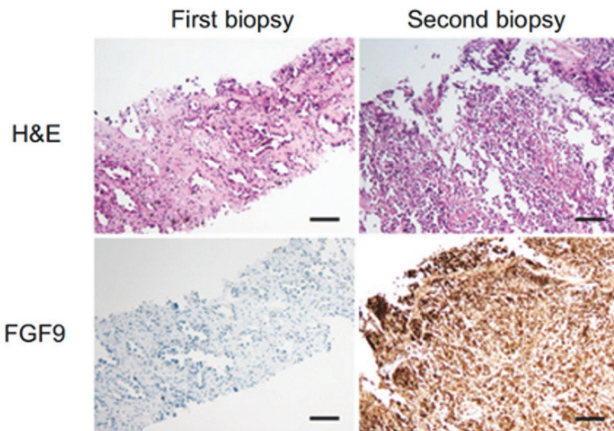
引き起こすことも特定した (図 2B)。これは、変異選択的 EGFR-TKIs による野生型 EGFR への抑制作用が少ないことを反映している。すなわち osimertinib は変異 EGFR を強力に抑制するのに対し、野生型 EGFR への作用はほとんどないため、癌細胞は野生型 EGFR を増幅するとともにそのリガンドの発現を増強することにより耐性化を獲得していることを見いだした。これらの知見は、癌治療における変異選択的阻害剤療法への応答で生じる獲得耐性の新しい概念の提供に繋がった。

さらに EGFR-TKI の極めてユニークな耐性機構として、腺癌から小細胞癌への形質転換が知られている<sup>11)</sup>。いくつかの研究が、形質転換における TP53 と RB1 の異常が前提となることを報告しているが、形質転換のための確定的な追加のイベント、すなわち第三のヒットはまだ特定されていない。我々は臨床検体および独自のマウスモデルや細胞株を用いた検討により、線維芽細胞増殖因子 9 (FGF9) の上昇が形質転換において本質的な役割を果たしていることを明らかにした<sup>15)</sup> (図 3)。形質転換を遂げた肺小細胞癌の患者から得られた腫瘍サンプルの統合オミクス分析では、FGF9 の著明な上昇が示された (図 3A, B)。さらにマウスの肺腺癌由来の細胞に対して FGF9 を導入することにより、細胞自律的な FGFR 経路の活性化を

A



B



C

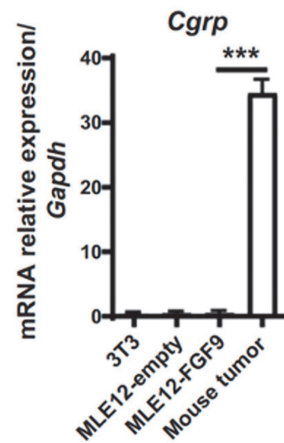


図3. EGFR-TKIによる腺癌から小細胞癌への形質転換における FGF9 の関与  
 A: 患者から得られた腫瘍サンプルの統合オミクス分析  
 B: 患者検体における FGF9 の免疫染色  
 C: マウス肺腺癌由来細胞に対する FGF9 導入に伴う移植片の小細胞癌化

介して, *in vivo*での SCLC 様の腫瘍へ変換することに成功し (図 3C), 汎 FGFR 阻害剤である AZD4547 により, *in vivo*で形質転換した SCLC 様の腫瘍増殖を阻害することを証明した。また, FGF9 が導入された人の肺腺癌細胞において, SCLC の病理学的特徴である神経内分泌分化が誘導されていることを確認した。これらの知見は, SCLC 形質転換に対する FGF9 介在の直接的な証拠を提供するとともに, 形質転換した SCLC に対して, FGF9-FGFRs 経路が有効な治療標的となる可能性を示した。その他にも cetuximab との併用による薬剤耐性の克服なども検討し報告してきた<sup>16, 17)</sup>。

### 3. 薬剤感受性のスクリーニング

これまでに EGFR 遺伝子変異に対して, 第 1 世代, 第 2 世代および第 3 世代の EGFR-TKI が開発されてきたが, 様々な遺伝子変異に対して果たしてどの薬剤が最も有効であるのか, それを比較した検討はなされていなかった。特に薬剤に対する感受性は, それまで exon19 欠失変異や L858R 変異などそれぞれの EGFR 遺伝子変異を有する肺癌細胞株を用いて, それらの IC<sub>50</sub> を求めることにより評価されていたが, 元々の細胞が異なるため純粋に変異タイプ毎の感受性を比較することは困難であっ



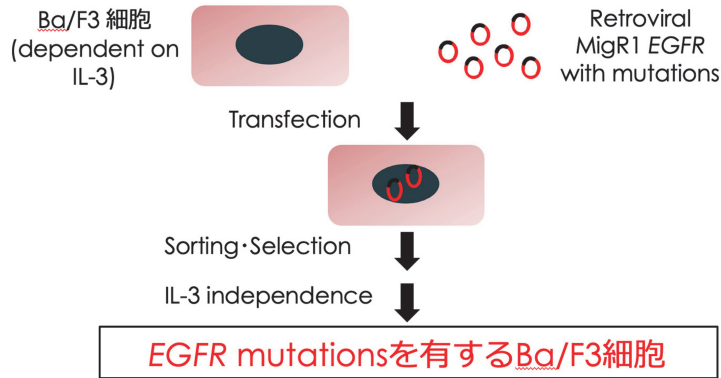


図4. EGFR 変異を有する Ba/F3 細胞ライブラリーの構築

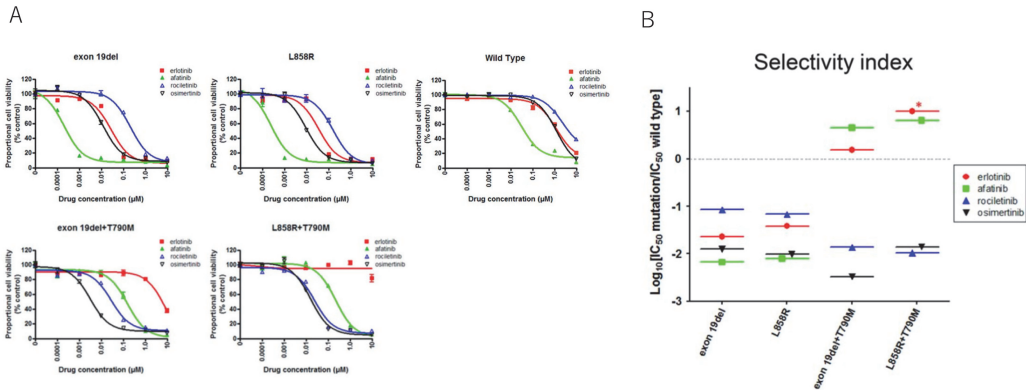


図5. 様々な EGFR 変異に対する種々の EGFR-TKIs の感受性

A : MTS アッセイ

B : Selectivity index

た。そこで我々は純粋に遺伝子タイプ毎の薬剤感受性を比較できるよう、共通の Ba/F3 にそれぞれの EGFR 遺伝子変異を導入し、様々な EGFR 遺伝子変異を有する Ba/F3 細胞株のライブラリーを作成し、それぞれの薬剤感受性をスクリーニングできるモデルを構築した<sup>18, 19)</sup> (図4)。Ba/F3 細胞は IL-3 依存性の細胞株で、IL-3 がなければ生存できないが、EGFR などの増殖因子を導入することで IL-3 非依存性に生存が可能となることを利用している。このモデルにより、第2世代の afatinib は極めて低い濃度で common mutation といわれる exon19 欠失変異および L858R 変異を有する Ba/F3 細

胞を死滅させることができること、また耐性化二次変異である T790M に対しても一定の効果を有するものの、野生型 (WT)-EGFR に対するよりもより高い濃度が必要であること、すなわち臨床においては重篤な副作用を生じる高用量でなければ T790M 変異に対して効果を発揮し得ないことを明らかにした。一方で第3世代 EGFR-TKI である osimertinib は、野生型 EGFR に影響を及ぼすことなく、exon19 欠失変異および L858R 変異だけでなく、T790M 変異に対して有効であることを明らかにした (図5A)<sup>18)</sup>。これらの結果は、変異型に対する IC<sub>50</sub>/野生型に対する IC<sub>50</sub> の対数であ

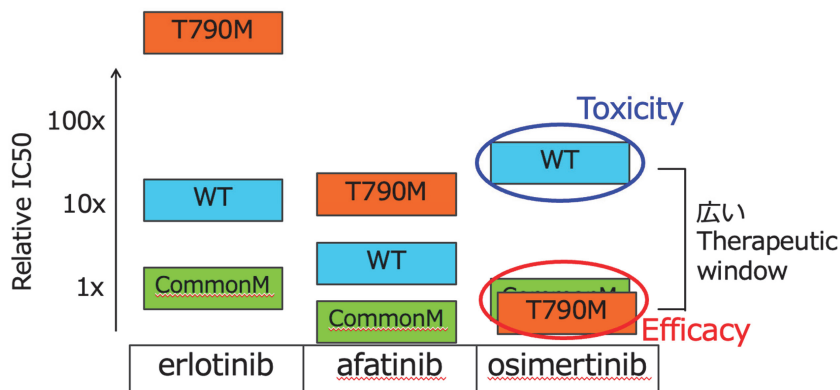


図6. 第1世代, 第2世代および第3世代 EGFR-TKI における therapeutic window

る selectivity index を示すことで明確に証明した (図5B)。第1世代の erlotinib, 第2世代の afatinib, および第3世代の osimertinib の安全性 (毒性) と効果を客観的に示すと図6のようになり, osimertinib が広い therapeutic window を有していることが明らかとなった。これらの基礎的検討や臨床試験の結果を踏まえ, 現在は osimertinib が EGFR 遺伝子変異陽性肺癌における第1選択薬となっている。

#### 4. 稀な EGFR 遺伝子変異に対する薬剤開発

近年, 次世代シーケンサー (NGS: Next Generation Sequencing) 等を用いた肺癌における体細胞変異の同定が活発に行われるようになり, 古典的 EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK 以外の稀な体細胞変異が急速な勢いで同定されている。これら相対的に稀な遺伝子変異 (minor mutation) はそれぞれ単独では患者数も少なく, 有効な治療法があるのか否かも明らかではなく, これら稀な遺伝子異常を有する肺癌患者は有効な治療を受けられていない現状がある。それゆえ, これら稀な遺伝子変異を有する肺癌患者の予後は現在も極めて不良であり, 「肺癌における難治性癌」となっている。このような医療の進歩の恩恵を十分に受けられていない稀な遺伝子変異を有する肺癌患者は総数で世界に

数百万人以上存在すると考えられるが, 個々の遺伝子変異のパターンが多様性に富むため製薬企業も研究者も手を出しにくい状況である。これら unmet medical needs である稀な遺伝子変異の非小細胞肺癌における頻度と分布を, LC-SCRUM Japan との共同研究により把握し, それら遺伝子変異情報をもとに稀な遺伝子変異を有する Ba/F3 細胞のライブラリーを樹立し, *in vitro* および *in vivo* の解析に落とし込み, 薬剤感受性解析データを取得するとともに, Super computer 京 (けい) を用いた *in silico* での感受性予測システムの確立を目指すこととした。

EGFR の major mutation を除く約 2000 例の LC-SCRUM Japan の遺伝子解析結果および臨床データを集積した。その結果, KRAS 遺伝子変異 (15.3%) に次いで, EGFR の minor mutation が 5.5% と多く認められること, さらにその約半数が EGFR exon 20 挿入遺伝子変異であることを明らかにした (図7)。またこれら EGFR の minor mutation を Ba/F3 細胞に導入し MTS アッセイを行うことにより, その多くがドライバー遺伝子変異であることも明らかにした。一方, MTS アッセイから計算した IC50 値を元にした薬剤感受性の検討により, EGFR exon 20 挿入遺伝子変異のほとんどが第1, 第2世代の EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) である erlotinib や afatinib に抵

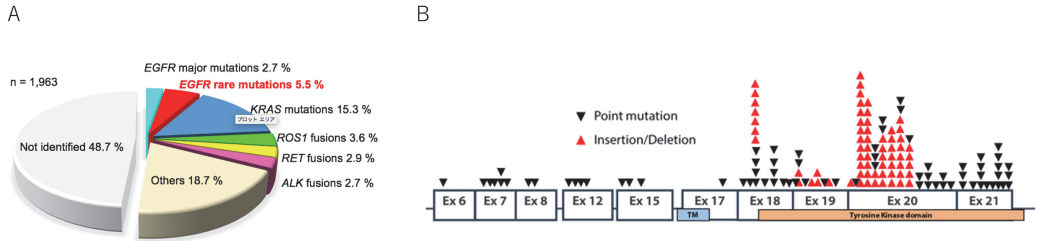


図7. 日本人における希な遺伝子変異  
A: 希な遺伝子変異の頻度  
B: EGFR における希な遺伝子変異

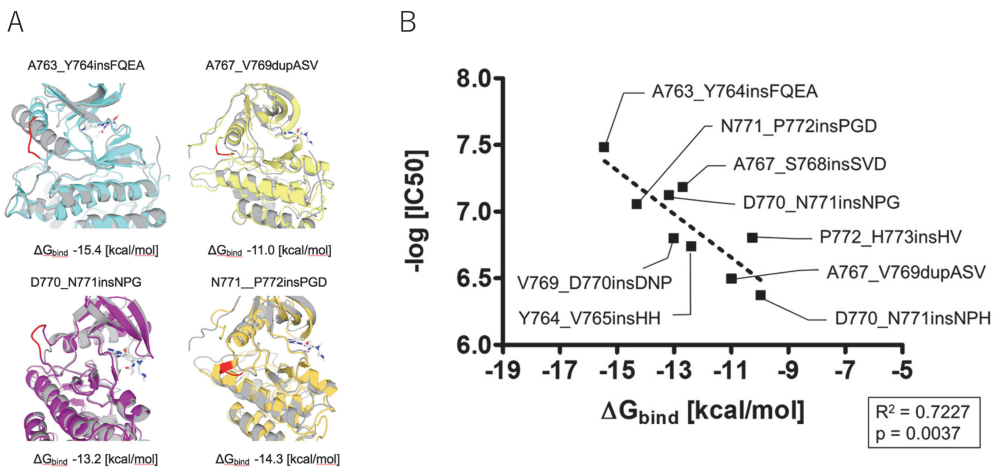


図8. Super computer 京を用いた薬剤感受性予測  
A: 構造解析から得られた結合自由エネルギー  
B: IC<sub>50</sub> 値と結合自由エネルギーとの相関

抗性であるのに対して、第3世代 EGFR-TKI である osimertinib には一定の感受性を有することを見だし、患者検体を用いた xenograft モデルでも osimertinib が有効であることを明らかにした<sup>20)</sup>。

さらに京都大学大学院医学研究科 奥野恭史教授らとの共同研究により、EGFR ex20 挿入遺伝子変異情報から遺伝子変異に伴うタンパクの構造変化を予測するとともに、変異を有するタンパクと薬剤の結合自由エネルギーを Super computer 京により *in silico* で計算し (図8A)、それらと *in vitro* で得られた IC<sub>50</sub> 値とを比較

し、高い相関関係にあることを明らかにした (図8B)。この成果により、今後ウェットな解析を実施しなくても、*in silico* の解析によりそれぞれの変異に基づいた有効な薬剤を選別できる可能性を示した<sup>20)</sup>。

## 5. EGFR exon 20 挿入遺伝子変異に対する臨床試験

前述の成果により、EGFR exon 20 挿入遺伝子変異を有する非小細胞肺癌患者に対して、osimertinib が有効である可能性が示されたこ

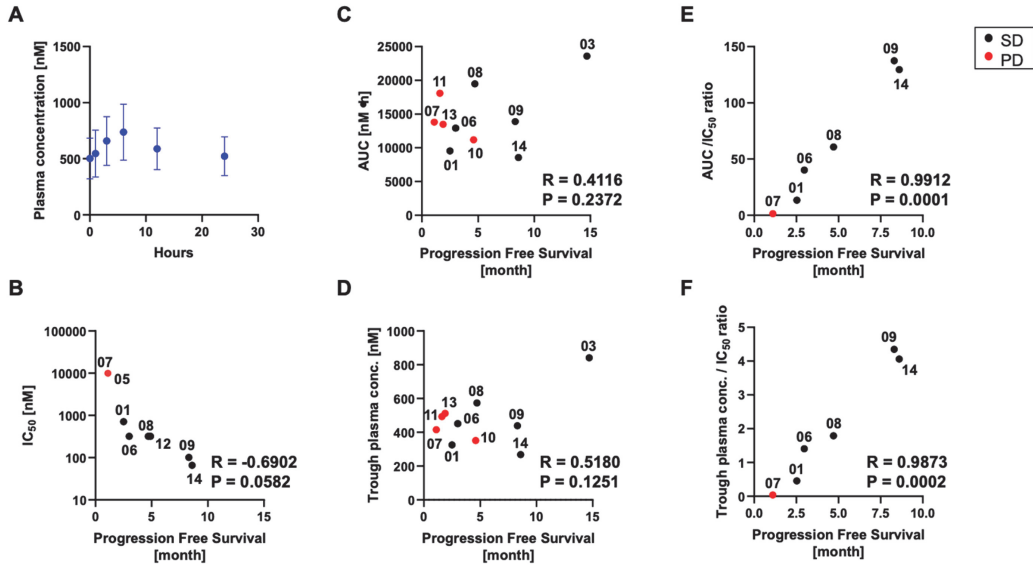


図9. Osimertinib の薬物動態, *in vitro* での IC<sub>50</sub> と実際の臨床効果との相関

とから, osimertinib (AZD9291) の適応拡大を目的とした多施設共同医師主導治験を計画し, EGFR exon 20 挿入遺伝子変異を有する非小細胞肺癌患者に対して, 「EGFR エクソン 20 挿入遺伝子変異を有する非小細胞肺癌患者における AZD9291 の有効性評価第 I/II 相試験 (AEX-20 試験)」を実施した。残念ながら, 臨床試験においては期待した奏効は得られず negative study であったが, 付随研究として実施した各症例における EGFR exon 20 挿入遺伝子変異型の同定, AZD9291 の薬物動態, および *in vitro* での薬剤感受性結果から予想された臨床効果と実際の臨床効果との相関に関する解析において, 血漿 AZD9291 濃度 (AUC) と *in vitro* での IC<sub>50</sub> の比が無増悪生存期間と極めて高い相関 (R=0.9912, p=0.0001) にあることを明らかにした (図9)。すなわち *in vitro* での薬剤感受性解析が臨床的有用性を有することを証明した<sup>21)</sup>。

## 6. 基礎研究, 橋渡し研究と臨床研究への取り組み

ここまでこれまでの我々の研究における取り組みを述べてきたが, その一連の流れは, まず培養細胞を用いた (基礎および) 橋渡し研究 (TR: translational research) により, EGFR exon 20 挿入遺伝子をもつ肺癌に対して osimertinib が有効な可能性があることを発見し, それを臨床研究である LC-SCRUM Japan から臨床検体を収集し, さらに臨床検体を用いた様々な解析, すなわち reverse TR により, Super computer を用いた *in silico* での薬剤感受性解明の可能性, および数 10 種類以上の EGFR exon 20 挿入遺伝子変異に対しても osimertinib が有効であることを確認し, その上でさらに臨床研究である医師主導治験を実施するという, 途切れないサイクルを形成している。この治験ではさらに先に述べたように付随研究として reverse TR を実施し, osimertinib の用量を増やすことで臨床的效果を高められる可能性を示しており, 残念ながら諸事情により実施できなかった



## トランスレーショナルリサーチ



図 10. 基礎研究、橋渡し研究と臨床研究の循環

ものの、用量を増やして治験を実施することにより適応拡大の薬事承認まで進められた可能性を示すことができた。

このように臨床医が取り組む研究の一つの方向性としては、図 10 に示すように、基礎研究、橋渡し研究と臨床研究の循環を回していくことが重要で、それにより sustainable な研究環境を構築することが可能となる。

### 7. 今後の EGFR 遺伝子変異に対する薬剤開発の課題と方向性

これから EGFR 遺伝子変異における薬剤開発の主な対象となるのは、これまで述べてきたように耐性化後および稀な遺伝子変異である。

耐性化の機序に関して、特に現在最も使用されている第 3 世代 EGFR-TKI である osimertinib については、EGFR 遺伝子における 3 次変異である C797S 変異に加えて、EGFR 増幅、MET 増幅、HER2 増幅/変異、KRAS 増幅/変異、BRAF V600E 変異、MEK 変異、PIK3CA 変異、PTEN 変異など、他のバイパス経路の活性化が報告されている<sup>14, 22, 23</sup>。我々も IGF2-IGF1R の autocrine 機序に基づいた耐性化機構等を報告している<sup>24</sup>。これらの変異のうち、C797S については、多くの第 4 世代の EGFR 阻害剤の開発が進められており、臨床試

験が行われているものもあるが、第 1, 第 2 世代 EGFR-TKI の際に認められた 2 次変異である T790M 変異が約 50% に認められたのに対して、その頻度は 10 ~ 20% と少なく、臨床的有用性とインパクトは高くない。またその他のバイパス経路の活性化を来す増幅や変異に対しては、それらの経路に対する薬剤との併用が有効である可能性はあるものの、実際の臨床においては薬事や安全上の観点から、治験や特定臨床研究での実施が必要となる。しかしごく一部の MET など比較的頻度の高い組み合わせを除くほとんどの場合において、症例数の稀少さから臨床試験を計画し実施するのは極めて困難である。こうした状況の中、最近の薬剤開発の取り組みとして、より普遍的な有効性を指向して、組織型や遺伝子異常の種類に強く依存しない HER3 や TROP2 を標的とした Antibody-drug conjugate (ADC) による臨床試験が進められ、一定の有効性が示されている<sup>25, 26</sup>。特に HER3 の ADC である patritumab deruxtecan (HER3-DXd) は osimertinib に耐性化をきたした症例を対象とした第 I 相試験において、耐性化機序に関係なく奏効率が 39% であったと報告されている<sup>25</sup>。ただしこれら ADC による治療については、殺細胞性抗癌剤と同様に有効性を予測するバイオマーカーが欠如している点が課題である。

一方、稀な遺伝子変異のうち、EGFR exon 20 挿入遺伝子変異に関しては、新規の分子標的薬が数多く開発されてきている。EGFR exon 20 挿入遺伝子変異特異的に開発された mobocertinib や EGFR と MET に対する bispecific 抗体として開発された amivantamab は、それぞれプラチナ併用化学療法が無効となった EGFR exon 20 挿入遺伝子変異陽性 NSCLC 症例に対して、それぞれ単剤で 28%、40% の奏効が得られたことから、本邦では未承認であるが、米国ではすでに FDA の承認を得て使用可能となっている<sup>27, 28)</sup>。ただし、これらの薬剤はグレード 3 以上の副作用の頻度は高い。さらに現在はより効果が高く副作用の少ない薬剤の開発も進んでおり、例えば furmonertinib は初回治療の症例での奏効率が 78%、グレード 3 以上の副作用は 13% と報告されている<sup>29)</sup>。

また、前述のように我々は *in silico* での解析により遺伝子変異に応じた薬剤感受性を予測できる可能性を示したが、他の研究グループからは EGFR 遺伝子変異の構造-機能に基づいた 4 グループへの分類を行うことで、それぞれの分類に対する様々な分子標的薬の感受性を予測できるとする網羅的な報告もなされている<sup>30)</sup>。また最近では Google の DeepMind 社が開発した AlphaFold により、AI ベースで高精度なタンパク質立体構造予測が可能となり、google アカウントがあれば誰でもアクセス可能で、薬剤感受性の予測への応用も可能となっている<sup>31)</sup>。今後はこうした情報を元にした薬剤の臨床開発も進むものと予想され、新たな肺癌治療における breakthrough に期待したい。

## 引用文献

- 1) Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, *et al.*: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304(5676):1497-1500, 2004.
- 2) 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*, 350(21): 2129-2139, 2004.
- 3) Inoue A, Suzuki T, Fukuhara T, Maemondo M, Kimura Y, Morikawa N, *et al.*: Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naive patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. *J Clin Oncol*, 24(21): 3340-3346, 2006.
- 4) Riely GJ, Politi KA, Miller VA, Pao W: Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 12(24): 7232-7241, 2006.
- 5) Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, *et al.*: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 352(8): 786-792, 2005.
- 6) Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, *et al.*: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2(3): e73, 2005.
- 7) 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*, 316(5827): 1039-1043, 2007.
- 8) 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*, 104(52): 20932-20937, 2007.
- 9) 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*, 68(22): 9479-9487, 2008.
- 10) Nakachi I, Naoki K, Soejima K, Kawada I, Watanabe H, Yasuda H, *et al.*: The combination of multiple receptor tyrosine kinase inhibitor and mammalian target of rapamycin inhibitor overcomes erlotinib resistance in lung cancer cell lines through c-Met inhibition. *Mol Cancer Res*, 8(8): 1142-1151, 2010.
- 11) Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, *et al.*: Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*, 3(75): 75ra26, 2011.
- 12) Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Epstein D, Haley JD: Kinase switching in mesenchymal-like non-small cell lung cancer lines contributes to EGFR inhibitor resistance through pathway re-

- dundancy. *Clin Exp Metastasis*, 25(8): 843–854, 2008.
- 13) Terai H, Soejima K, Yasuda H, Nakayama S, Hamamoto J, Arai D, *et al.*: Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC. *Mol Cancer Res*, 11(7): 759–767, 2013.
  - 14) Nukaga S, Yasuda H, Tsuchihara K, Hamamoto J, Masuzawa K, Kawada I, *et al.*: Amplification of EGFR Wild-Type Alleles in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Confers Acquired Resistance to Mutation-Selective EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res*, 77(8): 2078–2089, 2017.
  - 15) Ishioka K, Yasuda H, Hamamoto J, Terai H, Emoto K, Kim TJ, *et al.*: Upregulation of FGF9 in Lung Adenocarcinoma Transdifferentiation to Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*, 81(14): 3916–3929, 2021.
  - 16) Hasegawa H, Yasuda H, Hamamoto J, Masuzawa K, Tani T, Nukaga S, *et al.*: Efficacy of afatinib or osimertinib plus cetuximab combination therapy for non-small-cell lung cancer with EGFR exon 20 insertion mutations. *Lung Cancer*, 127: 146–152, 2019.
  - 17) Oashi A, Yasuda H, Kobayashi K, Tani T, Hamamoto J, Masuzawa K, *et al.*: Monomer Preference of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Influences the Synergistic Efficacy of Combination Therapy with Cetuximab. *Mol Cancer Ther*, 18(9): 1593–1601, 2019.
  - 18) Hirano T, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Oashi A, Ishioka K, *et al.*: In vitro modeling to determine mutation specificity of EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 6(36): 38789–38803, 2015.
  - 19) Masuzawa K, Yasuda H, Hamamoto J, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, *et al.*: Characterization of the efficacies of osimertinib and nazartinib against cells expressing clinically relevant epidermal growth factor receptor mutations. *Oncotarget*, 8(62): 105479–105491, 2017.
  - 20) Ikemura S, Yasuda H, Matsumoto S, Kamada M, Hamamoto J, Masuzawa K, *et al.*: Molecular dynamics simulation-guided drug sensitivity prediction for lung cancer with rare EGFR mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(20): 10025–10030, 2019.
  - 21) Yasuda H, Ichihara E, Sakakibara-Konishi J, Zenke Y, Takeuchi S, Morise M, *et al.*: A phase I/II study of osimertinib in EGFR exon 20 insertion mutation-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 162: 140–146, 2021.
  - 22) Minari R, Bordi P, Tiseo M: Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer: review on emerged mechanisms of resistance. *Transl Lung Cancer Res*, 5(6): 695–708, 2016.
  - 23) Schoenfeld AJ, Chan JM, Kubota D, Sato H, Rizvi H, Daneshbod Y, *et al.*: Tumor Analyses Reveal Squamous Transformation and Off-Target Alterations As Early Resistance Mechanisms to First-line Osimertinib in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 26(11): 2654–2663, 2020.
  - 24) Manabe T, Yasuda H, Terai H, Kagiwada H, Hamamoto J, Ebisudani T, *et al.*: IGF2 Autocrine-Mediated IGF1R Activation Is a Clinically Relevant Mechanism of Osimertinib Resistance in Lung Cancer. *Mol Cancer Res*, 18(4): 549–559, 2020.
  - 25) Janne PA, Baik C, Su WC, Johnson ML, Hayashi H, Nishio M, *et al.*: Efficacy and Safety of Patritumab Deruxtecan (HER3-DXd) in EGFR Inhibitor-Resistant, EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov*, 12(1): 74–89, 2022.
  - 26) Shimizu T, Sands J, Yoh K, Spira A, Garon EB, Kitazono S, *et al.*: First-in-Human, Phase I Dose-Escalation and Dose-Expansion Study of Trophoblast Cell-Surface Antigen 2-Directed Antibody-Drug Conjugate Datopotamab Deruxtecan in Non-Small-Cell Lung Cancer: TROPION-PanTumor01. *J Clin Oncol*, 41(29): 4678–4687, 2023.
  - 27) Zhou C, Ramalingam SS, Kim TM, Kim SW, Yang JC, Riely GJ, *et al.*: Treatment Outcomes and Safety of Mobocertinib in Platinum-Pre-treated Patients With EGFR Exon 20 Insertion-Positive Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: A Phase 1/2 Open-label Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 7(12): e214761, 2021.
  - 28) Park K, Haura EB, Leigh NB, Mitchell P, Shu CA, Girard N, *et al.*: Amivantamab in EGFR Exon 20 Insertion-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer Progressing on Platinum Chemotherapy: Initial Results From the CHRYSALIS Phase I Study. *J Clin Oncol*, 39(30): 3391–3402, 2021.
  - 29) Hou J, Li H, Ma S, He Z, Yang S, Hao L, *et al.*: EGFR exon 20 insertion mutations in advanced non-small-cell lung cancer: current status and perspectives. *Biomark Res*, 10(1): 21, 2022.
  - 30) Robichaux JP, Le X, Vijayan RSK, Hicks JK, Heeke S, Elamin YY, *et al.*: Structure-based classification predicts drug response in EGFR-mutant NSCLC. *Nature*, 597(7878): 732–737, 2021.
  - 31) Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, *et al.*: Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873): 583–589, 2021.

**Efforts and Future Prospects in Drug Susceptibility and Resistance Development of Molecular Targeted Therapies in EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer**

**Kenzo SOEJIMA<sup>1)</sup>**

*1) Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medicine, University of Yamanashi*

**Abstract:** Lung cancer ranks first globally as a cause of death by cancer. The development of tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) targeting the epidermal growth factor receptor, as well as the discovery of EGFR gene mutations, have brought about a significant paradigm shift in the treatment of what was once extremely refractory lung cancer. However, acquired resistance inevitably arises after a certain period of treatment with EGFR-TKIs. Moreover, among EGFR gene mutations, there are several minor mutations. Developing effective treatments is challenging, making lung cancer still a representative of refractory cancers.

EGFR-TKIs, from the first to the third generation, have been developed within the context of this history of acquired resistance. The mechanisms of resistance are intricate and diverse, and addressing all of them is impossible. Additionally, due to the rarity of cases with minor mutations, drug development for each specific mutation has an exceptionally high hurdle.

This article will outline our efforts to date in elucidating the mechanisms of resistance in EGFR-TKIs and overcoming them. It will also cover the basic research and clinical studies regarding mutations in the EGFR gene that have lagged in drug development due to their rarity. Further, we will discuss the current challenges and future prospects.

**Key words:** lung cancer, epidermal growth factor receptor (EGFR), tyrosine kinase inhibitor (TKI), acquired resistance, rare EGFR mutation