

機関番号：84409

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20890299

研究課題名（和文） 微小遺伝子変異の高感度検出によるゲフィチニブ耐性予測

研究課題名（英文） Detection of T790M Gefitinib Resistance Mutation in EGFR using the BEAMing method

研究代表者 谷口 一也 (Kazuya Taniguchi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター（研究所）・

研究所・研究員

研究者番号：70463289

研究成果の概要（和文）：抗癌剤耐性は癌治療における最大の問題であるが、大多数の抗癌剤ではそのメカニズムはわかっていない。そのような背景の中でも分子標的薬であるゲフィチニブは作用機序が明確であり、その耐性メカニズムの一部も明らかになっている。その一例として T790M 耐性変異があげられる。EGFR 遺伝子に活性化変異があるとゲフィチニブが奏効するが、さらに T790M 変異があると耐性になるのである。ゲフィチニブ耐性症例の約半数で EGFR の T790M 変異が確認されているが、抗癌剤投与前の原発巣ではほとんど検出されていない。この T790M 変異は原発巣にすでに少数混在していることが理論的に予測されており、原発巣や治療中に増殖した CTC (circulating tumor cell) 中の T790M 変異細胞を検出することができれば、耐性出現を予測できる。本研究では、高感度 (<1/10,000) の変異検出法 (BEAMing) を用いたゲフィチニブ耐性予測法を確立し、その臨床的有用性を検討した。

検出手法としては次世代シーケンスの基盤技術にも用いられているエマルジョン PCR を基にしている BEAMing を用いた。BEAMing の変異検出のプロープに関して蛍光標識 LNA (locked nucleic acid) を新たに用いるなど T790M 検出用に改良し、1/10000 の感度で T790M 耐性変異を検出することに成功した。

非小細胞肺癌 263 例の活性化変異の解析を行い、exon19 における small deletion⁴⁵ 症例、L858R point mutation⁵² 症例など 112 症例に活性化変異が同定された。BEAMing により T790M 耐性変異を解析したところ 20 症例に T790M が同定され、そのうち活性化変異を持つ症例は 15 症例であった。原発巣の T790M 耐性変異の有無によるゲフィチニブ投与後の予後に有意差は認められなかった。T790M 耐性変異のほとんどが原発巣においては 1%未満の存在割合であり、抗癌剤の初期応答に関しては影響しないものと考えられた。

本研究により遺伝子変異を高感度に検出する BEAMing の改良に成功した。この技術は血液中の遺伝子変異の測定など、大いに役立つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs), such as gefitinib or erlotinib, are effective therapies for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with primary EGFR mutations. However, most patients who initially respond to treatment with these drugs will develop resistance to EGFR TKIs. A secondary EGFR T790M mutation is reported to correlate with acquired resistance. We examined the T790M mutation in primary tumors with BEAMing (beads, emulsion, amplification, magnetic), which is the most sensitive technique to detect minor mutated alleles. Currently, we can detect point mutation at the level of 1/10,000 using an improved version of the BEAMing. We detected T790M mutant alleles in NSCLCs in 20 out of 270 NSCLCs with primary EGFR mutations. The detection of small fraction of T790M mutant alleles may be useful for predicting resistance of NSCLCs to TKIs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態検査学

キーワード：(1)非小細胞肺癌、(2)ゲフィチニブ、(3)EGFR、(4)抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

ゲフィチニブは2002年に世界に先駆けて日本で承認、販売された進行非小細胞肺癌に対する分子標的薬である。しかしながら抗腫瘍効果は患者間で大きく異なっており、患者を区別する因子の同定が望まれていた。これについて、2004年に非小細胞肺癌におけるEGFR遺伝子変異があるとゲフィチニブが奏功するという報告があり、その後の追試でも確認された。現在では、EGFR遺伝子変異がゲフィチニブの効果予測因子として有効であることが確認され、保険適用が可能となっている。EGFR遺伝子変異を持つ症例では効果が高いゲフィチニブであるが、従来の抗癌剤と同様に治療を続けると耐性が生じる。代表的な耐性メカニズムはT790M（スレオニンからメチオニンへの変異）の二次変異である。T790M変異は*in vivo*の実験でゲフィチニブ、エルロチニブに耐性となることが確認されている。また、T790M耐性変異はゲフィチニ

ブ投与後の約半数の症例から検出されているが、原発巣からはほとんど検出されていない。このT790M変異は原発巣にすでに少数混在していることが理論的に予測されており、原発巣や治療中に増殖したCTC (circulating tumor cell)中のT790M変異細胞を検出することができれば、耐性出現を予測できる。

2. 研究の目的

本研究では、高感度 (<1/10,000) の変異検出法 (BEAMing) を用いたゲフィチニブ耐性予測法を確立し、その臨床的有用性を検討する。

3. 研究の方法

1) 材料及び変異同定

大阪府立成人病センターにおいて外科切除された肺癌組織検体 263 症例から genome DNA 及び RNA を抽出し、EGFR の代表的な変異 (exon19 欠失変異、点変異 (L858R、G719A、

L861Q、T790M)) を調べた。

2-1) BEAMing

次に、ゲノム DNA を用いて EGFR の耐性変異を含む領域を PCR により増幅し (primer 1; 5'-tccccgcaaattaatacagcagcatctgcctcacc tccac-3', primer 2; 5'-gctggagctctgcagctatgcctccttctgcatggtat -3')、BEAMing (beads, emulsions, amplification, magnetics) を用いて T790M 耐性変異を高感度で調べた (Fig. 1)。

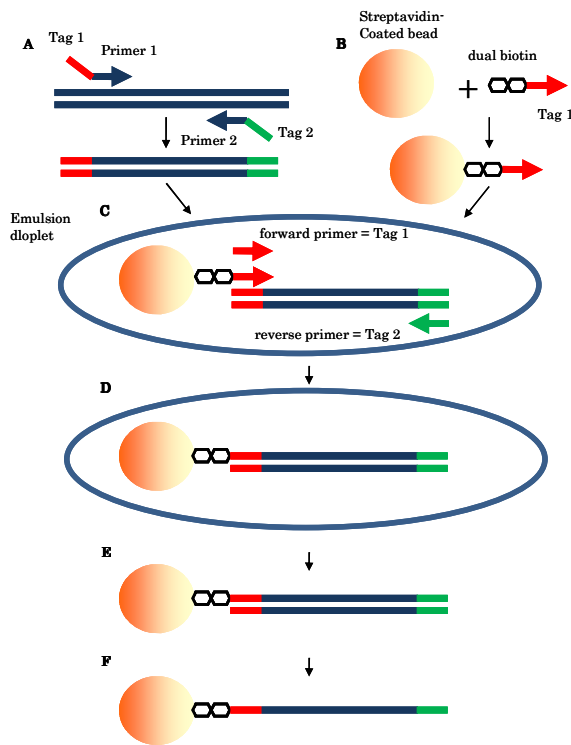


Fig. 1: BEAMing の概要。(A) 目的領域の PCR による増幅。(B) dual biotinylated probe のビーズへの結合。(C) エマルジョンの生成。一つの水滴の中にビーズが一つ、標的遺伝子が一つとなるよう濃度が調整してある。(D) エマルジョン PCR。水滴中で通常の PCR を行い、一つの遺伝子由来の DNA をビーズ表面上で増幅させた。(E) エマルジョンの崩壊。(F) 一本鎖 DNA の生成。ビーズ懸濁液をアルカリ性にする事で DNA を一本鎖とし、ビーズに結合していない DNA 鎖を取り除いた。

2-2) BEAMing の検出

ビーズに結合した DNA の標的部位に対して配列特異的ハイブリダイゼーション (allele specific hybridization, ASH) 法で異なる蛍光 (Alexa647、Alexa488) を標識し、フローサイトメーターで検出した。ASH 法はミスマッチの状態でも数多くのプローブがハイブリダイズすると考えられる。そこでプロ

ーブの標的部位に相補鎖認識能を向上させる locked nucleic acid (LNA) を用いた。

2-3) DNA 及び LNA における T_m 値測定

DNA と LNA の相補差認識能の比較を行うため、それぞれ fullmatch 配列と mismatch 配列での融解温度 (T_m 値) を UV1650PC/TMSPC-8 (島津) を用いて測定した。

4. 研究成果

1) LNA を用いた ASH 法

本研究では、プローブの配列認識部位に LNA を用いた。LNA は糖部コンフォメーションを N 型に固定することで二重鎖形成能を大きく向上させた人工核酸アナログである。しかし今回用いるプローブはその 5' 末端に分子量 600 程度の異なる蛍光基が標識されているため、その立体障害から配列認識能が低下する可能性がある。そこで、fullmatch 配列と mismatch 配列での融解温度 (T_m) を測定しその差から LNA 導入による配列認識能効果について評価した。 T_m 値測定の結果 LNA における T_m 値の差 ΔT_{LNA} と DNA における ΔT_{DNA} では 1.000°C の差が確認された。よって LNA が導入されたプローブは蛍光基が修飾された場合でも配列認識能を向上させることが明らかとなった。

2) 測定精度の評価

BEAMing の感度について評価するため T790M mutant-type 100%、10%、1%、0.1%、0.01%、0% の template DNA を用いて BEAMing を行った。それぞれ 10 回ずつ測定し、その測定係数から標準偏差を算出することで BEAMing における定量性を評価した。その結果、0.01% と微小な変異を検出する時でも高い定量性を保ち測定が可能であることが明らかとなった。

3-1) 活性化変異及び耐性変異の検出

肺癌原発巣 263 症例に対してダイレクトシークエンス、又は SNaPshot 反応により EGFR 遺伝子の代表的な変異 (欠失変異、点変異 (L858R、G719A、L861Q、T790M)) を調べた。解析結果の内訳は、欠失変異 52 症例 (19.7%)、点変異 63 症例 (24.0%) (L858R 57 症例 (21.7%)、G719A 3 症例 (1.1%)、L861Q 1 症例 (0.4%)、L858R + T790M 1 症例 (0.4%)) であった。尚、T790M 変異が検出された症例では同時に L858R 変異も確認された。その他の症例は全て単一の変異であった。次に、これらの症例に対して BEAMing を用いて T790M 変異の検出を行った。その解析例を Fig. 2 に示す。赤点で示されているビーズは wild-type ビーズ、青点で示されているビーズは mutant-type ビーズである。このビーズの個数をそれぞれ算出し、mutant-type ビーズの割合が 0.015% 以上になるものを positive とした。sample 48 と sample 192

の mutant-type の割合がそれぞれ 0.0016%、0.0037% となり negative、sample 141 と sample 306 がそれぞれ 0.5270%、0.0273% となり positive である。

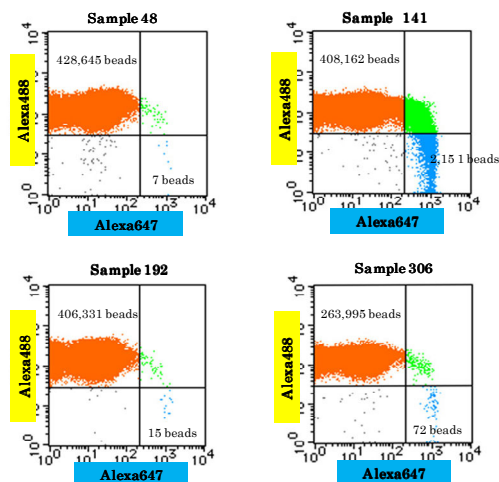


Fig. 2: 肺癌組織検体からの BEAMing 解析例。BEAMing によって T790M 変異を解析した 4 症例の解析結果を示す。赤点で示されているビーズは wild-type 由来のビーズを示し、青点で示されているビーズは mutant-type 由来のビーズを示している。ビーズの下に示した数字はそれぞれの区画のビーズの個数を示しており、この個数から mutant-type の割合を算出している。

3-2) 耐性変異の存在割合

全 263 症例の解析結果を Table 1 に示す。BEAMing 法により検出を試みた全 263 症例中 20 症例 (7.6%) に T790M 変異を検出した。肺癌の組織別に見ると、腺癌 244 症例中 20 症例 (8.2%)、扁平上皮癌 12 症例中 0 症例 (0%)、大細胞癌 4 症例中 0 症例 (0%)、小細胞癌 3 症例中 0 症例 (0%) に検出され、腺癌でのみ T790M 変異が確認された。さらに活性化変異の結果と照らし合わせると、活性化変異が確認された症例で 112 症例中 15 症例 (13.4%)、活性化変異が確認されなかった症例で 151 症例中 5 症例 (3.3%) で T790M が検出された。

Table. 1: 肺癌臨床検体における BEAMing による解析結果。A では組織学的分類による結果を示し、B では活性化変異別の結果を示した。

A	T790M			
	Histology	Yes	No	total %
Adeno	20	224	244	8.2
Small cell	0	3	3	0.0
Squamous	0	12	12	0.0
Large	0	4	4	0.0
total	20	243	263	7.6

B	EGFR	T790M		
	mutation states	Yes	No	total %
	mutation present	15	97	112 13.4
	deletion	6	45	51 11.8
	point mutation	9	52	61 14.8
	L858R	8	49	57 14.0
	L858R+T790M	1	0	1 100.0
	L861Q	0	1	1 0.0
	G719A	0	3	3 0.0
	mutation absent	5	146	151 3.3
	total	20	243	263 7.6

4) 考察

原発巣の T790M 耐性変異の有無によるゲフィチニブ投与後の予後に有意差は認められなかった。T790M 耐性変異のほとんどが原発巣においては 1%未満の存在割合であり、抗癌剤の初期応答に関しては影響しないものと考えられた。

本研究により遺伝子変異を高感度に検出する BEAMing の改良に成功した。この技術は血液中の遺伝子変異の測定など、大いに役立つものと考えられる。

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 1 件)

Taniguchi K, Okami J, Kodama K, Higashiyama M, Kato K.

Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation to the response to gefitinib.

Cancer Sci. 2008 May;99(5):929-35.

[学会発表] (計 7 件)

1) 第 68 回日本癌学会学術総会 (2009 年 10 月 1 日、横浜)

Detection of EGFR Gene T790M mutation in Non-Small Cell Lung Cancer using an improved version of the BEAMing technology.

Kimiyoshi Nishitani, Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Ken Kodama, Masahiko Higashiyama, kikuya kato.

2) 第 13 回世界肺癌学会 (2009 年 7 月 31 日、サンフランシスコ)

Intratumor heterogeneity of epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer and its correlation of response to gefitinib.

Jiro Okami, Kazuya Taniguchi, Masahiko Higashiyama, Jun Maeda, Kazuyuki Oda,

Naoki Orita, Kyoko Koizumi, Ken Kodama,
Kikuya Kato.

3)第 100 回米国癌学会総会 (2009 年 4 月 18
日、デンバー)

Genetic and epigenetic aberrations in
human multiple hepatocellular carcinoma
Kazuya Taniguchi, Terumasa Yamada, Yo
Sasaki, Kikuya Kato.

4)第 67 回日本癌学会学術総会 (2008 年 10 月
28 日、名古屋)

Evaluation of BEAMing, a sensitive method
for mutation detection,
and application for diagnosis of drug
resistance

Moriyama Satomi, Kazuya Taniguchi, Jiro
Okami, Ken Kodama, Masahiko Higashiyama,
Kikuya Kato.

5)第 67 回日本癌学会学術総会 (2008 年 10 月
28 日、名古屋)

Epigenetic and genetic analysis of
multiple hepatocellular carcinoma.

Kazuya Taniguchi, Kenya Tabuchi, Kazunori
Maekawa, Terumasa Yamada, Yo Sasaki, and
Kikuya Kato.

6)第 28 回分子腫瘍マーカー研究会 (2008 年
10 月 27 日、名古屋)

肺癌における EGFR 遺伝子変異の組織内多様
性とその抗癌剤感受性への影響。

谷口一也、岡見次郎、東山聖彦、児玉憲、加
藤菊也。

7)第 99 回米国癌学会総会 (2008 年 4 月 16 日、
サンディエゴ)

Multipoint microsampling for analysis of
genetic heterogeneity within cancer
tissues.

Kazuya Taniguchi, Jiro Okami, Ken Kodama,
Masahiko Higashiyama and Kikuya Kato.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 一也 (Kazuya Taniguchi)

地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪府立成人病センター (研究所)・

研究所・研究員

研究者番号 : 70463289

(2) 研究分担者

特になし

(3) 連携研究者

特になし