

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08189

研究課題名(和文) 循環腫瘍細胞を用いたBIM遺伝子多型陽性肺癌の個別化治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of personalized treatment for BIM deletion polymorphism-positive lung cancer using circulating tumor cells

研究代表者

磯部 和順 (Isobe, Kazutoshi)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：70385607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌におけるオシメルチニブの奏効率と循環腫瘍細胞のBIM- のmRNA発現量の関連性を明らかにする目的で前向き研究をおこなった。循環腫瘍細胞はClearCell FXシステムを使用して回収し、定量的リアルタイムPCRを実施した。オシメルチニブの奏効率はBIM- 高発現群(n=15)はBIM- 低発現群(n=15)と比較して低かった(26% vs. 73.3%, p=0.011)ことから、EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者の循環腫瘍細胞中のBIM- のmRNAの過剰発現は、オシメルチニブの治療効果不良因子となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は血液検体を用いた確実なサンプリングに基づいた個別化治療のシステム構築を目的にしており、得られた結果はBIM- のmRNAの発現量を層別化因子とした原発性肺癌の個別化治療法の確立に大きく貢献するもので、本研究は非常に特色のある研究であると同時にその社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：A prospective study was conducted to clarify the relationship between the response rate of osimertinib in EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer and the mRNA expression level of BIM- in circulating tumor cells. Circulating tumor cells were harvested using the ClearCell FX system and subjected to quantitative real-time PCR. The response rate of osimertinib was lower in the BIM- high expression group (n=15) than in the BIM- low expression group (n=15) (26% vs. 73.3%, p=0.011). It was suggested that overexpression of BIM- mRNA in circulating tumor cells of patients with EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer could be a poor prognostic factor for osimertinib.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌 オシメルチニブ BIM- 循環腫瘍細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は、アジア人の EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌において、BCL2L11 (BIM) 遺伝子多型が EGFR-TKI の耐性に関与することを報告した (Ng KP, Isobe K, et al. Nat Med. 2012)。この遺伝子多型はヨーロッパ人やアフリカ人には認められず、東アジア人にのみに 12.3% の頻度で認められた。この BIM 遺伝子多型があると、BIM-EL,L,S とは異なり構造的に BH3 ドメインを持たない BIM- が発現することで EGFR-TKI に関連したアポトーシスが抑制的に働くことが報告されている。本研究に先立ち、我々は血液検体や切除組織で簡便に BIM 遺伝子多型を検出する PCR 法を開発した。本法を用いて当科で EGFR-TKI にて加療を行った EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者 70 例を対象とし、患者の末梢血液検体および FFPE 組織を用いて PCR 法で BIM 遺伝子多型を検索し、BIM 遺伝子多型陽性肺癌の臨床的特徴、EGFR-TKI の効果および副作用、予後を後ろ向きに検討した。結果、BIM 遺伝子多型は 13/70 例 (18.6%) に認められ、うち 1 例はホモ欠損で 12 例はヘテロ欠損であった。BIM 遺伝子多型陽性例は BIM 遺伝子多型陰性例と比較して EGFR-TKI の無増悪生存期間 (PFS) が短く、BIM 遺伝子多型は EGFR-TKI の PFS の独立した予後不良因子であった (Isobe K, et al. J. Thorac. Oncol. 2014)。BIM 遺伝子多型の有無が判明している EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の手術検体から、PCR 法にて mRNA レベルで BIM のアイソフォーム (BIMEL、BIML、BIMS、BIM-) を同定かつ定量化し、BIM の mRNA レベルでの発現と BIM 遺伝子多型の関連性を明らかにした。この結果、BIM 遺伝子多型陽性例の全例に腫瘍部または非腫瘍部に BIM- が発現しており、BIM 遺伝子多型陰性例に比べると有意に高頻度かつ相対定量値も高い傾向にあった。BIM- の発現陽性例では gefitinib の PFS は有意に短い傾向にあった。以上より EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌における BIM- の発現は gefitinib の予後不良因子である可能性が示唆された (Isobe K et al. Cancer Genomics & Proteomics 2016)。次に BIM と他のバイオマーカー (PD-L1 と BIM、HER2、MET、VEGF-A、PUMA、EGFR) の mRNA の発現との関連性について検討したところ、腫瘍部の BIM の mRNA の発現は PD-L1 の mRNA の発現と有意な正の相関が認められた。現在、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の耐性遺伝子 T790M を検出する低侵襲性検査として血漿遊離 DNA (cfDNA) が用いられているが、臨床的に満足する結果は得られていない。元来、循環腫瘍細胞 (CTC) は肺癌での検出は困難であったが、我々は EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の循環腫瘍細胞と血清中の EGFR 遺伝子変異検出率が相関することを報告している (Isobe K, et al. Anticancer Res. 2012)。しかしながら、十分量の CTC を取得することができなかったことより、その相関性は実臨床に応用できるほどの結果は得られていない。近年、ClearCell FX System が開発され、従来の Cell Search system では困難であった微量な CTC をラベルフリーで抽出できるようになり、肺癌のバイオマーカー検出に有用であると報告されている (Jen Fraser-Fish et, al. ESMO 2016)。CTC は cfDNA より多くの情報を得ることができ、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌におけるバイオマーカー探索及び実臨床への応用が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、基盤研究 (C) 15K09195 「BIM 遺伝子多型を層別化因子とした原発性肺癌の個別化治療法の確立」という課題からさらに研究を発展させ、血液検体を用いて新しい BIM 遺伝子多型の診断方法や治療方法が臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における CTC 中 BIM- の mRNA 発現量と BIM 遺伝子多型

と臨床情報および EGFR-TKI の ORR や PFS との相関性を検討する。

EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における CTC 中の BIM- と予後予測因子(PD-L1, HER2, MET, VEGFRA, PUMA)と mRNA の発現量を比較検討する。

抽出された CTC 数と EGFR-TKI の奏効率 (ORR) や無増悪生存期間 (PFS) との相関性を検討する。

CTC 中の EGFR 感受性変異および EGFR-TKI 耐性遺伝子 (T790M、C797S) の DNA 発現率を検討する。

CTC と cfDNA からの BIM- と予後予測因子(PD-L1, HER2, MET, VEGFRA, PUMA)と mRNA の発現量と EGFR 感受性変異および EGFR-TKI 耐性遺伝子 (T790M、EGFR C797S) の DNA 発現率をそれぞれ比較し、臨床的な有用性について検討を行う。

3 . 研究の方法

本研究ではオシメルチニブで治療されたEGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者30例を対象とし以下の項目とオシメルチニブの治療効果との関連性を前向きに検討を行なった。

CTCの抽出：全血10mlより血球成分のみを抽出し、CTC濃縮器 (ClearCell FX system) をラベルフリーのCTCを採取する。またCTC数のカウントを行う。 CTCからのmRNA、DNAの抽出：QIAamp DNA Micro KitにてDNAを、RNeasy Micro KitにてmRNAを抽出する。 cfDNAの抽出：血球成分を除去した全血10 mL中からQIAamp circulating nucleic acid kitを用いてmRNA及びcfDNAを抽出する。 mRNAからバイオマーカーの検出：抽出したmRNAからBIM、PD-L1, HER2, MET, VEGFRA, PUMA, EGFR, BIM-EL,L,Sを Real-time PCR法を用いて発現を検証する相対定量を実施する。KCL22細胞株、HCC827細胞株をcalibratorとして相対定量値を算出する。 DNAからBIM遺伝子多型および耐性遺伝子の検出：抽出したDNAからはEGFR感受性変異、T790MはCobas EGFR mutation test ver.2で、C797SはDirect Sequence法で検出する。

4 . 研究成果

オシメルチニブを投与されている EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者の CTC における BIM- に関連する推定予後因子の関連を前向きに調査した。 EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC の CTC における BIM- 発現は、オシメルチニブ療法後の ORR と有意に関連をみとめた。本研究でのオシメルチニブの ORR は 60%、病勢制御率 (DCR) は 90%、PFS の中央値は 14.0 か月でした。 FLAURA 試験の日本のサブセットでは、オシメルチニブ群の PFS は 19.1 か月、ORR は 75.4%であると報告されており、本研究の ORR は FLAURA 試験の報告よりも低く、PFS は短かった。 EGFR-TKI 治療抵抗性は、EGFR 遺伝子変異陽性の非腺癌で報告されているが、本研究には、扁平上皮癌の 2 人の患者が含まれたことが影響した可能性がある。

CTC は組織生検の代替手段の可能性があり、ClearCell FX システムは臨床的に重要な CTC を検出する上で有用であり、本研究では、CTC はすべての患者で検出可能であった。 CTC 陽性患者におけるオシメルチニブの PFS は、CTC が 10 / 7.5 mL を超えるグループ (n = 15) と CTC が 10 / 7.5 mL 未満のグループ (n = 15) の間で有意差はなかった。また、切除標本に関する以前の研究では、BIM アイソフォームでの BIM- mRNA の過剰発現が TKI 関連のアポトーシスを抑制することが報告されている。 1 つの仮説は、BIM 欠失多型自体が EGFR-TKI に対する相対的な耐性を提供するというものである。 CTC における BIM- 発現の相対値は、BIM 欠失多型のない患者よりもある患者の方が高い傾向があった。癌細胞は BIM タンパク質濃度の小さな変化に敏感であり、BIM タンパク質濃度はアポトーシスの程度と TKI 耐性に用量依存的な影響を与えることが報告されている。 BIM- の高発現の患者のオシメルチニブ奏効率が低発現の患者よりも有意に

低いことを示した（それぞれ 26.6%対 73.3%； $p = 0.011$ ）。今後の研究では、組織と循環腫瘍細胞の BIM- mRNA 発現との関連を調査する必要がある。この研究では、中央値を使用して、BIM- mRNA 発現を高低に分類しました（各 15 人の患者）。PFS に基づく ROC 曲線を使用して BIM- 式の最適なカットオフ値を分析すると、0.073 のカットオフ値が得られた（曲線下の ROC 領域、0.7844； $P = 0.0007$ ）。このカットオフ値は、CTC での BIM- 発現の中央値なので、CTC での BIM- 発現に新しいカットオフ値を設定する必要はないと考えられた。

CTC は、肺癌のバイオマーカーの検出に有望である。この研究では、血漿細胞遊離 RNA での BIM- 発現と CTC での BIM- 発現は有意に正の相関を認めた（ $r = 0.433$ 、 $P = 0.017$ ）。ただし、オシメルチニブの奏効率も PFS も、血漿サンプルからの細胞遊離 RNA で BIM- の発現が高い患者と低い患者の間で有意差は認めなかった。したがって、CTC での BIM- の発現は、オシメルチニブに対する奏効率の予測に役立つ可能性がある。ただし、将来の研究では、この可能性を調査するために、より大きなサンプルが必要になると考えられた。

この研究の限界は、対象症例の組織発現が BIM 免疫染色によって確認されなかったことである。もう一つの制限は、ClearCell FX システムを使用して CTC を収集することは、臨床診療では一般的ではなく、費用がかかりすぎて臨床使用が難しいことである。この研究では、オシメルチニブの PFS は、BIM- 発現（ $p = 0.13$ ）または BIM-EL / L / S、PD-L1、PUMA、HER2、VEGFR、EGFR、および MET の高発現群と低発現群の間で PFS に有意差は認めませんでした。本研究の観察期間は短すぎた可能性がある。また、この研究はサンプルサイズが小さい単一施設の研究であったため、結果を検証するには大規模な多施設研究が必要である。本研究の結論として、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者の CTC における BIM- mRNA の過剰発現は、オシメルチニブに対する効果不良予測のバイオマーカーとして役立つ可能性があることが考えられた。

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 2件）

1. 著者名 Nakano Y, Isobe K, Kobayashi H, Kaburaki K, Isshiki T, Sakamoto S, Takai Y, Tochigi N, Mikami T, Iyoda A, Homma S, Kishi K.	4. 巻 56
2. 論文標題 Clinical importance of long non coding RNA LINC00460 expression in EGFR mutant lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 243-257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4919.	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 Isobe K, Issiki T, Sakamoto S, Sano G, Takai Y, Tochigi N, Homma S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical importance of Bcl-2-like 11 deletion polymorphism in idiopathic pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Dis.	6. 最初と最後の頁 2981-2989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jtd.2019.07.25.	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 Isobe K, Yoshizawa T, Sekiya M, Miyoshi S, Nakamura Y, Urabe N, Issiki T, Sakamoto S, Takai Y, Tomida T, Adachi-Akahane S, Iyoda A, Homma S, Kishi K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Quantification of BIM mRNA in circulating tumor cells of osimertinib-treated patients with EGFR mutation-positive lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resinv.2021.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kazutoshi Isobe, Yuta Nakano, Hiroshi Kobayashi, Kyohei Kaburaki, Go Sano, Susumu Sakamoto, Yujiro Takai, Naobumi Tochigi, Tetsuo Mikami, Akira Iyoda and Sakae Homma
2. 発表標題 Clinical Importance of Long Noncoding RNA LINC00460 Expression in Plasma Cell-Free Tumor RNA in EGFR-Mutant Adenocarcinoma
3. 学会等名 American society of clinical oncology 2019 annual meeting. (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 磯部和順、小林 紘、一色琢磨、坂本 晋、高井雄二郎、栃木直文、岸 一馬
2. 発表標題 EGFR変異陽性肺腺癌における血漿遊離DNA中の長鎖非コードRNA発現の検討
3. 学会等名 日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Isobe K, Kakimoto A, Kaburaki K, Kobayashi H, Sano G, Sakamoto S, Takai Y, Tochigi N, Mikami T, Iyoda A, Homma H
2. 発表標題 Quantification of PD-L1 mRNA Expression in EGFR-mutant Lung Adenocarcinoma
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (ESMO) 2018 Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakano Y, Isobe K, Kakimoto A, Kobayashi H, Kaburaki K, Sano G, Sakamoto S, Takai Y, Tochigi N, Mikami T, Iyoda A, Homma S
2. 発表標題 Survival Effect of Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 460 Expression in EGFR-Mutant Adenocarcinoma.
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (ESMO) 2018 Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯部和順、一色琢磨、鍋木教平、卜部尚久、伊藤貴文、澤田哲郎、佐野 剛、坂本 晋、高井雄二郎、栃木直文、本間 栄
2. 発表標題 特発性肺線維症におけるBCLL2L11遺伝子多型とレドックスの検討.
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 磯部和順、楠木教平、小林 紘、中野雄太、佐野 剛、坂本 晋、高井雄二郎、柿本篤志、栃木直文、本間 栄
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌における血漿遊離DNA中のBIMmRNA発現の検討
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------