

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21526

研究課題名(和文) 血漿遊離DNAを用いたEGFR-TKI耐性機序の解明と臨床的有用性検討

研究課題名(英文) Acquired resistance mechanism to EGFR-TKI using circulating cell-free tumor DNA

研究代表者

金田 裕靖 (KANEDA, Hiroyasu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50351599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者の血漿34検体をdigital PCR法を用いてT790M耐性遺伝子変異、活性化遺伝子変異(exon19とexon21)を測定した。13例はEGFR-TKIによる治療前後のペア検体であった。T790M耐性変異は事前検討した変異アレル頻度0.015%以上を陽性と定義した。すべての検体において活性化遺伝子変異が確認された。ペア検体13例中、治療開始前の検体で陽性は1例のみで、EGFR-TKI耐性後の検体では10例で陽性が確認され(76%)、非侵襲的な高感度アッセイによる高い検出率が得られた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated liquid biopsy assays by digital PCR for detection of T790M mutations of EGFR in EGFR mutation-positive NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. Plasma samples from 34 patients including 13 paired samples who developed progression during EGFR-TKI treatment were collected. Samples were deemed to be ddPCR-positive if more than 0.015% of mutant allele frequency in cell-free DNA. All plasma samples were genotyped successfully. For 13 paired samples, TKI-sensitizing and T790M mutations were detected in plasma of 13 (100%) and 10 (76%) patients, respectively. T790M mutation was detected in one patient with pretreatment plasma sample. Noninvasive genotyping ddPCR assay revealed that T790M was found in the majority of NSCLC patients who developed progression on EGFR-TKI.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：バイオマーカー 分子標的治療 血漿DNA

1. 研究開始当初の背景

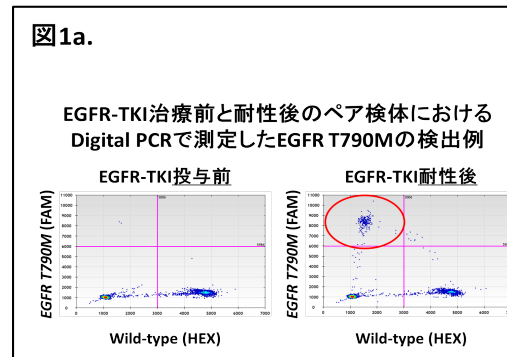
肺がんにおいては、EGFR (上皮成長因子受容体) 遺伝子変異をはじめとして、ALK 融合遺伝子などの driver mutation が数多く発見されている。EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子に対しては、それぞれ有効な分子標的薬がすでに承認されている。現在、進行非小細胞肺がんの治療選択においては有効な薬剤選択のために EGFR 阻害剤に対する EGFR 遺伝子変異や ALK 阻害剤に対する EML4-ALK 融合遺伝子の治療前診断を行うことが必須となっており、実地臨床において個別化医療が行われている。

ゲフィチニブやエルロチニブといった、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) は、EGFR 遺伝子変異を有する肺がん症例に奏効することが明らかとなっているが、奏効してもほとんどの症例がやがて耐性化し再増悪することが分かっている。また、EGFR 遺伝子変異陽性症例における自然耐性も報告されている。これまでの研究から、EGFR-TKI に対する耐性化要因として EGFR-TKI 耐性化変異 (exon 20 T790M) や MET amplification、HGF 発現などが報告されているが、耐性機序の不明なものが未だに 30 ~ 50% 存在する。

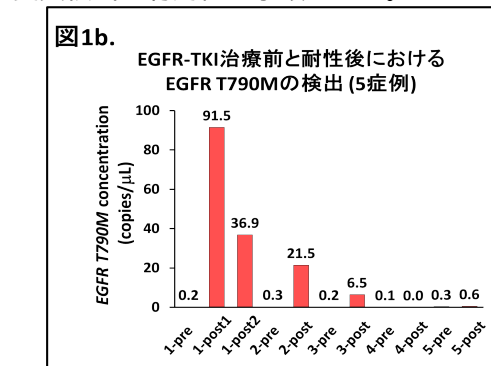
EGFR 遺伝子変異陽性肺がんにおける EGFR-TKI の自然耐性や耐性獲得後の治療戦略は、臨床における非常に重要な課題である。EGFR-TKI 耐性克服においては、その耐性機序の解明が必須でありそのためには EGFR-TKI 耐性時の腫瘍検体の遺伝子解析が重要な役割を果たすと考えられる。近年、EGFR-TKI 治療を受けた症例において EGFR-TKI 耐性直後の再増悪した腫瘍検体を採取する re-biopsy のニーズが高まっており、耐性克服に対し極めて重要な手技であるが、患者への侵襲性が高い。最近の技術進歩により、がん組織由来の微量血中循環がん遺伝子 (cell-free DNA; cfDNA) を非常に高い感度で検出することが可能になり、これにより患者のがん分子の遺伝子変異状況など、これまでの細胞組織検査に代わり非侵襲的にその情報を得ることができるようになった。この技術は、手術による組織摘出や生体検査を必要とせず、血液中の遺伝子検査により最適ながん治療薬の選択や薬剤耐性の原因遺伝子同定による治療中止などを実現可能にする。さらに、血液を用いた遺伝子検査は繰り返し検査をすることが容易に可能であり、遺伝子変異出現の継続的なモニタリングが出来る。

われわれは、これまでに EGFR 遺伝子変異陽性肺がんに対して EGFR-TKI が奏効し、その後耐性となった時点で re-biopsy を行い腫瘍組織検体を採取出来た症例に対して、EGFR-TKI に対する薬剤耐性となる機序の解明や EGFR-TKI の有効性予測を可能にするゲノムプロファイルの同定、さらに

EGFR-TKI の新たな治療戦略を開発するための新規治療標的の同定に取り組んできた。その中で、digital PCR を用いた高感度の遺伝子変異検出を行った。(図 1a)



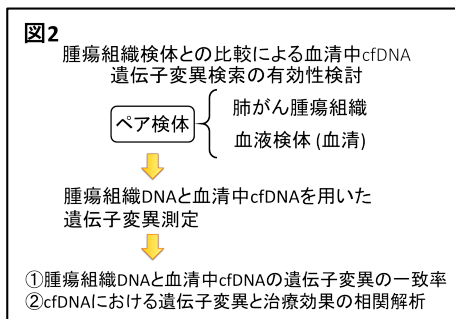
EGFR-TKI の耐性変異である EGFR T790M 遺伝子が、EGFR-TKI に耐性となった腫瘍組織においてのみ検出された。また、複数症例においての検討においても同様の結果が認められた (図 1b)。EGFR-TKI の耐性変異である EGFR T790M 遺伝子は、EGFR-TKI 投与前の検体では検出されず、EGFR-TKI に耐性となった腫瘍組織においてのみ検出された。これらの症例においては、保険診療で行える測定法では EGFR T790M は検出されず臨床的には耐性の原因が不明であったため、digital PCR を用いた高感度の遺伝子変異検出の有用性が示唆された。



また、腫瘍組織検体と血清・血漿中の cfDNA での遺伝子変異の一致率の検討は十分に行われていない。さらに、digital PCR による高感度検出系は、主に EGFR T790M のみを対象としており、EGFR-TKI 耐性に関する多くの遺伝子異常を digital PCR で検索可能にすることが望ましい。

そこで我々は、肺がんの同一症例での腫瘍組織と血清のペア検体を用いた血清中 cfDNA での遺伝子変異検出の有用性についての検討を、一定の感度が担保される高感度測定法の digital PCR を用いて行う本研究を計画した。本研究では、同一症例での腫瘍組織と血清のペア検体を用いることにより、腫瘍組織 DNA と血清中 cfDNA での遺伝子変異の一致率、さらに血清中 cfDNA での EGFR-TKI 耐性に関する遺伝子変異検索

の臨床的有用性について検討し、肺がんの実地臨床に貢献できることを目的とする(図2)。



2. 研究の目的

がんの薬物療法において、分子生物学的特性に基づく新たな治療法として分子標的治療が開発される中、ゲノム解析技術の発展により分子標的薬の標的となる新たな driver mutation の発見や遺伝子変異による薬剤耐性などが明らかになり、遺伝子異常に基づく個別化治療が進んでいる。その中でも肺がんは、治療選択において EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK などの遺伝子異常を検索する事が必須となっている。また、EGFR 阻害剤に対する耐性機序においても多くの遺伝子異常が関与していることが明らかになっている。しかしながら、診断時や耐性時の生検検体が微量であり、かつ侵襲性を有することから、非侵襲的に採取可能な末梢血からの血漿・血清を用いた腫瘍由来の DNA の体細胞変異を検出する方法が模索されている。本研究は、digital PCR 法を用い、非侵襲的な血清中の腫瘍由来 DNA からの体細胞遺伝子変異検出の実行可能性と血清検体のサロゲートマーカーとしての臨床的有用性を検討し、肺がんの実地臨床に貢献できることを目的とする。

3. 研究の方法

肺がん患者の血清、血漿を用いて、肺がんにおける体細胞変異等の Driver Mutation および EGFR-TKI 耐性に関与する遺伝子異常等の測定を行い、肺がんにおける血清検体での EGFR-TKI 耐性に関与する遺伝子変異検出の臨床的有用性について検討する。

(1) Digital PCR を用いた体細胞遺伝子変異測定系の構築

EGFR 遺伝子変異陽性肺がんにおける EGFR-TKI 耐性の原因として特徴的な EGFR (exon19 と exon21), EGFR exon20 T790M, KRAS, HER2, BRAF, BIM, ALK の遺伝子変異と FGFR1, CCND1, HER2, CDK4/6 の遺伝子増幅の計 11 遺伝子の異常について、プライマー設計と PCR 条件を検討し、高感度アッセイによる測定系を構築する。検出の有無は、各種の遺伝子変異を有する細胞株を用いて確認する。

(2) EGFR-TKI 耐性に関与する遺伝子変異測定系の感度検討と血清中 cfDNA での測定条件の最適化

測定系の感度を、各種の遺伝子変異を有する細胞株を用いて算出する。感度 0.01% を達成するため、1) 血清検体からの遊離核酸の抽出条件、2) 変異部位の PCR による増幅条件、3) 感度 0.01% を達成するための検出アルゴリズムと必要 coverage 数を検討し、検出感度の向上を図り、測定条件の最適化を行う。

(3) 臨床検体を用いた測定実施のための準備

非小細胞肺がんの腫瘍組織検体および血清検体を用いた測定を行うために必要な検体の収集は、近畿大学医学部腫瘍内科で行っている。本試験に必要な試験実施計画書は、近畿大学医学部倫理委員会ですでに承認されている。現在、当科において 100 症例を目標に本試験の同意説明文書により腫瘍組織検体および血清検体のペア検体を集積開始している。本試験において 100 症例を超える腫瘍組織検体および血清検体のペア検体が収集でき次第、本研究に検体を使用する。

(4) 腫瘍組織検体での測定

腫瘍組織検体から抽出した DNA を用いて Digital PCR による遺伝子変異測定を行う。検出された遺伝子変異は、ダイレクトシーケンス、または TaqMan 遺伝子変異検出法のいずれかによる確認を行う。

(5) 血清検体での測定

血清検体から抽出した cfDNA を用いて Digital PCR による遺伝子変異測定を行う。検出された遺伝子変異は、ダイレクトシーケンス、TaqMan 遺伝子変異検出法のいずれかの手法による確認を行う。各手法の検出感度は、ダイレクトシーケンスで約 10%、TaqMan 遺伝子変異検出法で 0.1% であり、Digital PCR による遺伝子変異陽性検体の変異アレルの含有率に応じて選択する。

(6) 血清検体と腫瘍組織検体におけるそれぞれの遺伝子異常検出頻度の測定結果との比較検討

血清検体での遺伝子変異検出結果と腫瘍組織検体での検出結果を比較検討する。腫瘍組織検体での遺伝子変異検出結果をもとに、血清検体における検出成功率と一致率を算出し、血清検体での遺伝子変異検出の有用性について評価する。

(7) 遺伝子変異の有無による耐性機序の解明および治療効果との相関解析

血清検体での遺伝子変異検出結果と腫瘍組織検体での遺伝子変異検出結果に基づき、耐性機序の解明と治療効果との相関を検討する。EGFR-TKI による無増悪生存期間等に関する情報が得られる場合には、予後との相関についても検討す

る。この解析を通して血清検体を用いた digital PCR による遺伝子変異検出の臨床的有用性を検討し、最終的に臨床試験において検証価値があるかを判断する。

4. 研究成果

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者の血漿 34 検体を digital PCR 法を用いて exon20 T790M 耐性遺伝子変異、活性化遺伝子変異 (exon19 と exon21) を測定した。13 例は EGFR チロシンキナーゼ阻害剤による治療前後のペア検体であった。すべての検体において exon19 deletion もしくは exon21 L858R の変異検出が確認された。

T790M 耐性変異陽性は事前に検討した変異アレル頻度 0.015% 以上を陽性と定義した。ペア検体 13 例中、治療開始前の検体で陽性は 1 例のみで、EGFR-TKI 耐性後の検体では 10 例で陽性が確認され (76%)、高感度アッセイによる高い検出率が得られた。遺伝子変異のタイプ別による陽性率では、L858R を認める症例は 25%、deletion を認める症例は 48% で、既存の報告と同様の傾向であった。digital PCR 法を用いた非侵襲的な血漿中の腫瘍由来 DNA からの体細胞遺伝子変異検出の実行可能性が立証でき、肺がんの実地臨床に貢献できると可能性がある判断できる結果であった。今後は検証をさらに重ねて、コンパニオン診断として活用できるかどうか重要である。今回、EGFR-TKI 耐性後の検体において T790M 耐性変異が検出されなかった症例は、T790M 変異以外の他の耐性機序が考えられるため、今後、残余検体を用いて NGS 解析を行う事を検討している。高感度アッセイにより T790M 耐性変異の高い検出率が得られたが、偽陽性の影響によるものかどうかについて T790M 変異に対する耐性克服薬であるオシメルチニブの効果との関連を検討したり、オシメルチニブのコンパニオン診断となっているコパス v2.0 測定キットによる測定結果と比較する必要がある。血清検体からの測定、および腫瘍組織検体と同等の検出結果が得られ、計画していた研究成果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Matsuoka H, Kaneda H, Sakai K, Koyama A, Nishio K, Nakagawa K. Clinical Response to Everolimus of EGFR-Mutation-Positive NSCLC With Primary Resistance to EGFR TKIs. Clin Lung Cancer. 18(1):e85-e87. 2017.

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 裕靖 (KANEDA, Hiroyasu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50351599