

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07194

研究課題名（和文）がんゲノム検査で得られたゲノム情報の解析と薬効評価システムの構築

研究課題名（英文）Cancer comprehensive genomic analysis and establishment of drug efficacy assessment system

研究代表者

荒金 尚子（Aragane, Naoko）

佐賀大学・医学部・特任教授

研究者番号：20321846

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：がんゲノム検査に基づく薬効評価系樹立のため、ケースモデルとして原発不明癌症例のVariants of unknown significance (VUS) 解析を行った。遺伝子パネル検査の結果、高いアレル頻度のVUS、ERBB2 E401Gを検出した。E401G高発現細胞株での浸潤能の亢進を確認し、Molecular dynamicsシミュレーションでリガンド非依存性にEGFRと安定的ヘテロダイマーを形成する活性化型変異であることを見出した。患者組織より樹立したPDX、CTOSを用いた薬効評価でEGFR/Her2阻害剤であるアファチニブが効果を示した。今後はより迅速な系に改良していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2019年保険診療としてがんゲノム診療が臨床応用され、その検査頻度は増加傾向にある。しかし、薬剤到達率10%内外にとどまり、ほとんど患者さんはこの検査の恩恵を受けていないのが現状である。特に意義不明とされる遺伝子異常については解釈の範囲外にある。本研究では、がんゲノム診療で得られた情報を元に有効な治療薬の推奨を行う事を目的としている。種々の方法を用いて意義不明遺伝子異常の機能を明らかにし、薬剤有効性の評価を行い、効果が期待できる薬剤を選定する事ができた。この方法をより迅速に行うことができれば、がんゲノム検査を受けた患者さんに有益な結果報告を行い薬剤へのアクセス頻度を上げることができると考える。

研究成果の概要（英文）：We analyzed a variant of unknown significance (VUS) detected from a patient of carcinoma of unknown primary site as a pilot case. Using comprehensive genomic profiling, a VUS, ERBB2 E401G was detected with high allelic fraction. We confirmed the invasiveness of E401G overexpressing cell line, and also found stable heterodimer formation with EGFR in a ligand-independent manner using molecular dynamics simulation. PDX and CTOS established from the cancer tissue obtained from the patient were used for assessment of drug efficacy, and anti-cancer efficacy of afatinib, EGFR/Her2 dual inhibitor was shown. The more rapid assessment system is urgently needed in future.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：がんゲノム 病的意義不明変異 PDX CTOS Molecular dynamics

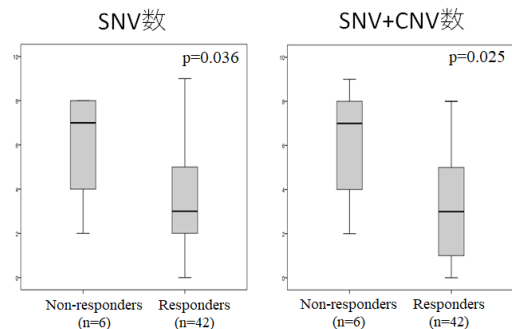
1. 研究開始当初の背景

我々は、2016年頃より次世代シーケンス (NGS) を用いたがんゲノム診療として自由診療、先進医療、臨床試験 (AMED 武藤班 “ゲノム医療の実装に資する臨床ゲノム情報統合データベースの整備と我が国の継続的なゲノム医療実施体制の構築”、PROFILE-F study、HER2 遺伝子増幅に対しトラスツマブ+ペルツマブ投与を行うバスケット試験など、種々の臨床試験を施行してきた。特に主導した 2 つの前向き臨床試験により以下の結果を得た。

1) 第 3 世代 EGFR-チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) 効果予測における血漿遊離腫瘍 DNA (ctDNA) の有用性についての研究 (S-PLAT 試験)

第 1, 2 世代 EGFR-TKI 既治療肺癌患者を対象とし、第 3 世代 EGFR-TKI オシメルチニブ投与前に ctDNA NGS を施行し、ゲノムプロファイルと治療効果との相関について検討した。遺伝子変異 (SNV)、遺伝子増幅 (CNV) を認めた遺伝子数の総和が多いとオシメルチニブの効果が低い事を示した (図 1、Sueoka-Aragane N, Cancer Med 2021)

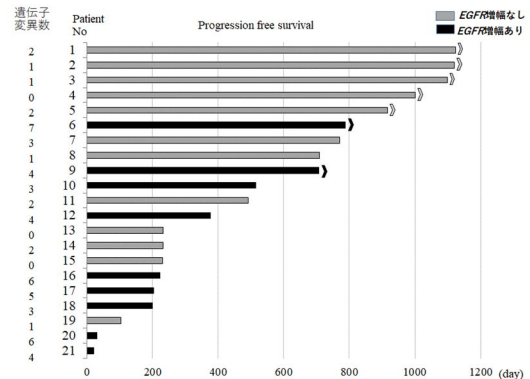
図 1 Variant数と薬効との相関



2) 非小細胞肺癌に対するアファチニブ投与症例における血漿を用いた獲得耐性機序に関する検討

未治療肺癌患者を対象とし、第 2 世代 EGFR-TKI アファチニブ投与前に ctDNA NGS を施行し治療効果との相関について検討した。EGFR 遺伝子増幅を認めた症例で有意に無増悪生存期間 (PFS) が短かった。EGFR 遺伝子増幅を認めず、他の遺伝子変異は 1 分子のみであった症例は奏効期間 1000 日を超える super-responder であった (図 2、Nakamura T, Cancer Sci 2023)

図2. EGFR増幅、遺伝子変異数とPFS



以上の結果より、分子標的薬などの薬効予測はドライバー遺伝子変異のみでは説明できず、ドライバー遺伝子増幅、他の遺伝子変異との共存によって修飾されていると推測される。さらに、現時点では病的意義不明の遺伝子変異 (VUS; variants of unknown significance) についても検討が必要と思われる。

2. 研究の目的

がんゲノム検査で種々の遺伝子変異を検出する事が可能になったが、現在は既知の遺伝子変異について文献検索で推奨薬剤を決定するにとどまっている。これまでの検討で、ドライバー遺伝子変異のみならず、共存する遺伝子変異を複合的に解析する事により、より正確な薬効予測の可能性について明らかにした。また、病的意義不明遺伝子変異 (VUS; variants of unknown significance) についてもがん進展に関与する事も明らかにした。

本研究は、実用化されたがんゲノム診療で得られたゲノム情報について、ドライバー遺伝子変異と共存する変異の種類、数と薬効予測、遺伝子増幅と薬効予測、VUSの生物学的意義と薬効予測について総合的に検討し、個々の症例について最適な治療選択を行う事を目的としている。

3. 研究の方法

1. がんゲノム情報収集（荒金、中村、中島）

本院でがんゲノム検査を施行した結果をがん種、喫煙状況、家族歴、治療経過など臨床情報と共にカルテベースで収集する。

VUSを含む全 variant の情報収集を行い、それぞれの allele fraction (AF)、病原性の有無について OncoKB, ClinVar, COSMIC などゲノム情報で再確認する。

全 variant の遺伝子、数、変異の種類 (SNV, Indel, CNV)、および somatic or germ line mutation の確認を行う。

2. *in silico* での VUS の病原性予測（原田；大学院生）

1. で得られた VUS については、複数の *in silico* 解析ツール (SIFT, PolyPhen2, PROVEAN など) を用いて病原性予測を行い、病原性の可能性が高い VUS を抽出する。AF が 30%以上の VUS について主に解析する。variant 間の関連 (同系統のシグナル、バイパス) をネットワーク解析する。

3. VUS 遺伝子導入、コピー数増加による生物学的解析（原田、佐藤）

VUS については、CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子導入する。その際、使用する細胞株は対象となる遺伝子発現が少ないものを選択する。

コピー数増加については、標的遺伝子変異を含むプラスミドを遺伝子導入し、発現量の異なる発現細胞株を樹立する。

遺伝子変異を含むコピー数増加については、コピー数増加を認める細胞株を選択し、CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子導入する。野生型と変異の割合で生物学的影響が変わる可能性を考慮し、digital PCR で測定し異なる割合の細胞株を樹立する。

上記 から の細胞株を用いて、細胞増殖、浸潤能、免疫不全マウスモデル (BRJ マウス; BALB/c Rag-2/Jak3 二重欠損マウス) を用いた転移能を評価する。

VUS を生じた遺伝子、変異のタイプよりいくつか候補薬剤を挙げ、上記細胞株を用いた増殖抑制試験を行う。

VUS を元に *in silico* のシミュレーションによる三次元解析を行い、さらに候補薬剤を絞り込む。

4. 患者腫瘍組織採取と Patient-derived xenograft (PDX) 樹立（佐藤、原田）

対象患者から本研究目的の組織採取について説明し、同意を取得する。

侵襲性の低い部位から組織採取、免疫不全マウスに皮下移植し PDX の系を作成する。

で作成した PDX よりがん細胞を分離し、培養系に供する。

5. PDX に対する薬効解析（佐藤、中島）

3. で挙げられた候補薬剤について、PDX から得られた培養細胞を用いて細胞増殖抑制、浸潤能抑制について検討する。

PDX を継代しマウスモデルで腫瘍縮小能を測定する系を樹立する。マウスモデルに

おいても、3. で挙げられた候補薬剤について抗腫瘍効果について検討する。

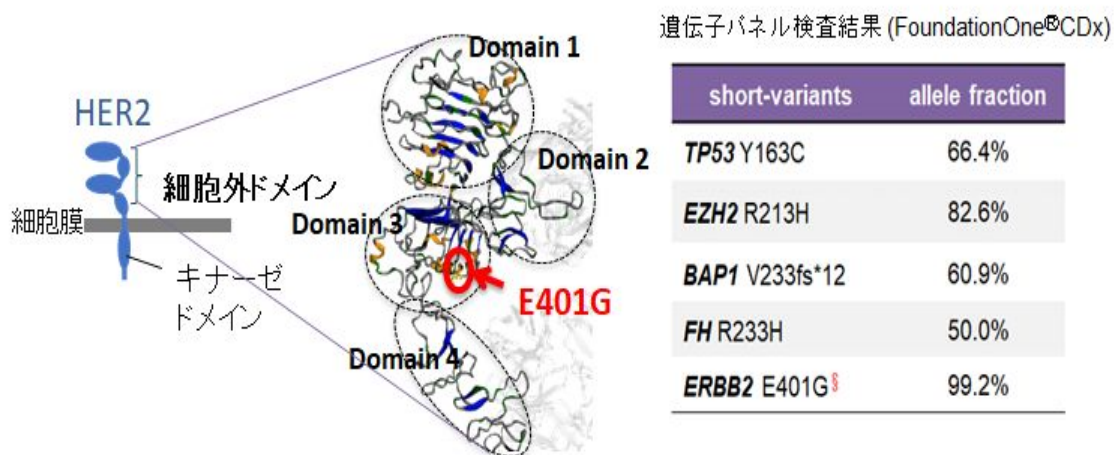
5. 候補薬剤のヒトへの投与（荒金、中村、中島）

適用外薬については、院内承認倫理委員会へ承認申請し、患者さんへの説明、同意が得られれば投薬する。また、その効果について評価し、上記の *in vitro*, *in vivo* の結果と照会する。

4. 研究成果

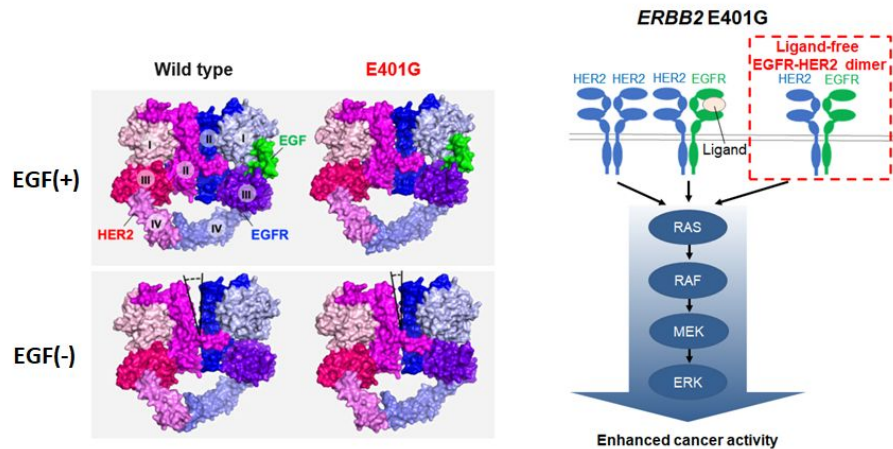
1. **がんゲノム情報収集**：臨床像として、放射線学的解析（CT、PET）、腫瘍マーカー、病理像のデータベース作成を行った。がんゲノム検査結果をがんゲノム情報サイト（ClinVar, COSMIC, OncoKB）に照らし、臨床的意義のある variant と Variants of unknown significance (VUS) の確認を行い、ゲノム情報を加えた総合的肺癌患者データベースを構築した。全がん種で 384 例集積した。
2. ***in silico* での VUS の病原性予測**：VUS 解析システムの構築のため、原発不明がん症例について解析した。本症例は 60 歳代女性の原発不明癌で粘液産生腺癌の組織型だった。遺伝子パネル検査の結果 *TP53* Y163C, *EZH2* R213H, *BAP1* V233fs*12, *FH* R233H の他、VUS である *ERBB2* E401G を検出した。これは 99.2% という高いアリル頻度を持ち、既存の *in silico* 病原性予測ツール（SIFT, PolyPhen2, PROVEAN）で病原性の可能性が高く、かつ国内外のデータベースの報告のない variant だった（図 3, Harada Y, Cell Oncol (Dordr). 2022）。

図3 原発不明がん患者より検出されたVUS



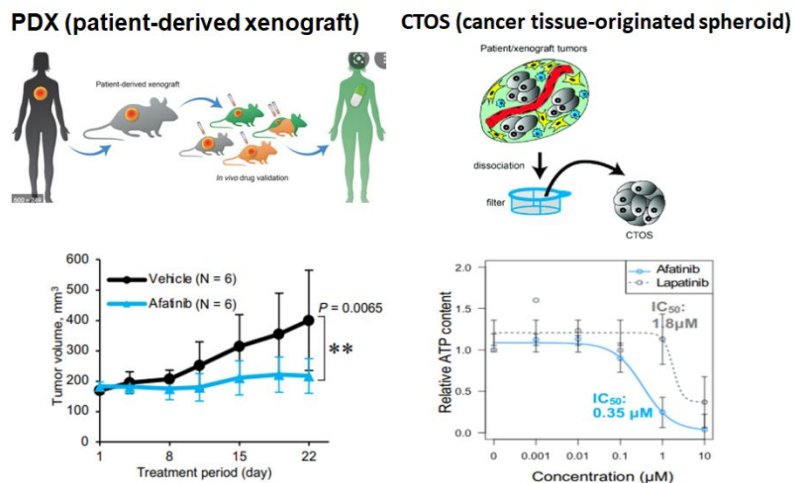
3. **VUS 遺伝子導入、コピー数増加による生物学的解析**：2 で抽出した variant を CRISPR/Cas9 を用いて肺癌細胞株に遺伝子導入し、高発現株を樹立し、細胞増殖、細胞浸潤を測定し、浸潤能の亢進を確認した。Molecular dynamics シミュレーションによる機能解析を行い、リガンド非依存的に EGFR と安定的ヘテロダイマーを形成する活性化型変異であることを確認した（図 4, Harada Y, Cell Oncol (Dordr). 2022）。

図4 コンピューターシミュレーションによるHER2 E401G機能解析



4. **患者腫瘍組織採取と Patient-derived xenograft (PDX)、CTOS (cancer tissue-originated spheroid)樹立**: 院内倫理審査委員会で承認を得たのち、上記の原発不明がん症例の組織を用いて PDX を樹立した。免疫不全マウスモデル (BRJ マウス; BALB/c Rag-2/Jak3 二重欠損マウス) に皮下移植し PDX の系を作成した。ERBB2 E401G を遺伝子導入した細胞株と合わせ、動物モデルで薬効解析し、EGFR/Her2 阻害剤であるアファチニブが効果を示した。さらに、CTOS を作成しアファチニブによる薬効を確認した (図5, Harada Y, BMC Cancer 2023)。当該患者へのアファチニブ投与を準備していたが、病勢進行により投与できなかった。

図5 PDX, CTOSを用いた薬効解析



<引用文献>

1. Sueoka-Aragane N, et al. The role of comprehensive analysis with circulating tumor DNA in advanced non-small cell lung cancer patients considered for osimertinib treatment. Cancer Med. 2021;10:3873-3885. doi: 10.1002/cam4.3929.
2. Nakamura T, et al. Absence of copy number gain of EGFR: A possible predictive marker of long-term response to afatinib. Cancer Sci. 2023; 114: 1045-1055. doi: 10.1111/cas.15655.
3. Skoulidis F, et al, STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS -Mutant Lung Adenocarcinoma Cancer Discov, 2018;8:822-835. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0099.

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 Harada Yohei, Sato Akemi, Nakamura Hideaki, Kai Keita, Kitamura Sho, Nakamura Tomomi, Kurihara Yuki, Ikeda Sadakatsu, Sueoka Eisaburo, Kimura Shinya, Sueoka-Aragane Naoko	4. 巻 23
2. 論文標題 Anti-cancer effect of afatinib, dual inhibitor of HER2 and EGFR, on novel mutation HER2 E401G in models of patient-derived cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-10428-3	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 Nakamura Tomomi, Sato Akemi, Nakashima Chiho, Abe Tomonori, Iwanaga Kentaro, Umeguchi Hitomi, Kawaguchi Atsushi, Sueoka Aragane Naoko	4. 巻 114
2. 論文標題 Absence of copy number gain of <i>EGFR</i> : A possible predictive marker of long term response to afatinib	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15655	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 1.Harada Y, Sato A, Araki M, Matsumoto S, Isaka Y, Sagae Y, Abe T, Aoyagi Y, Sueoka E, Okuno Y, Kimura S, Sueoka-Aragane N	4. 巻 45
2. 論文標題 Integrated approach to functional analysis of an ERBB2 variant of unknown significance detected by a cancer gene panel test.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Oncol (Dordr)	6. 最初と最後の頁 121-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13402-021-00656-3	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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中村朝美、佐藤明美、中島千穂、岩永健太郎、井上周、荒金尚子
2. 発表標題 ctDNAを用いた網羅的遺伝子解析によるアファチニブ長期奏効予測因子の検討
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会, 2022.12.1-12.3
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島千穂、中村朝美、佐藤明美、荒金尚子.
2. 発表標題 Liquid biopsyによる肺がんゲノムプロファイリングとEGFRチロシンキナーゼ阻害剤効果予測
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会, 2022.12.1-12.3
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島千穂、瀬戸香織、佐藤明美、中村秀明、梶原心、桑原雄紀、小宮奈津子、小楠真典、中村朝美、荒金尚子
2. 発表標題 当院での胸部悪性腫瘍に対するがんゲノム検査の現状
3. 学会等名 第89回日本呼吸器学会・日本結核 非結核性抗酸菌症学会・日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 九州支部秋季学術講演会, 2022.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Kudo, Toshio Kubo, Naoko Sueoka-Aragane, Sadakatsu Ikeda et al
2. 発表標題 A phase 2 basket trial of combination therapy with trastuzumab and pertuzumab in patients with solid cancers harboring HER2 amplification (JUPITER trial)
3. 学会等名 2021ASCO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakashima C, Shiotsu Y, Harada Y, Katsuya H, Okuma E, Nishi M, Sato A, Nakamura H, Sueoka-Aragane N
2. 発表標題 Heat Map Analysis, A New Integrated Pathway Scoring System for Cancer Genome Profiling.
3. 学会等名 the AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakashima C, Shiotsu Y, Kosakai Y, Harada Y, Katsuya H, Nishi M, Sato A, Nakamura H, Sueoka-Aragae N
2. 発表標題 Cancer Pathway Index, A new analytical method for cancer genome profiling test.
3. 学会等名 The 82nd Annual meeting of the Japanese cancer association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島千穂、小坂井康宏、塩津行正、原田陽平、勝屋弘雄、西正範、中村秀明、佐藤明美、荒金尚子
2. 発表標題 Cancer Pathway Index - がんゲノムプロファイリング検査のためのパスウェイスコアリングシステム.
3. 学会等名 第27回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島千穂、小坂井康宏、塩津行正、原田陽平、勝屋弘雄、西正範、中村秀明、佐藤明美、荒金尚子
2. 発表標題 Cancer Pathway Index, A new analytical method for cancer genome profiling test, Cancer Pathway Index - 包括的がんゲノムプロファイリング検査のための新規解析手法.
3. 学会等名 第21回 日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2024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
研究分担者	佐藤 明美 (Sato Akemi) (20568357)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	中島 千穂 (Nakashima Chiho) (40858502)	佐賀大学・医学部・病院助教 (17201)	
研究分担者	中村 朝美 (Nakamura Tomomi) (90457490)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

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