

研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20790569  
研究課題名(和文) 非小細胞肺癌のEGFR阻害剤に対する感受性予測法 QUEEN アッセイの臨床開発  
研究課題名(英文) Clinical development of QUEEN assay, a novel biomarker for predicting the sensitivity of non small cell lung cancer to epidermal growth factor receptor inhibitors  
研究代表者 柿内 聡司 (KAKIUCHI SOJI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号：50380100

研究成果の概要(和文)：我々はDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析によって非小細胞肺癌の上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブに対する感受性予測の可能性を報告している(S kakiuchi, et al, Hum Mol Genet. 2004)。さらに臨床応用を目指して Real time RT-PCR をもちいたより簡便なシステム (Quantitative RT-PCR evaluating EGFR-TKI efficacy of NSCLC:QUEEN) を開発中である。本システムはレトロスペクティブな検討で高い正確性が認められ、無増悪期間、全生存期間とも相関が認められており、患者選択に資するバイオマーカーとして有用性が示唆されている。しかし、2008年同効薬であるエルロチニブが本邦で新たに承認され、再発非小細胞肺癌の標準的治療薬として使用されるようになった。

本研究では、エルロチニブの感受性予測における本システムの有用性を評価することを目的とする。現時点では症例集積中であるがエルロチニブで治療された非小細胞肺癌の85.7%(12/14)の症例で Best overall response を正しく予測され、本システムの有用性が示唆された。現在も症例の集積を継続するとともに、無増悪期間、全生存期間との関連を検証している。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), has shown a favorable anti-tumor activity to a subset of patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). By DNA microarray analyses, we previously identified twelve gefitinib-resistance related genes differentially expressed between responders and non-responders to EGFR-TKI (S kakiuchi, et al, Hum Mol Genet. 2004) . We developed a useful gefitinib-efficacy prediction system by measuring the expression levels of these genes using quantitative RT-PCR. The prediction score assessed by this system closely correlated with the outcome of the patients with advanced NSCLC treated with gefitinib, in terms of the responses, time to progression, and survival duration. However, erlotinib, a novel EGFR-TKI, has approved in 2008, and has been used as a standard therapy for the previous treated NSCLC patients. In this study, we evaluated the sensitivity of NSCLC to erlotinib by this system before the initiation of the treatment, in order to confirm the accuracy and efficacy of this prediction system. Although this study has not finished yet, the accuracy is reached to 85.7%(12/14) on prediction of best overall response, suggesting that this system may be a clinical useful predictive marker for EGR-TKI treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
2009年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000円	840,000円	3,640,000円

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：上皮成長因子受容体、バイオマーカー、感受性予測

### 1. 研究開始当初の背景

**EGFR** チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブは進行非小細胞肺癌の一部の症例に対して劇的な臨床効果が認められる。しかしその一方で、患者選択を行わなかった場合プラセボと比較し有意な生存期間の延長が認められないことが示され、治療前に本薬剤の有効性を予測できるバイオマーカーの同定が急務となっている。

**EGFR** チロシンキナーゼ阻害剤の感受性予測因子としては、2004年、PaezらおよびLynchらより、著効例でEGFR遺伝子に体細胞変異が高率に検出されることが報告された。しかしながら予後延長効果が期待できる長期SD (stable disease)症例ではEGFR変異が検出されないこと、遺伝子変異の有無と無増悪期間(Progression free survival: PFS)、全生存期間(Overall survival: OS)との相関については相反する報告があることから、国内外において患者選択に資するEGFR阻害剤の効果および予後予測因子を探索する多くの研究が引き続き行われている。

我々は、文部科学省のミレニアムプロジェクトの一環である「総合がん・疾患遺伝子プロジェクト」の疾患遺伝子薬剤反応性研究において、cDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析によってゲフィチニブに対する感受性と相関する遺伝子群を同定し、これらの中の12遺伝子の発現パターンに基づいた独自のゲフィチニブ感受性予測システムを確立した(Kakiuchi S, et al, Hum Mol Genet 2004)。さらに、cDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析は非常に煩雑でありその迅速性において臨床応用は困難であることから、臨床での実用化を目指して、real time RT-PCRを用いた、より迅速で簡便なゲフィチニブ感受性予測システム **QUEEN** (Quantitative RT-PCR evaluating

### EGFR-TKI efficacy of NSCLC:QUEEN) assay を確立し報告した。

この **QUEEN assay** では92.7%と高い精度で感受性が予測でき、感受性予測スコアでゲフィチニブで治療を受けた非小細胞肺癌患者の無増悪期間、生存期間とも有意な相関を認めた。

### 2. 研究の目的

real time RT-PCRを用いた上皮成長因子受容体阻害剤の感受性予測法(QUEEN)の有用性を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

“QUEEN score 陽性非小細胞肺癌を対象とした上皮成長因子受容体阻害剤のプロスペクティブ試験”にてreal time RT-PCRを用いた上皮成長因子受容体阻害剤の感受性予測法の有用性を検証した。

本試験の主要目的はQUEENスコア陽性の再発非小細胞肺癌患者の上皮成長因子受容体阻害剤の奏効率を推定することで、QUEENスコア陽性患者の病勢コントロール率、無増悪期間、全生存期間および安全性、およびQUEENスコアによる効果予測の感度、特異度、正確度を評価することを副次的目的とした。

対象はQUEENスコア陽性の再発非小細胞肺癌患者(ⅢB・Ⅳ期で化学療法後再発、または手術後再発、20歳以上、Performance Status 0~2、RECISTで評価可能な病変を有するなどの条件を満たす症例)で、試験治療方法は、ゲフィチニブ(イレッサ錠250)を250mg/錠を1日1回連日投与とした。

QUEENスコア陽性の患者におけるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤の期待奏効率を70%、閾値病勢コントロール率を30%とし、 $\alpha$ エラー片側0.05、 $\beta$ エラー0.1以下の条件で、症例数は16例を予定していた。以前当大学で行ったレト

ロスペクティブな検討結果より、進行性非小細胞肺癌患者のうち QUEEN スコア陽性患者の割合は約 40%であると考えられることから、必要なスクリーニング症例数は約 40 例となった。

QUEEN スコアの算出は下記の方法で行った。

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤による治療開始前に採取し O.C.T compound に包埋後 -80°C で凍結保存された検体 (腫瘍組織) から、マイクロダイセクション装置 EZ cut (MMI AG 製) を用いたレーザーマイクロビームマイクロダイセクション (LMM) 法により癌細胞のみを選択的に回収し、回収した癌細胞から mRNA を抽出し、real time RT-PCR (Applied biosystems 製 PRISM 7700 sequence detector) によって、cDNA マイクロアレイ法により同定された EGFR チロシンキナーゼ阻害剤抵抗性関連 12 遺伝子の相対的発現量を取得する。その際、comparative Ct 法により測定間誤差を補正する。Weighted Vote 法、leave one out validation 法によりすでに構築している感受性予測システムを用いて real time RT-PCR で得られた各症例の遺伝子発現プロファイルデータをこの感受性予測システムに入力することによって、遺伝子発現プロファイルを反映した QUEEN スコアを算出した。

臨床効果の評価は WHO の効果判定基準 RECIST に従う。奏効率、病勢コントロール率、無増悪期間、全生存期間などを算出し評価する。また有害事象については NCI-CTC ver. 3.0 日本語訳 JCOG 版により重症度を評価し Grade 別発現率等を算出した。

QUEEN スコア陽性または陰性における腫瘍縮小効果をもとに、QUEEN スコアの感度、特異度を求め、ROC 曲線等により効果予測の精度の検討を予定している。

#### 4. 研究成果

本研究計画時には本邦ではゲフィチニブが唯一使用可能な上皮成長因子受容体阻害剤であったが、2008 年同効薬であるエルロチニブが新たに承認され、再発非小細胞肺癌の標準的治療薬として使用されるようになった。このような経緯から研究計画を修正し、本法にてゲフィチニブと同様にエルロチニブの感受性予測が可能であるか検証した。現時点で 85.7%(12/14) の症例で **Best overall response** を正しく予測され、本システムの有用性が示唆されている。現在も症例の集積を継続するとともに、無増悪期間、全生存期間との関連を検証している。

#### 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 6 件)

1. Yano S, Wang W, Li Q, Matsumoto K, Sakurama H, Nakamura T, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Nishioka Y, Uehara H, Mitsudomi T, Yatabe Y, Nakamura T, Sone S. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. Cancer Res. 査読あり 2008 Nov 15;68(22):9479-87
2. 荻野広和、柿内聡司、矢野聖二、曾根三郎 : 非小細胞肺癌治療における EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬—現状と今後の課題— Medical Practice 査読なし 25(1): 135-139, 2008
3. 柿内聡司、曾根三郎 : 肺癌: 遺伝子発現パターンによるゲフィチニブ感受性予測. 分子呼吸器病 査読なし 12(2):37-42, 2008
4. 柿内聡司、曾根三郎 : 薬剤感受性予測バイオマーカー. 医学のあゆみ 査読なし 224(13): 1165-1170, 2008
5. 柿内聡司、曾根三郎 : 網羅的遺伝子発現解析と EGFR-TK 阻害剤の感受性. 呼吸器科 査読なし 13(3): 263-268, 2008
6. 柿内聡司、曾根三郎 : 肺癌—基礎・臨床研究のアップデート—免疫・基礎研究 IV. 新しい治療法の開発 DNA マイクロアレイを用いた個別医療. 日本臨床 査読なし 66(増 6):180-187, 2008

[学会発表] (計 1 件)

Predictive Value of Gene Expression and EGFR mutation for Clinical Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitor in NSCLC  
柿内 聡司、矢野 聖二、埴淵 昌毅、西岡 安彦、近藤 和也、富田 章弘、中村 祐輔、鶴尾 隆、曾根 三郎  
第 67 回日本癌学会学術総会 (2008 年 10 月 29 日)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿内 聡司（KAKIUCHI SOJI）  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号：50380100

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者