

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K07202
 研究課題名(和文)Liquid Biopsy と腫瘍生検によるprecision medicine

 研究課題名(英文)Precision medicine through liquid biopsy and tumor biopsy

 研究代表者
 猶木 克彦 (Naoki, Katsuhiko)

 北里大学・医学部・教授

 研究者番号：40265806
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌治療戦略では癌遺伝子変異に基づくプレジジョンメディスンが必須である。日本人肺癌患者で高頻度であるEGFR遺伝子変異に関し感受性および耐性変異(T790M)の最適な検出方法を検討した。EGFR阻害剤耐性肺癌患者の組織・血液を採取し本邦で広く行われていた高感度PCR法(PNA-LNA PCR Clamp法)と欧米で主に行われていたreal-time PCR法(Cobas法)を比較した。組織での結果は検査法に関わらず一致していたが血液検体との一致率は感受性変異と耐性変異で異なった。血漿と血清での検出感度は同様に有意義であった。検体毎の特性を留意し複数回の検査により感度を高めることが重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌のバイオマーカーとしてのEGFR遺伝子変異に関して、治療方針決定のための感受性変異および耐性変異検出方法を前向き研究により検討した。血液を用いたリキッドバイオプシーの有用性と限界、血漿と血清での差を詳細に検討し、EGFR阻害剤耐性肺癌患者での変異検出方法に関して本邦でも広く行われるようになったCobas法に関して基礎的な情報を与えるものとなった。英文論文(Onco Targets Ther 2018)、学会発表(2019年世界肺癌学会、2018年日本肺癌学会、他)により公表した。さらに、基礎的なEGFR阻害剤耐性肺癌細胞株での耐性機序に関して検討し発表した(2019年日本肺癌学会)。

研究成果の概要(英文)：EGFR mutations is very important for decision making to treat lung cancer. We prospectively evaluated the detection methods of EGFR mutations in tissue re-biopsy and liquid biopsy (plasma and serum) using high sensitivity method (PNA-LNA PCR clamp, mainly done in JAPAN) and new PCR-based method (COBAS ver2, mainly done in USA and EU). Detection of EGFR mutation by COBAS ver2 and by PNA-LNA method was almost the same in tissue. The detection rate of T790M was lower than that of the original EGFR mutation in liquid biopsy compared to that in tissue re-biopsy. The detection of T790M in serum exhibited a higher specificity and positive predictive value than that in plasma. The detection sensitivity of T790M was similar in plasma and serum. Plasma, serum, and tissue genotyping can have complementary roles for detecting EGFR-T790M. Repeated tests with different samples and different methods may improve accuracy of EGFR mutation detection and will lead to the maximum benefit for the patient.

研究分野：医学

キーワード：肺癌 バイオマーカー リキッドバイオプシー 生検 プレジジョンメディスン 分子標的 EGFR T790M

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

近年の肺癌治療の大きな進歩の一つが標的癌遺伝子の発見である。申請者らが発見した上皮成長因子受容体(EGFR)活性化遺伝子変異を有する肺癌(Paez JG, Naoki K, et al. *Science* 2004)は日本人の肺癌の50%程度を占め、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)治療によりそれまでの進行肺癌の平均余命1年前後が3年前後へと画期的に延長した。EGFR-TKI治療に耐性化した場合50-60%の症例で耐性遺伝子変異EGFR T790Mが原因であり、T790M変異特異的EGFR-TKI(osimertinib)の臨床導入により無増悪生存期間が9~12ヶ月延長し全生存期間の延長が見込まれている。

このような遺伝子異常に基づく肺癌治療の選択は2015年米国大統領声明にあるprecision medicine(個別化精密医療)である。診断時のみならず耐性化時に組織を採取する「re-biopsy(再生検)」によりT790M変異を含む耐性機序を検討し、これまで難治であった耐性肺癌の予後を画期的に改善することができる。一方、precision medicineの問題点は量的・質的に遺伝子検査に耐える癌組織の必要性である。体内の深部に病変があり合併症(出血、臓器障害など)の危険性が高い場合や、全身状態が悪く組織採取が安全にできない場合もある。

より低侵襲な方法として、血液中の癌細胞由来DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)を用いた診断(liquid biopsy)が期待されている。しかし、組織診断との一致率、感度・特異度を考慮する必要がある。組織内においても癌の特性や遺伝子異常の不均一性が報告されており、組織検体とctDNAとの詳細な比較検討が必要である。申請者は、診断時におけるEGFR遺伝子変異検査の異なる組織間での一致率や標準検査との比較を報告し(Naoki K, et al. *Int J Clin Oncol* 2011)、世界肺癌学会を含む複数の学会の共同ガイドラインで引用されている(Lindeman NI, et al. *J Thorac Oncol* 2013)。検査法・検体間の一致率などの詳細な検討は、このような世界的なガイドラインへ反映されるなど将来への貴重なデータとなる。さらに、ALK融合遺伝子を有する肺癌は肺癌の2-5%前後の頻度であるが、EGFRと同様、ALKチロシンキナーゼ阻害剤(ALK-TKI)の有効性と、その後の耐性化(L1196M変異など)が報告されている。申請者はALK-TKI耐性化の機序に関し、再生検組織での免疫染色を含めて報告した(Miyawaki M, Naoki K, et al. *Mol Cancer Res* 2016)。ALK-TKI耐性肺癌に関しても組織再生検、liquid biopsyによる耐性化機序の検討が、将来の治療戦略を検討する上で重要となる。最近の大きな治療の進歩が免疫チェックポイント阻害薬の開発である。Nivolumabが肺癌治療に導入され、さらに複数のPD-1/PD-L1抗体が開発中である。それらの効果予測因子は十分明らかになっていないが、癌組織でのPD-L1発現や腫瘍浸潤リンパ球数が有用な可能性があり、組織での検討が必要である。しかし、免疫チェックポイント阻害薬耐性例やEGFR-TKI耐性例でどのような変化が起こるかに関しての報告は乏しい。また、PD-L1発現がEGFR-TKIにより修飾されるとの報告がある。治療前後の腫瘍の再生検と、低侵襲に採取できる血液検体を含め、癌遺伝子異常や免疫関連タンパク・腫瘍浸潤免疫細胞の変化を観察し、治療効果予測因子を明らかにすることは適切な医療の提供において貴重な判断材料になる。

腫瘍再生検とLiquid Biopsyの特徴

	利点	欠点
腫瘍再生検	確実 (ゴールドスタンダード)	侵襲度 高い アクセス 比較的困難
リキッド・バイオプシー (血液 ctDNA)	侵襲度 低い アクセス容易	感度低い

これらの目的で申請者は院内の倫理審査委員会の承認を得て検体バンクの整備を開始した。現在、手術検体を中心に60例以上の検体を収集しているが、治療に耐性化した組織・胸水検体や血液検体の収集を拡充していく。再生検検体は癌細胞数が少ないため、直接免疫不全マウスに移植(patient-derived xenograft, PDXモデル)、癌細胞の増殖効率を上げる工夫が必要であり、現在preliminaryな検討を行っている。さらに申請者は大学病院と関連施設においてKLOG(Keio Lung Oncology Group)というグループを形成し、肺癌に関する臨床諸問題を検討し、肺癌治療の前向き臨床試験(Miyawaki M, Naoki K, et al. *Mol Clin Oncol* 2016)や、肺癌患者・家族におけるQOL調査(佐藤、猶木ら、2015日本緩和医療学会発表)を報告している。この枠組みを使用し基礎から臨床への橋渡しとなる臨床研究を行う。現在、免疫チェックポイント阻害剤使用患者の多施設共同症例集積研究を行っており、治療効果に関連する諸因子を検索している(小林、猶木ら、2017年日本呼吸器学会総会で発表)。Preliminaryな結果であるが、EGFR変異陽性など癌遺伝子陽性肺癌では陰性肺癌に比べ奏効率が低いこと、一方、ステロイドホルモンなど免疫抑制剤使用の有無と奏効率には相関がないことが判明した。このような臨床因子とともに、腫瘍検体や血液検体で効果予測因子が明確になればより適切な治療選択が可能となる。EGFR変異肺癌は欧米では肺癌の中で10%前後だが、本邦およびアジア諸国では50%と多く、EGFR-TKI耐性肺癌に対する治療戦略を検討することは本邦にとって重要である。

2. 研究の目的

Liquid Biopsy と腫瘍再生検により肺癌診療へ即時応用可能な precision medicine を目指す。

(1) 腫瘍検体と liquid biopsy を用いて、最適な治療薬を検討する際の癌遺伝子異常および免疫関連因子に関して、特に EGFR 遺伝子変異に焦点を置いて検討する。

EGFR-TKI 耐性変異の検出において、腫瘍検体と血液検体を用い、欧米で承認されているコンパニオン診断薬と本邦で広く行われている高感度法の感度・特異度・一致率を検討する。

ALK 融合肺癌は比較的、頻度が少ないため、多施設共同の枠組みを利用して症例を集積し、腫瘍検体・血液検体からの耐性変異の検出方法・臨床的意義を検討する。

PD-L1/PD-1 抗体を使用する前後の血液検体と腫瘍検体を用いて、免疫関連因子の変化など、治療効果予測因子を検討する。

(2) 上記を遂行するため、肺癌組織バンクを拡充し、血液検体・ctDNA の保管・解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性肺癌において liquid biopsy および腫瘍再生検を行い、以下の項目を検討する。

EGFR 変異検出における組織検体と血液検体を用いた検査方法の比較: EGFR-TKI 耐性肺癌患者の組織検体・血液検体を採取し、PNA-LNA PCR Clamp 法と Cobas 法での検出感度・一致率を比較検討する。Liquid biopsy 検体において、血漿と血清での検出感度を比較し、どちらも遺伝子変異解析に使用可能かに関し検討する。

ALK 融合肺癌において、上記と同様、組織と血液検体を用いて検討する。再生検した腫瘍組織、および、血液由来の ctDNA を用い、ALK 阻害剤使用後に耐性化した症例に関して、既存の耐性変異 (L1196M 変異など) を PCR 法で検出するとともに、新たな耐性機序に関して検討する。さらに稀な HER2、ROS、RET といった癌遺伝子異常肺癌に関しても、腫瘍及び血液検体で、当初の遺伝子異常とともに付加的な遺伝子異常が検出されるか検討する。

免疫チェックポイント阻害薬に関しては、組織での PDL-1 タンパク発現は複数の抗体・検査法があり、薬剤ごとに「コンパニオン診断薬」が異なる。臨床現場で複数の類似の検査を行うことは、組織の有限さ、検査に関わる人的・時間的資源などから困難が予想される。それら検査法の一貫率や問題点を明らかにし、検査法の適正化、組織・人的資源の有効活用の道筋をつける。

(2) 肺癌組織バンク、血液・ctDNA バンクの拡充

手術検体に加え、耐性肺癌の再生検検体、血液検体・ctDNA を集積する。それらのヒト肺癌細胞を免疫不全マウスへ直接移植 (PDX) し、癌細胞の増殖・保存・細胞株樹立を図る。増殖した腫瘍から肺癌細胞株を樹立し in vitro での薬剤感受性の検討などの実験を行う。

4. 研究成果

(1) EGFR 変異検出における組織検体と血液検体を用いた検査方法の比較を行った。

EGFR 変異検出法には、本邦で広く行われている高感度 PCR 法 (PNA-LNA PCR Clamp 法など) と、欧米で主に行われている real-time PCR 法を用いた Cobas 法がある。EGFR 阻害剤耐性変異 (T790M) 特異的な新薬 Osimertinib を使用する臨床試験で、組織から耐性変異を検出する「コンパニオン診断薬」として Cobas 法が使用され米国および本邦で承認された。しかし、高感度 PCR 法と比較し感度が低い (J Thorac Oncol 2016)。さらに、これまでは組織からの耐性変異検出が基本であったが、Cobas 法による血液を用いた耐性変異検出が 2016 年秋に米国で承認された。しかし、本研究申請時点では血液を用いた Cobas 法は本邦では未承認で、本邦で広く行われている高感度法との比較は十分されていなかった (ただし、2017 年 7 月より本邦でも保険承認となった)。

申請者は、組織検体・血液検体を用いた前向き研究を計画し実施した。EGFR 阻害剤耐性肺癌患者の組織検体・血液検体を採取し、PNA-LNA PCR Clamp 法と Cobas 法で検出感度・一致率を比較検討した。組織での結果は検査方法に関わらず一致していたが、血液検体との一致に関しては感受性変異と耐性変異では異なる結果であった。血漿と血清での検出感度の比較では同様に有意な結果であった。

これらを英文論文にて発表し (Kobayashi K, Naoki K, et al. Onco Targets Ther 2018)、2018 年日本肺癌学会ではワークショップ演題に採択され発表した (小林、猶木、他。第 59 回日本肺癌学会学術集会 2018 年 11 月)。実臨床での検討として、異動後の施設である北里大学において組織と血液での比較検討を行い、学会発表を複数、行った (楠原、猶木、他。第 41 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 2018 年 5 月; 間中、猶木、他。第 59 回日本肺癌学会学術集会 2018 年 12 月)。さらに、追加データを含め、2019 年度に学会発表した (小林、猶木、他。第 59 回日本呼吸器学会学術講演会 2019 年 4 月)。

(2) 研究代表者の異動に伴い、上記、研究を継続するとともに、異動後の施設において実臨床での臨床情報を含め、引き続き癌遺伝子変異に関連する precision medicine の検討を行った。EGFR 遺伝子変異に関して、その感受性変異、耐性変異の検出などについて北里大学病院に

おける組織と血液での比較検討をまとめて複数の学会で発表した(笠島、猶木、他、第42回日本呼吸器内視鏡学会学術集会 2019年7月、他)。ALK 遺伝子変異に関連して、遺伝子パネル検査を応用した耐性機構の解明とそれに基づいた治療戦略に関して学会発表を行った(曽根、猶木、他、日本内科学会ことはじめ 2018年4月)。

また、precision medicine の実践としての遺伝子パネル検査の運用の実際を発表した(福井、猶木、他、第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 2019年6月)。

(3)基礎的な検討として、EGFR 変異陽性肺癌細胞株を用いて EGFR 阻害剤耐性株を作成し、耐性機序の検討を行い、発表した(石原、猶木、他、第60回日本肺癌学会学術集会 2019年12月)。肺癌組織バンクでの検体収集を継続し、予後予測マーカ-を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Igawa S, Ono T, Kasajima M, Ishihara M, Hiyoshi Y, Kusahara S, Nishinarita N, Fukui T, Kubota M, Sasaki J, Hisashi M, Yokoba M, Katagiri M, Naoki K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of EGFR genotype on the efficacy of osimertinib in EGFR tyrosine kinase inhibitor-resistant patients with non-small cell lung cancer: a prospective observational study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Manag Res.	6. 最初と最後の頁 4883-4892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/CMAR.S207170.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Keigo, Naoki Katsuhiko, Manabe Tadashi, Masuzawa Keita, Hasegawa Hanako, Yasuda Hiroyuki, Kawada Ichiro, Soejima Kenzo, Betsuyaku Tomoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparison of detection methods of EGFR T790M mutations using plasma, serum, and tumor tissue in EGFR-TKI-resistant non-small cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 OncoTargets and Therapy	6. 最初と最後の頁 3335-3343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/OTT.S161745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi K, Naoki K, Kuroda A, Yasuda H, Kawada I, Soejima K, Betsuyaku T.	4. 巻 57(7)
2. 論文標題 Case of EGFR-mutant Non-Small Cell Lung Cancer Accompanied by Transient Asymptomatic Pulmonary Opacities Successfully Treated with “Stop-And-Go” Osimertinib.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 1007-1010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.9609-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kobayashi K, Naoki K, Ikemura S, Yasuda H, Kawada I, Soejima K.
2. 発表標題 THE USEFULNESS OF “SERUM” SAMPLES TO DETECT EGFR T790M MUTATION IN EGFR-TKI-RESISTANT NON-SMALL CELL LUNG CANCER.
3. 学会等名 The IASLC 20th World Conference on Lung Cancer.（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原未希子, 田中真澄, 南部晶子, 小澤貴裕, 楠原政一郎, 原田真也, 日吉康弘, 笠島真志, 福井朋也, 井川聡, 佐々木治一郎, 猶木克彦.
2. 発表標題 第1、2、3世代EEGFR-TKI 耐性肺癌細胞株の樹立と獲得耐性機序の解析.
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠島真志, 間中博也, 伊藤弘紀, 大江俊太郎, 小野泰平, 楠原政一郎, 日吉康弘, 福井朋也, 井川聡, 横場正典, 三藤久, 佐々木治一郎, 片桐真人, 久保田勝, 猶木克彦.
2. 発表標題 T790M組織再生検陰性, リキッドバイオプシー陽性進行非小細胞肺癌におけるオシメルチニブ治療効果の検討.
3. 学会等名 第42回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林慧悟, 猶木克彦, 増澤啓太, 眞鍋維志, 池村辰之介, 安田浩之, 川田一郎, 別役智子, 副島研造.
2. 発表標題 EGFR-TKI 耐性肺癌のオシメルチニブの効果予測における“血清”検査の有用性.
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井朋也, 井川聡, 坂井和子, 武田真幸, 高濱隆幸, 中川和彦, 西尾和人, 猶木克彦.
2. 発表標題 固形がんに対する腫瘍遺伝子網羅的解析結果に関する観察研究.
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 慧悟, 猶木 克彦, 眞鍋 維志, 増澤 啓太, 池村 辰之介, 安田 浩之, 川田 一郎, 副島 研造, 別役 智子.
2. 発表標題 リキッドバイオプシーのup to date EGFR-TKI耐性肺癌のオシメルチニブの効果予測における"血清"検査の有用性.
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石原 未希子, 井川 聡, 白澤 昌之, 首根 英之, 杉本 藍, 原田 真也, 楠原 政一郎, 日吉 康弘, 大谷 咲子, 三藤 久, 村雲 芳樹, 久保田 勝, 猶木 克彦.
2. 発表標題 当院におけるEGFR遺伝子変異陽性肺癌のT790M検出にむけた組織再生検の成績.
3. 学会等名 第41回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 楠原 政一郎, 井川 聡, 白澤 昌之, 猶木 克彦, 久保田 勝, 三藤 久, 福井 朋也, 笠島 真志, 石原 未希子, 原田 真也, 倉林 慎太郎, 杉田 景佑.
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性進行非小細胞肺癌でT790M組織再生検陰性, リキッドバイオプシー陽性患者についての検討.
3. 学会等名 第41回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 首根英之, 福井朋也, 佐々木治一郎, 中原善朗, 西成田詔子, 杉田景佑, 小野泰平, 坂井和子, 西尾和人, 猶木克彦.
2. 発表標題 耐性化後の再生検組織を用いたクリニカルシーケンスが治療選択に有用であったALK 肺癌の1 例.
3. 学会等名 日本内科学会 医学生・研修医の日本内科学会ことはじめ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 間中 博也, 石原 未希子, 楠原 政一郎, 井川 聡, 白澤 昌之, 小澤 貴裕, 三藤 久, 久保田 勝, 村雲 芳樹, 三枝 信, 猶木 克彦.
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性進行非小細胞肺癌におけるT790M組織再生検陰性、血漿陽性患者のオシメルチニブ臨床効果.
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masuzawa K, Yasuda H, Hamamoto J, Hirano T, Nukaga S, Kawada I, Naoki K, Soejima K, Betsuyaku T.
2. 発表標題 Characterization of the Efficacies of Osimertinib and Nazartinib against Cells Expressing Epidermal Growth Factor Receptor Mutations.
3. 学会等名 The IASLC 18th World Conference on Lung Cancer. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林慧悟, 猶木克彦, 眞鍋維志, 長谷川華子, 増澤啓太, 平野俊之, 額賀重成, 西野誠, 安田浩之, 川田一郎, 副島研造, 別役智子
2. 発表標題 EGFR-TKI耐性肺癌での組織再生検とliquid biopsyによるT790M変異検出の比較
3. 学会等名 第40回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増澤啓太, 安田浩之, 小林慧悟, 眞鍋維志, 長谷川華子, 平野俊之, 額賀重成, 西野誠, 川田一郎, 猶木克彦, 副島研造, 別役智子
2. 発表標題 当院におけるEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対するre-biopsyの検討
3. 学会等名 第40回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞鍋維志, 猶木克彦, 小林慧悟, 長谷川華子, 増澤啓太, 安田浩之, 川田一郎, 副島研造, 別役智子
2. 発表標題 EGFR-TKI耐性化後の非小細胞肺癌における再生検の部位別陽性率及びOsimertinibの導入
3. 学会等名 第58回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞鍋維志, 猶木克彦, 小林慧悟, 増澤啓太, 長谷川華子, 安田浩之, 川田一郎, 副島研造, 別役智子
2. 発表標題 EGFR-TKI治療後の進行非小細胞肺癌に対する再生検とOsimertinibの導入.
3. 学会等名 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小林 慧悟 (Kobayashi Keigo)		
研究協力者	副島 研造 (Soejima Kenzo)		
研究協力者	井川 聡 (Igawa Satoshi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	福井 朋也 (Fukui Tomoya)		