

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09239

研究課題名(和文) 血液を利用したMolecular Biopsyによる肺癌薬剤耐性のモニタリング

研究課題名(英文) Monitoring of Emerging Resistance of Lung Cancer using Liquid Biopsy

研究代表者

丹野 幸恵 (TANNO, Sachie)

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：80455724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺腺癌外科切除例を対象とした手術前後の血漿解析でのデジタルPCRによるEGFR、KRAS遺伝子変異について解析を行った。5例中2例でEGFR活性型遺伝子変異を検出し、肺生検時の遺伝子型と一致していたが、症例により血漿中遊離DNA量が少ないため検出感度以下になることや、血漿への遊離がない場合も考えられた。

進行期肺癌症例は74例、103検体採取した。EGFR遺伝子変異を検体、ALK融合遺伝子変異を27検体、KRAS症例を1検体、ROS1融合遺伝子を1検体解析した。

研究成果の概要(英文)：Pre and Post surgical Lung adenocarcinoma samples were analyzed by ddPCR. 5 cases of EGFR or KRAS were analyzed. Because of the low amount of circulating tumor DNA, some of the samples were not detected any mutation. We had collected 103 samples from 74 patients. T790M and C797S mutations were successfully analyzed.

研究分野：肺癌 液体生検 EGFR遺伝子変異 ALK融合遺伝子

キーワード：液体生検 デジタルPCR

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療は、戦略的には腫瘍の heterogeneity を包括した genotyping に基づくのが理想だが、現状では生検組織や外科切除材料から得られる「部分情報」により方針が決定される。治療介入に伴い刻々と変化する遺伝子異常のプロファイルを精度良く、低侵襲かつリアルタイムに捉えるツールが分子標的薬時代には必須である。本研究では、血漿中に含まれる癌細胞由来の DNA 断片の変異・増幅を検出する「液体生検」に注目し、実用化に必要な基盤情報の整理とシステム確立を目指す。「液体生検」による癌患者モニタリングは、デジタル PCR や次世代シーケンサという具体的手段を得たことで実用化段階に近づいており、診断アルゴリズムの確立のみならず耐性や予後予測のために橋渡し可能な情報を得ることが本研究の目的である。

2. 研究の目的

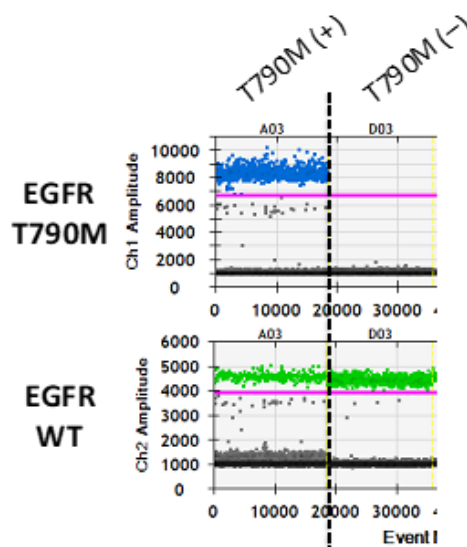
- (1) 肺腺癌患者の血漿遊離 DNA を試料とし、活性型 EGFR 変異ならびに EGFR T790M に代表される耐性変異、Met 遺伝子増幅など既知の遺伝子異常、さらに RAS 関連タンパクの変異 hot spot をターゲットに、デジタル PCR による「超高感度」検出・定量プロトコルを確立する。同時に ALK など獲得耐性の原因となる変異部位が広範に及ぶ遺伝子異常を検出するため NGS による Targeted amplicon sequencing の最適化を図る。得られた血漿遊離 DNA の変異プロファイルを生検組織（外科切除、生検、剖検等）と対比することで、“total biopsy” という観点での液体生検の優位性を明らかにする。
- (2) 薬剤耐性の獲得に至る kinetics を明らかにする。このため薬物治療を行う肺腺癌患者の血漿を経時的に解析し、耐性に関連する遺伝子異常の検出レベル（コピー数）の予後判定における意義を検証する。さらに外科切除組織の初代培養系を用いた薬剤負荷試験を行い、耐性の初期応答機構を解析することにより、血漿を用いた液体生検でのターゲットとすべき新規耐性遺伝子を探査、特定する。

3. 研究の方法

- (1) 肺腺癌外科切除例を対象として手術前後の血漿を得て、デジタル PCR と Targeted amplicon sequencing により遺伝子変異プロファイルを取得し、切除組織から得られる情報と対比する。このことで血漿遊離 DNA 解析（液体生検）による total biopsy の可能性を検証する。同時に活性型 EGFR 変異および ALK 変異陽性例で、特異的阻害剤による治療経過中の血漿をサンプリングし、体細胞変異と増幅プロファイルの変化を前向きに追跡し、腫瘍制御に貢献する薬剤投与期間を液体

生検の結果から検証する。さらに、腫瘍の初代 3D 培養組織を特異的阻害剤で処理し、耐性クローンとその培養上清を用いて、液体生検による検出が可能な初期耐性のマーカーとなる新規遺伝子異常の特定を目指す。

- (2) デジタル PCR は活性型 EGFR 変異ならびに遺伝子増幅を含む既知の代表的な耐性変異、さらに RAS 関連タンパク (KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, AKT) の変異 hot spot をターゲットとした系を研究室で確立している。NGS 解析は Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2 (Life Technologies 社製) をベースとした Targeted amplicon sequencing 法を用いる。いずれも既に大腸癌での予備的検討が終了しており、直ちに稼働可能である。



薬剤耐性機構は多彩な遺伝子異常を背景とするが、EGFR T790M など代表的な二次変異は培養細胞への薬剤負荷により再現可能である。そこで、耐性機構を包括的にスクリーニングするため、初代培養組織を用いた *ex vivo* 薬剤負荷試験を行う。腫瘍細胞の生理的特性を忠実に再現する培養法として、井上らは CTOS 法を考案した (Kondo J, PNAS 2011)。肺腺癌培養については安定的に薬剤負荷試験が可能なプロトコルが報告されているため (Endo H, J Thoracic Oncol 2013)、本研究ではこれに従う。次ページに示す様に数 mm 大の組織から、数百個の EpCAM 陽性細胞からなる organoid を採取することが可能である。ひとつひとつの CTOS が異なる癌腺管に由来しており、腫瘍の heterogeneity を背景とした耐性スクリーニングが期待できる。

4. 研究成果

- (1) 肺腺癌外科切除例を対象とした手術前後の血漿解析でのデジタル PCR による EGFR, KRAS 遺伝子変異について解析を行

った。5 例から術前の血漿を同意を得て取得し遺伝子解析を行った。5 例中 2 例で EGFR 活性型遺伝子変異を検出し、肺生検時の遺伝子型と一致していた。腫瘍最大径 20~35mm と小型肺腺癌が大半を占めたため、血漿中遊離 DNA 量が少ないため検出感度以下になることや、血漿への遊離がない場合も考えられた。1 例は KRAS G12D 症例であったが術後早期に骨転移で再発し、術前からの腸骨転移の存在が疑われたため実際は IV 期であったとかが得られる。以上の問題点から当初目的としていた術後再発の早期検出に関して、耐性クローンとその培養上清を用いて、液体生検による検出が可能な初期耐性のマーカーとなる新規遺伝子異常の特定には多くの症例検討が必要になるため、基礎データを取得した段階で終了した。(図 2)

年齢	性別	臨床情報	血漿中遊離 DNA 量 (ng/ml)	変異箇所	病理病期	腫瘍最大径 (mm)	Del	L858R	T790M
63	F	術前	30.81	EGFR-L858R	T1aNOMO	IA	20	○	○
		術後 9 か月	30					○	○
62	M	術前	4.16	EGFR-L858R	T1aNOMO	IA	20	○	○
		術後 1 か月	12.61					○	○
72	F	術前	10.73	EGFR-L858R	T1bNOMO	IA	21	●	○
65	F	術前	9.74	KRAS	T2aNxMO 部分切除	35			
67	F	術前	13.38	EGFR-ex19del	T1aNOMO	IA	20	●	●

○ ddPCR (0-1 copy) ● ddPCR (> 2 copy)

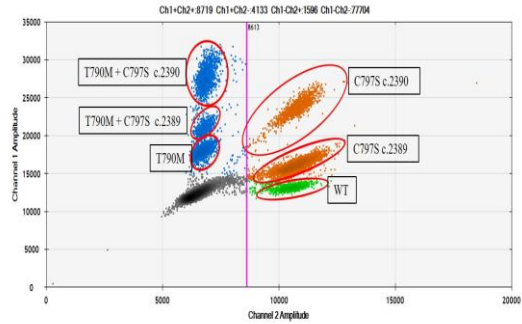
(2) 進行期肺癌の遺伝子変異解析

進行期肺癌症例は 74 例、103 検体採取した。EGFR 遺伝子変異を検体、ALK 融合遺伝子変異を 27 検体、KRAS 症例を 1 検体、ROS1 融合遺伝子を 1 検体解析した。

① EGFR 遺伝子変異症例の T790M 検出 / C797S 変異検出

本研究を実施中に、第 3 世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害薬であるオシメルチニブが承認発売され、該当患者も使用されている。そこで、オシメルチニブ耐性変異の約 20% を占めるといわれている、C797S 変異についても追加解析した。さらに新規耐性変異 C797S は T790M 変異と cis allele か trans allele によって治療選択が変わってくることが予想されるようになった。組織を再生検で取得できた症例については、NGS 解析で Ion AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2 をしようし cis か trans かを区別できる。しかし、デジタル PCR では T790M と C797S が cis か trans かを区別できない設計となっていた。今後の臨床的な測定意義を考え、この 2 つのアレルが PCR プライマーで挟まれるように再設計し、同時に測定可能で cis/trans が区別できるプローブの開発を行った。

図 3 : T790M/C797S cis であれば左

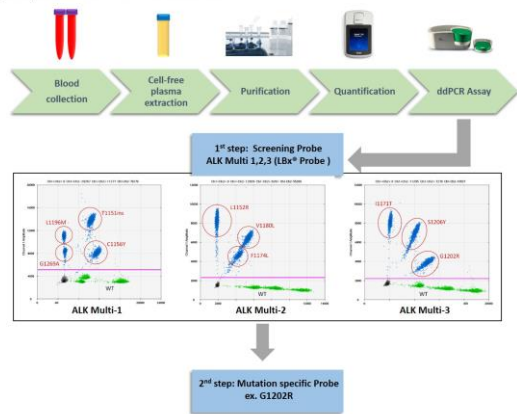


上に高輝度として検出可能。

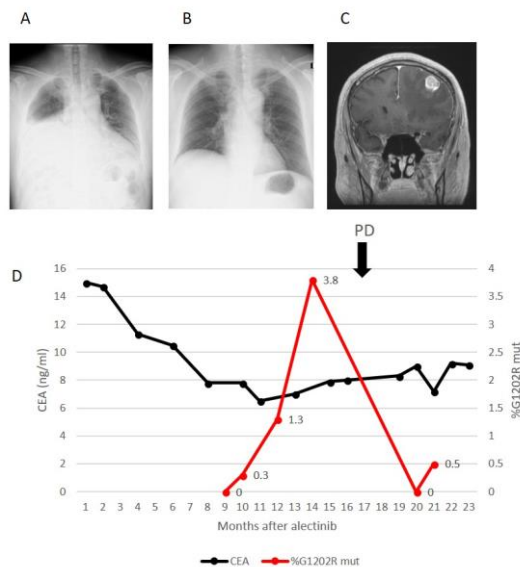
現在は当研究室で開発した T790M/C797S プローブを応用し臨床研究を開始し症例集積中である。「アファチニブ耐性後におけるオシメルチニブの治療効果に関する第 II 相試験 (UMIN000028166)」

② ALK 融合遺伝子の薬剤耐性変異検出
ALK 融合遺伝子陽性肺癌において ALK 阻害薬は有効な薬剤で、化学療法での 1 次治療から使用することが推奨されている (肺癌診療ガイドライン 2017)。本邦においてクリゾチニブ、アレクチニブ、セリチニブが承認発売されている。いずれの薬剤も継続使用の中で耐性遺伝子変異を獲得することが知られている。薬剤によって耐性変異の感受性が異なるために、今後耐性を確認して治療の選択をすることが必要になってくる。しかし、ALK 耐性変異は 10 種類以上報告があり、デジタル PCR を 10 回繰り返すことは検体採取量の観点から困難である。我々は、ALK 遺伝子変異を multiplex で解析可能な市販のデジタル PCR プローブを使用して 27 例の患者群で耐性変異を検討した。

Fig. 1 A protocol to detect recurrent ALK mutations



中でも ALK G1202R 遺伝子変異はいずれの薬剤に対しても耐性を持つものとされている。現在、2 例の G1202R 症例の報告とプロトコル論文は投稿済みである。



現在、「ALK 融合遺伝子変異陽性肺癌における低侵襲がん診断に関する前向き観察研究 (UMIN000032676)」として臨床研究で症例集積し、本解析法の有用性について検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 吉田 遼平, 佐々木 高明, 【肺がん、頭頸部がん】 ALK 阻害薬の耐性機序と次世代 ALK 阻害薬 . 腫瘍内科 2017;19:526-31.
- ② Highly Sensitive Detection of ALK Resistance Mutations in Plasma Using Droplet Digital PCR, 2018 revised

[学会発表] (計 5 件)

- ① Sasaki T, Ono Y, Hukai R, et al. 03-8-4 Clinical Application of Liquid Biopsy in Lung Cancer Diagnosis. Annals of Oncology 2016;27 :mdw521.061-mdw521.061.
- ② 小野 裕介, 佐々木 高明, 吉田 遼平, 大崎 能伸, 水上 裕輔. 日本癌学会総会記事 2016;75 回:P-1332.
- ③ 小野 裕介, 水上 裕輔. 日本癌学会総会記事 2017;76 回:J-3062.
- ④ 吉田 遼平, 佐々木 高明, 大崎 能伸. ALK 耐性変異高感度検出法の確立. 肺癌 2017;57:417.

- ⑤ 吉田 遼平, 佐々木 高明, 平井 理子, 大崎 能伸, et al. ALK 耐性変異高感度検出法の確立. 肺癌 2017;57:919-20.

[その他]

旭川医科大学呼吸器センターホームページ
<http://www.asahikawa-med.ac.jp/hospital/respi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹野 幸恵 (TANNO, Sachie)
 旭川医科大学・医学部・客員助教
 研究者番号: 80455724

(2) 研究分担者

水上 裕輔 (MIZUKAMI, Yuusuke)
 旭川医科大学・医学部・准教授
 研究者番号: 30400089

小野 裕介 (ONO, Yusuke)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院附属臨床研究センター・臨床生体情報解析部・部門長
 研究者番号: 40742648

佐々木 高明 (SASAKI, Takaaki)

旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号: 70516997

(3) 研究協力者

吉田 遼平 (YOSHIDA, Ryouhei)
 旭川医科大学・医学部・助教
 研究者番号: 40792883