

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10110

研究課題名(和文)末梢血を用いた液体生検としての胃癌HER2遺伝子増幅解析法の開発

研究課題名(英文) Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer

研究代表者

岡本 和真 (Kazuma, Okamoto)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20285258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：HER2遺伝子の数が増える(遺伝子増幅)ことによる HER2分子の活性化は胃癌悪性化の原因となる。現在手術時組織の胃癌HER2遺伝子増幅症例で、再発時に分子標的治療薬を用いた治療を行うが、HER2 陽性と診断されても、全ての癌細胞でHER2増幅が起こるわけではなく、手術時HER2 陰性と診断されても、数少ない陽性細胞がその後増殖した場合には有効であるはずの薬の効果が見込めるのにも関わらず使えない。血液中癌由来DNAからDroplet digital PCRを用いてHER2遺伝子増幅を判定する方法は、低侵襲で高感度、高精度な検出を可能にし、再発モニター治療効果マーカーになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Oncogenic activation (e.g. amplification) of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) results in its protein overexpression and subsequent abnormal cell signalling, which contributes to cancer progression. Important issues for HER2-targeted therapy in GC are inaccurate assessments of HER2 status owing to intratumoral heterogeneity, which results in inappropriately choosing patients for HER2-targeted therapy. We investigated the potential clinical utility of the droplet digital PCR (ddPCR)-based HER2 copy number (CN) as a marker for the temporal and/or spatial heterogeneities of GC during treatment progress. The plasma HER2 amplification determined by ddPCR is a repeatable and noninvasive approach for real-time evaluations of the HER2 status to monitor the effects of treatments for patients with HER2-positive GC and enable treatment options for patients with HER2-negative GC but positive conversion of the HER2 status after recurrence.

研究分野：胃癌

キーワード：リキッドバイオプシー 胃癌 HER2

## 1. 研究開始当初の背景

ToGA 試験の結果、HER2 陽性進行・再発胃癌患者に対する化学療法への Trastuzumab の上乗せ効果が証明され (Bang ら, Lancet 2010)、胃癌に対する薬物療法選択において HER2 発現・遺伝子増幅の解析が不可欠となった。また、胃癌組織内の HER2 遺伝子増幅レベルと治療効果や予後との相関も報告されている (Gomez-Martin ら, J Clin Oncol 2013)。しかし、乳癌に比べて高い胃癌組織内の不均一性や、転移・再発病巣における検体採取の侵襲性が、胃癌における正確な HER2 陽性診断を困難にしている。

一方、以前より、担癌患者の末梢血液中には、腫瘍に由来した核酸断片が存在することが知られており、癌における新たな非侵襲的診断・治療バイオマーカーが近年注目を浴びている。我々も癌患者末梢血液中の様々な微量核酸を用いた診断バイオマーカー探索を行い、その有用性を報告してきた (Takeshita H et al. Br J Cancer; 2010, Tsujiura M et al. Br J Cancer; 2010, Komatsu S et al. Br J Cancer; 2011, Morimura R et al. Br J Cancer; 2011, Konishi H et al. Br J Cancer; 2012, Ichikawa D et al. Gastroenterology, Kawaguchi T et al. Br J Cancer, Hirajima S et al. Br J Cancer, Tsujiura M et al. World J Gastroenterology)。HER2 増幅に関しては、乳癌患者で血中 DNA 断片を用いた新たな解析手法の開発とその有用性が報告されてきているが (Gevensleben ら, Clin Cancer Res 2013)、癌腫によりゲノムコピー数評価のコントロール遺伝子や感度が異なることから、組織内不均一性やゲノム進化を加味して繰り返し施行でき、高感度に客観的定量が可能な胃癌に最適の HER2 増幅解析法確立とその有用性の確認が喫急の課題である。

このような状況を背景に、本研究課題では、液体生検 (Liquid biopsy) の概念のもと、空間的・時間的不均一性を克服したリアルタイムの癌特性把握に基づく“テーラーメイド癌診療”に資する血漿 HER2 増幅診断法を確立し、分子標的治療の効果が期待できる HER2 陽性胃癌の新たな診断・治療体系を構築することを目的とする。我々は、既に胃癌の血中遊離 DNA 断片を用いた高感度 HER2 増幅測定法の開発に着手し、末梢血を用いて HER2 陽性胃癌の腫瘍動態が評価可能であることを確認すると共に、転移・再発症例のうち原発巣での結果と一致しない例では、本方法が空間的・時間的不均一性を反映し治療効果予測に有用である可能性を見出した (Shoda K et al. Gastric Cancer in press)。しかしながら、通常の PCR 法や Digital PCR 法による解析では、その精度に限界があることもわかってきた。これらの独自の成果を基盤に、進行・再発胃癌患者を対象として Droplet

Digital PCR (ddPCR) 法を用いた解析手法を開発した後、臨床経過中に繰り返し血液中 DNA 断片の HER2 増幅解析を行い、その結果と Trastuzumab の治療効果など臨床病理学的因子とを比較検討することで HER2 陽性胃癌細胞の動態を検出するコンパニオンマーカーを確立する予定である。

## 2. 研究の目的

(1) Droplet Digital PCR (ddPCR) 解析による参照遺伝子の決定

細胞株や胃癌細胞のゲノム解析結果から絞った参照遺伝子候補について、HER2 陽性胃癌、HER2 陰性胃癌ならびに非癌部組織を用いた ddPCR 法による HER2 遺伝子増幅解析を試み、同手法の妥当性について検討し、抽出 DNA を用いた HER2 遺伝子増幅診断の胃癌における最適参照遺伝子を決定する。

(2) 進行・再発胃癌における血漿 HER2 増幅解析のコンパニオンマーカーとしての有用性の検討

胃癌患者 (HER2 陽性、陰性) ならびに健常対照者の血漿中 DNA 断片を抽出し、上記開発した手法を基に、血漿中 HER2 遺伝子の定量解析を行う。一方で、次世代シーケンサーを用いて、よりゲノムワイドな観点から本検出法の精度を同時に測定し、検出法の最適化も図る。これらの結果と、原発巣における HER2 遺伝子増幅の有無との相関から、カットオフ値の決定ならびに同手法の有用性を検討する。

(3) “液体生検 (Liquid biopsy)” による HER2 遺伝子増幅の臨床的意義についての検討

HER2 陽性胃癌患者の治療経過中の血漿中 HER2 遺伝子増幅の経時的な解析を行い、その臨床経過や治療効果との関連からその臨床意義について検討する。また一方で、HER2 陰性胃癌患者の再発時等、治療経過中の同手法による血漿中 HER2 遺伝子増幅解析を行い、これらの結果から、胃癌における HER2 遺伝子増幅に関する“液体生検 (Liquid biopsy)” の概念の確立を目指す。

HER2 陽性胃癌に対する Trastuzumab 療法が保険承認され、実地臨床で汎用されている。しかしながら、胃癌においては、原発巣の組織採取を基に HER2 遺伝子増幅の判定が行われ、切除不能高度進行胃癌における多数の転移巣における個々の HER2 増幅状態は加味されない。再発胃癌においては、組織採取の困難さから、初回切除時の原発巣における HER2 検査結果に拠るところが大きく、癌の進展や治療による分子生物学的特性の変化は考慮されていない (下図)。

今回の我々の手法は、適切な参照遺伝子を用いることで、血漿中における HER2 遺伝子の僅かな増幅も検出可能であり、胃癌患者の HER2 増幅の状態を個体全体として経過中何

度でも客観的に数値化して捉えることができる。このため本手法は、現在、実地臨床で用いられる従来の生検や手術組織を用いた HER2 診断法で問題となる空間的不均一性による偽陽性を克服し、かつ腫瘍の進展による遺伝子変異蓄積と治療・転移などの淘汰圧により刻々と変化する癌組織の分子生物学的特性の把握や治療効果の定量的評価にも対応可能な、画期的非侵襲的診断法と成りうる。本研究課題は、胃がん診療における治療法選択の最適化に直結し無駄な投薬による副作用の軽減とともに医療費の抑制に貢献できるのみならず、今後開発が進められる分子標的薬剤を用いた癌診療に、時間と空間を考慮した 4 次元コンパニオンマーカーというパラダイムシフトを提供するモデルとなるものであり、「第 3 次対がん 10 か年総合戦略」の中で推進されているトランスレーショナルリサーチの推進、「日本再興戦略」において推進が求められている個別化医療を齎す画期的な手法を提供できる蓋然性が高い。

### 3. 研究の方法

(1) Droplet Digital PCR 解析による最適参照遺伝子の決定と解析手法の最適化

細胞株 (HER2 陽性細胞株:NCI-N87, 4-1ST, HER2 陰性細胞株:MKN-45) ならびに胃癌組織サンプルを対象に、乳癌で既報の EFTUD2 遺伝子を参照遺伝子とした HER2/EFTUD2 比解析を Droplet Digital PCR 法を用いて行い、正常対照例からの相対定量法で数値化する。胃癌組織に関しては、不均一性を考慮し、原発巣複数部位で行う免疫染色・FISH 法を用いた従来の HER2 増幅診断所見、血漿 HER2 増幅解析結果、および臨床情報との比較から、同手法の妥当性を検討する。また、一般的に DNA 定量解析において参照遺伝子として推奨されている RNaseP 遺伝子ならびに TAOK1 遺伝子についても同様に解析を行い、敏感度ならびに特異度の結果から最適参照遺伝子を決定する。

(2) 進行・再発胃癌における血漿 HER2 増幅解析の最適化とコンパニオンマーカーとしての有用性の検討

血漿を用いた解析手法の最適化  
治療前胃癌症例の末梢血分離血漿から抽出した遊離 DNA 断片を用い、我々があらかじめ決定した最適参照遺伝子を用いる Droplet Digital PCR 法での HER2 遺伝子の増幅解析を行い、正常対照例からの相対定量法で数値化する。一方で、次世代シーケンサーを用いた血漿中 DNA の解析を行い、よりゲノムワイドな視点からも HER2 遺伝子のコピー数の定量化を評価し、検出法の最適化を図る。

血漿 HER2 遺伝子増幅解析によるコンパニオンマーカーとしての有用性の検討  
HER2 陰性胃癌患者 (IHC:0, FISH 結果:陰性) 100 症例ならびに HER2 陽性胃癌患者 (FISH

結果:陽性)30 症例の術前担癌状態での血漿を対象とし、血漿中 DNA 断片を抽出し、上記 2 で最適化した手法を用いた血漿 HER2 遺伝子増幅解析を行い、原発巣の HER2 診断結果との対比から、同手法のコンパニオンマーカーとしての有用性について検討する。

(3) “液体生検 (Liquid biopsy)” による HER2 遺伝子増幅の臨床的意義についての検討

HER2 陽性胃癌の Trastuzumab 療法に対するモニタリング・バイオマーカーとしての有用性の検討

HER2 陽性胃癌患者の治療経過中定期的に血漿 HER2 増幅解析を行い、RECIST 分類による Trastuzumab 治療効果との比較から、血漿 HER2 遺伝子定量値変化の治療効果予測マーカーとしての有用性を検討する。

進行・再発胃癌の治療経過中血漿 HER2 遺伝子定量値の推移に関する観察研究の実施

従来の診断法に基づく HER2 陽性・陰性胃癌の治療経過中の定期的な血漿 HER2 増幅解析結果と臨床情報との比較解析を行う。HER2 陽性例では、Trastuzumab 治療経過中の血漿 HER2 遺伝子定量値の変化と RECIST 分類による治療耐性の出現との比較を行い、HER2 陰性例では、再発例における血漿 HER2 増幅陽性化率と従来の術後化学療法に対する反応性について検討を行う。

Trastuzumab 療法に対する感受性バイオマーカーの検討

原発巣における HER2 診断で陽性であった高度進行切除不能・再発胃癌患者のうち、RECIST 分類における評価可能病変を有する患者を対象に、治療経過中の血漿中 HER2 遺伝子増幅解析を行い、その臨床経過や治療効果との関連から、同手法の Trastuzumab 療法に対する感受性予測コンパニオンマーカーとしての有用性を検討する。一方で、原発巣における HER2 陰性胃癌の治療経過中に再発を認めた症例の血漿 HER2 遺伝子増幅解析を行い、HER2 遺伝子増幅に対する“液体生検 (Liquid biopsy)” の概念の確立を目指す。また、今後の血漿 HER2 診断に基づく Trastuzumab 併用療法による治療介入試験の可能性についても検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) Droplet Digital PCR 解析による最適参照遺伝子の決定と解析手法の最適化

細胞株 (HER2 陽性細胞株:NCI-N87, 4-1ST, HER2 陰性細胞株:MKN-45) ならびに胃癌組織サンプル、健常者コントロールサンプルを用いて最適参照遺伝子を決定した。最も増幅欠失が少ないと考えられる RPPH1 を選択した。

(2) 進行・再発胃癌における血漿 HER2 増幅解析の最適化とコンパニオンマーカーとし

て“液体生検(Liquid biopsy)”によるHER2 遺伝子増幅の有用性の検討

対象は30例の健常者、60例の胃癌患者とし、末梢血からの血液サンプルを採取した。胃癌患者については術前と、術後半年毎の血液サンプルから遊離DNAを採取した。HER2の参照遺伝子としてribonuclease RNA component H1 (RPPH1)を用いて、血漿HER2増幅はddPCRを用いたHER2:RPPH1 ratio (HER2 ratio)で算出した。胃癌患者の中で再発を来した17例に関しては治療経過中の血漿HER2 ratioのdynamicsを検討した。

血漿HER2増幅のcut-off値は健常者HER2 ratioのmean+2SDを用いた。血漿HER2 ratioは組織HER2ステータスとの有意な相関を認め(p < 0.001)、感度・特異度はそれぞれ0.733、0.933であった。術後モニタリングが可能であった症例に関しては、組織HER2陽性例であった4例において血漿HER2 ratioは治療効果と相関して推移する傾向を示した。組織HER2陰性例においては13例中7例において再発時のHER2 ratioが陽転化し、その後も継続的な上昇を示す傾向を認めた。

その後、血漿HER2が増幅している肝転移症例のHER2 IHC scoreの検討を計画し、更なる症例集積を試みたが、胃癌肝転移切除症例が少ないため症例集積が困難であった。血漿HER2増幅を認めていないが、経過中に肝転移を来し切除施行した症例5例の肝転移巣のIHC HER2 scoreを検討したがいずれも陰性であり、これらの症例については原発巣と転移巣との不一致を指摘することはできなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

(1) 庄田勝俊、市川大輔(他3名): 胃癌をリアルタイムに監視するリキッドバイオプシー技術. Pharm stage. 17:43-47 (2017) 査読無

(2) Shoda K, Ichikawa D, Okamoto K, (他11名): Clinical utility of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in patients with gastric cancer. Oncotarget. 2017,8:28796-28804. 査読有

(3) Shoda K, Ichikawa D, Okamoto K, (他13名): Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. Gastric Cancer. 2017,20:126-135. 査読有

(4) Shoda K, Ichikawa D, (他7名): HER2 amplification detected in the circulating DNA of patients with gastric cancer: a retrospective pilot study. Gastric Cancer. 2015,18:698-710. 査読有

(5) Tsujiura M, Ichikawa D, Okamoto K, (他11名): Circulating miR-18a in plasma contributes to cancer detection and

monitoring in patients with gastric cancer. Gastric Cancer. 2015,18:271-279. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

(1) 市川大輔, 庄田勝俊, 岡本和真, 他. 血漿中遊離DNA断片を用いたHER2増幅診断法の有用性の検討 第53回日本癌治療学会学術集会 2015年10月29日(京都市)

(2) 市川大輔, 庄田勝俊, 岡本和真, 他. 血液中遊離核酸を用いたLiquid biopsyの有用性と今後の課題. 第40回日本外科系連合学会学術集会 2015年6月18日(東京都)

(3) 市川大輔, 庄田勝俊, 岡本和真, 他. 消化器癌における基礎研究知見の臨床応用 血液中遊離核酸を用いたLiquid biopsyの有用性と今後の課題 第70回日本消化器外科学会総会 2015年7月15日(浜松市)

(4) 市川大輔, 庄田勝俊, 岡本和真, 他. 末梢循環遊離DNAを用いた血漿HER2増幅診断法の開発と胃癌治療における有用性の検討 第116回日本外科学会定期学術集会 2016年4月14日(大阪市)

(5) 市川大輔, 庄田勝俊, 岡本和真, 他. 胃癌におけるLiquid biopsyとしての血漿HER2増幅診断法の有用性の検討. 第71回日本消化器外科学会総会 2016年7月14日(徳島市)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

京都府立医科大学消化器外科ホームページ  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/dgstv-surg/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 和真 (OKAMOTO KAZUMA)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号:20285258

(2) 研究分担者

市川 大輔 (ICHIKAWA DAISUKE)

山梨大学・大学院総合研究部・教授  
研究者番号:20347446