

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590674

研究課題名(和文) 治療効果予測困難な現行のEGFR抗体治療における新規予測検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel assay for prediction of response to anti-EGFR antibody therapy in colorectal cancer

研究代表者

畑中 豊 (Hatanaka, Yutaka)

北海道大学・大学病院・特任講師

研究者番号：30589924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、大腸癌の抗EGFR抗体治療における新規効果予測法の開発を試みた。抗体治療薬であるcetuximabを用いた高感度検出法およびこれをサロゲートする簡便法は確立できたものの、これを用いた生存期間解析では、RAS/BRAF野生型大腸癌の治療効果予測上有意な結果は得られなかった。そこでRAS/BRAF野生型およびこれにKRAS変異導入した細胞株を用いた網羅的解析により新規効果予測マーカーの探索を行ったところ、発現変動が認められた遺伝子が、核酸代謝関連膜結合タンパクをコードする遺伝子を含め12種同定された。これら新規同定遺伝子については、治療効果予測マーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop a novel method to predict response to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. A sensitive EGFR detection method using cetuximab and the simplified surrogate method were successfully established. However, these methods failed to enrich any responders to the therapy in RAS/BRAF wild-type colorectal cancer. We therefore explored novel predictive markers for the therapy by a comprehensive analysis of two different cell lines, KRAS wild-type and mutant, and identified twelve genes that changed between these cells. It is suggested that these candidate genes including a membrane protein related to nucleic acid metabolism might be predictive markers of anti-EGFR therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子標的治療 治療抵抗性 コンパニオン診断

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌 EGFR 抗体治療薬 (cetuximab; 以下 CTX) およびそのコンパニオン診断薬 (EGFR 抗体治療対象患者の選別のための検査薬) が 2008 年に同時承認され、大腸癌における分子標的治療が本邦で本格的に開始された。これにより切除不能な進行・再発大腸癌における生存率は改善し、現在では化学療法との併用で一次標準治療に用いられている。また同様の作用機序をもつ抗体治療薬 (panitumumab) もその後承認され、CTX と共に抗 EGFR 抗体治療の基幹を現在担っている。

一方、上述のコンパニオン診断薬として EGFR マウスモノクローナル抗体 (clone 2-18C9) を用いた免疫組織化学 (IHC) 検査薬が体外診断用医薬品 (IVD) 承認を受け、効果予測検査 (感受性予測検査) として現在用いられている。本検査薬による大腸癌の陽性率は 80~90% であり、大部分が EGFR 陽性と判定されている。しかし臨床試験におけるこの EGFR 陽性大腸癌に対する CTX 単剤の奏効率はわずか 10% であり、CTX の効果を正確に予測するものとは言い難い。また EGFR 陰性患者であっても EGFR 陽性患者と同様に約 10% の奏効率が確認されており、現行検査薬の検査意義は極めて低い。こうしたなか大腸癌の約 40% にみられる KRAS 変異型を有する患者では EGFR 治療が無効であることが報告され、これを契機に無効予測検査 (抵抗性予測検査) として KRAS 変異の有無の確認が検査化されている。

このように大腸癌 EGFR 抗体治療における効果予測因子は国内外を問わず未だ確立されておらず、無効予測因子として KRAS 変異検査のみが実用化されている。またこの変異検査において KRAS 野生型の判定された患者における CTX 単剤の奏効率は約 20% に留まっており、現在の検査アルゴリズムでは十分に治療対象患者の層別化が行えていない状況にある。

## 2. 研究の目的

本研究ではこの大腸癌抗 EGFR 抗体治療における効果予測法の開発を目的として、(1) EGFR タンパクを標的とする抗体治療薬 CTX を用いた新規の高感度 EGFR 検出法ならびにこれをサロゲートし同等の反応を有する簡便 IHC 法を確立し、RAS/BRAF 野生型大腸癌における治療効果予測の可否を明らかにするとともに、(2) RAS/BRAF 野生型細胞株およびこれに KRAS 変異導入した細胞株を用いた網羅的解析により効果予測マーカーの探索を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) FITC 化 CTX を用いた高感度 EGFR IHC 法、IVD 承認標準化 EGFR IHC 法およびコンベンショナル IHC 法

CTX の FITC 化は、NHS-FITC を用いてアミノ基部分に標識し、ゲルろ過カラムで精製した後に検討に供した。FFPE 組織ブロックより作製された 5 $\mu$ m 厚の薄切標本に対し、脱パラフィン・親水化を行い、その後抗原賦活処理を行った。FITC 化 CTX を用いた高感度 EGFR IHC 法 (CTX-EGFR 高感度法) では、内因性パーオキシダーゼの不活化を行ったのち、FITC 化 CTX を一次抗体として反応させた。その後抗 FITC 抗体および FITC 標識タイラマイド試薬 (Biotin-Free Catalyzed Amplification System, Dako) を用いた高感度法により検出した。Clone 2-18C9 を用いた IVD 承認標準化 EGFR IHC 法 (IVD-EGFR 標準化法) は、EGFR phramDx kit (Dako) を用いた。コンベンショナル IHC 法では、通常の IHC 用一次抗体と反応させた後、ポリマー試薬 (EnVision FLEX+, Dako) を用いて検出した。

### (2) EGFR/CEN7 プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法

FFPE 組織ブロックより作製された 5 $\mu$ m 厚の薄切標本に対し、脱パラフィン・親水化を行い、その後前処理を行った。脱水乾燥した

後、EGFR/CEN7 プローブミックス (Dako) をアプライした後、変性 (90°C, 5 分間) およびハイブリダーゼーション反応 (45°C, 20 時間) を行い、検出試薬 (DuoCISH kit, Dako) を用いて、既報の方法に従い検出した (Soma S et al. 2014) .

### (3) マイクロアレイ解析

TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用い、各細胞から総 RNA を抽出後、GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix) を用いて断片化・ビオチン化 cDNA を作製した。その後 GeneChip® Human Transcriptome Array 2.0 および GeneChip® Hybridization・Wash・Stain Kit (Affymetrix) を使用しマイクロアレイ解析を実施した。データ解析には、Expression Console および Transcriptome Analysis Console Software (Affymetrix) を使用した。

### (4) フローサイトメトリー解析

細胞分散試薬 (Cell Dissociation Buffer, Gibco) を用いて培養細胞を回収後、FITC 標識抗体で染色 (氷上, 60 分間) し、フローサイトメーター (FACSVerse, BD Biosciences) を用いて解析を行った。

### (5) 培養細胞を用いた FFPE 細胞ブロック作製

培養細胞を 10%中性緩衝ホルマリンにて 15 分間固定し、1%アルギン酸ナトリウムおよび 1M 塩化カルシウムを用いてゲル包埋した後、パラフィン包埋し、細胞ブロックを作製した。また器官型三次元培養 (Sato F et al. 2015) を行った組織様塊は、組織検体と同様の方法により FFPE ブロックを作製した。

## 4. 研究成果

### (1) FFPE 検体における CTX-EGFR 高感度法と IVD-EGFR 標準化法の比較

CTX-EGFR 高感度法の染色性について、EGFR 陽性上皮性腫瘍の FFPE 検体を用いて検討したところ、腺癌 (大腸癌, 肺癌) および扁平上皮癌 (頭頸部癌, 肺癌, 子宮頸癌) とともに

陽性反応が認められた。またこれら陽性部位では EGFR 遺伝子の有意なコピー数増加が認められた。一方、CTX-EGFR 高感度法と IVD-EGFR 標準化法間の IHC 染色性に顕著な差異が認められた。そこで CTX-EGFR 高感度法の染色性に基づき、IVD-EGFR 標準化法の染色感度を改変したところ、CTX-EGFR 高感度法をサロゲートする方法 (CTX-EGFR 代替法) の確立に成功した。

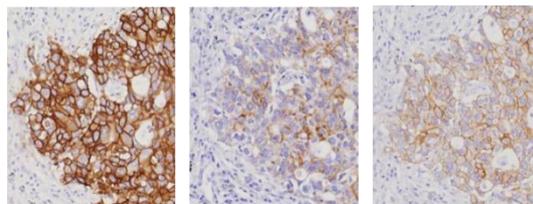


図1 肺腺癌における IHC 法の染色比較  
IVD-EGFR 標準化法 (左), CTX-EGFR 高感度法 (中) および CTX-EGFR 代替法 (右)

### (2) CTX-EGFR 代替法を用いた RAS/BRAF 野生型大腸癌における生存期間解析

サンガー・シーケンス法により RAS/BRAF 野生型が確認された大腸癌を用いて、CTX-EGFR 代替法を用いた IHC 染色を行ったところ、12 例が陽性となった。この結果に基づき生存期間解析を行ったところ、EGFR 陽性群および陰性群間で、有意な全生存期間延長は認められなかった。

### (3) RAS/BRAF 野生型大腸癌細胞株を用いた生存期間解析

RAS/BRAF 野生型大腸癌細胞株 (SW48 細胞) およびこれに KRAS (G12D) 変異導入した細胞株 (SW48/KRAS 細胞) を用いて、マイクロアレイによる羅的遺伝子発現解析を実施し、KRAS 変異により発現変動する遺伝子の探索を行ったところ、20 倍以上の発現差が認められた遺伝子が 12 種抽出された (図 2)。

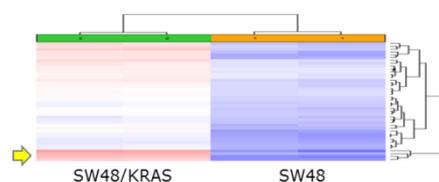


図2 マイクロアレイ解析の結果

このうち核酸代謝関連膜結合型タンパクに着目し、フローサイトメトリー法およびIHC法によりタンパク発現を確認したところ、SW48/KRAS細胞で顕著な発現上昇が認められた。さらに器官型三次元培養下においても高い細胞移動能を有するSW48/KRAS細胞では高発現していた。

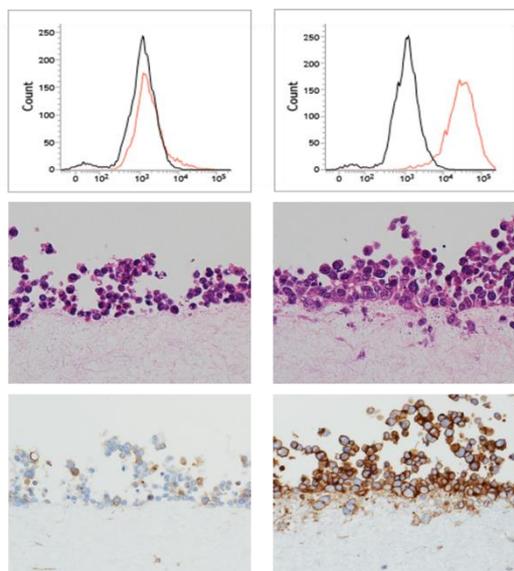


図3 核酸代謝関連膜結合型タンパクの発現比較 SW48細胞(左)およびSW48/KRAS細胞(右)。上段:フローサイトメトリー解析の結果。中下段:器官型三次元培養におけるHE染色(中段)および核酸代謝関連膜結合型タンパク染色(下段)。

本研究では、当初EGFRドメインIVを認識し、コンパニオン診断薬として使用されているclone 2-18C9とドメインIIIを認識するCTXの認識部位間の特異性や反応性に着目し、最終的にCTX-EGFR高感度法をサロゲートするCTX-EGFR代替法の確立に成功したものの、当該方法を用いたRAS/BRAF野生型大腸癌における生存期間解析では統計学的に有意な差は得られなかった。そのため我々は、方針を切り替え、KRAS変異導入によって変動する遺伝子の探索を試み、効果予測候補となり得る遺伝子を数種同定することができた。しかしながら本研究終了時点ではKRAS変異によって発現変動する分子の同定に留まった。今後、KRAS変異により顕著に発現上昇する核酸代謝関連膜結合型タンパクを含め、これらタンパク群のうちKRAS変異以外の遺伝子異

常に呼応して発現変動する遺伝子についてRAS/BRAF変異野生型の細胞および組織を用いて絞り込みを行い、RAS/BRAF変異野生型における感受性もしくは抵抗性予測因子の同定を行う予定である。

## 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] Sato F, Kubota Y, Natsuizaka M, Maehara O, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Suda G, Ohnishi S, Shimizu Y, Komatsu Y, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Whelan KA, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR inhibitors prevent induction of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 16:933-40, 2015, 査読有
- [2] 丸川 活司, 畑中 豊, 松野 吉宏. 固形腫瘍治療とコンパニオン診断. *臨床検査.* Vol 58, No. 8, 2014, 査読無
- [3] 丸川 活司, 畑中 豊, 松野 吉宏. 免疫組織化学—診断と治療選択の指針: 病理診断のための検査室の運営および管理. *病理と臨床.* 32:2-7, 2014, 査読無
- [4] Soma S, Tsuta K, Takano T, Hatanaka Y, Yoshida A, Suzuki K, Asamura H, Tsuda H. Intratumoral distribution of EGFR-amplified and EGFR-mutated cells in pulmonary adenocarcinoma. *Pathl Res Pract.* 210:155-60, 2014, 査読有
- [5] Kato Y, Nishihara H, Yuzawa S, Mohri H, Kanno H, Hatanaka Y, Kimura T, Tanino M, Tanaka S. Immunohistochemical molecular expression profile of metastatic brain tumor for potent personalized medicine. *Brain Tumor Pathol.* 30:167-74, 2013, 査読有
- [6] 畑中 豊, 西尾 和人, 松野 吉宏. コンパニオン診断と病理. *病理と臨床.* 30:1300-08, 2012, 査読無

〔学会発表〕(計 5件)

- [1] 畑中 豊, 松野 吉宏. ドライバー遺伝子変異検査法の現状と課題: コンパニオン診断薬の開発と臨床応用. 日本肺癌学会学術集会(招待講演). 2015年11月26日-28日, パシフィコ横浜(横浜市)
- [2] 畑中 豊, 松野 吉宏. コンパニオン診断(CoDx)の規制と質保証. 日本病理学会秋期特別総会(招待講演). 2015年11月5日-6日, 東京大学安田講堂(東京都)
- [3] 丸川 活司, 畑中 豊, 藤井 恭子, 平野 裕子, 恩田 千景, 畑中 佳奈子, 三橋

智子, 松野 吉宏. 体外診断用医薬品承認 EGFR 変異検出キットのホルマリン固定パラフィン包埋検体における検出感度に関する検討. 日本病理学会総会. 2014 年 4 月 24 日 - 26 日, 広島国際会議場 (広島市)

[4] 畑中 豊, 西尾 和人, 松野 吉宏. コンパニオン診断の現状と今後の課題. 日本臨床細胞学会秋期大会 (招待講演). 2013 年 11 月 2 日 - 3 日, 大阪国際会議場 (大阪市)

[5] 畑中 豊, 松野 吉宏. 分子病理診断の標準化と精度管理における課題と取り組み. 日本病理学会総会. 2012 年 4 月 26 日 - 28 日, 京王プラザホテル (東京都)

〔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 (なし)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

畑中 豊 (HATANAKA, Yutaka)  
北海道大学・北海道大学病院・特任講師  
研究者番号: 30589924

### (2) 研究分担者

なし