

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591186

研究課題名(和文) 胸部悪性腫瘍における分子生物学的診断の試みと新規バイオマーカーの探索研究

研究課題名(英文) Molecular profiling and biomarker study of thoracic malignancies

## 研究代表者

山本 信之 (Yamamoto, Nobuyuki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60298966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：胸部原発悪性腫瘍におけるバイオバンク体制を確立するとともに、腫瘍組織検体を用いての遺伝子変異解析を実施した。測定対象は、がん関連9遺伝子における23か所とした。肺腺がん411例中最も頻度が高く検出されたのはEGFR変異であり(35.0%)、その他にKRAS変異(8.5%)及びALK 遺伝子融合(5.0%)等が頻度高く検出された。一方、小細胞肺がんや肺扁平上皮がんにおける検討では、遺伝子変異検出率は大幅に低く、いわゆるドライバー遺伝子変異とされるものの頻度は高くないことが示唆された。また本研究においては、網羅的な変異検出を目的として次世代シーケンサーを用いての変異検出系の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：In this project, we established a biobank system of specimens from patients with thoracic malignancies. We conducted tumor genotyping study using tissue samples obtained from the biobank to detect 23 hotspot mutations in 9 cancer-related genes. In adenocarcinoma, EGFR mutation was most frequently detected (35.0%) followed by KRAS mutation (8.5%) and ALK translocation (5.0%). On the other hand, in small-cell lung cancer and squamous cell lung cancer, mutation rate was much lower than that in adenocarcinoma, suggesting driver mutations are rarely detected in those histologic types. We also established genotyping platform utilizing next-generation sequencing technologies for more comprehensive mutational analysis.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：遺伝子異常 バイオバンク

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺がん、悪性胸膜中皮腫、胸腺腫瘍、神経内分泌腫瘍等の胸部悪性腫瘍は、本邦だけでなく世界各国において、がん関連死の原因として最も高い割合を占めており、新たな薬剤および治療法の開発が予後を改善するためには急務である。近年、がんの発生や増殖に関与する分子および分子機構を治療標的とする「分子標的治療薬」が薬剤開発の主流となっており、肺がんを対象とした薬剤も多数開発されているが、臨床的に有効性が証明され、承認までに至る薬剤は数少ない。有効な薬剤を患者に届けるためには、薬剤の効果が期待できる症例を選択する必要がある、そのためには効果予測バイオマーカーが必要である。効果予測バイオマーカーの探索・同定には、その薬剤が標的とする遺伝子やその薬剤の代謝に関与する遺伝子の分子生物学的プロファイル情報を得ることが必要不可欠である。

(2) 「個別化医療」において重要と考えられる分子生物学的診断は、腫瘍組織特異的に見られる「遺伝子異常」の測定である。遺伝子異常は、分子標的治療薬の開発における治療標的として、また効果予測バイオマーカーとして、そして耐性獲得の原因ともなり得る。欧米においては、肺がん治療の「個別化医療」の推進を目指した取り組みが、多施設共同でコンソーシアムを形成し進められている。しかしながら、本邦においては上記のような「個別化医療」の実現化に向けた体系的な取り組みはほとんど行われていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

(1) 本邦における「胸部悪性腫瘍における個別化医療」の推進を目的に、検体の採取、保管、解析用の試料の調整などの操作過程を管理し、臨床検体の質をより一定に保つ体制を構築する。それを研究基盤とした個々の患者へ網羅的分子生物学的診断を提供できる体制の構築、および新規治療標的や効果予測バイオマーカーの探索研究を行う。

(2) 同意を取得した胸部悪性腫瘍全症例より腫瘍組織検体（手術、生検）を採取・収集し、胸部悪性腫瘍の "oncogenic driver" である既知遺伝子異常の検出を行う。得られた情報を臨床現場に提供し、個々の患者における診断・治療選択に活用できる体制を確立する。

(3) 体細胞変異を含む多種多様な遺伝子異常を網羅的かつ高感度に検出することができる「次世代シーケンサー」を用いた、網羅的高感度変異検出系の構築を行い、網羅的ゲノム診断プラットフォームの確立を行う。これにより、さらに「きめ細やかな」個別化医療の実現が可能となるとともに、頻度の低い稀少な遺伝子異常を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究提案の実施には、臨床情報と連結可能な状態で臨床検体を体系的に収集・保管しそのクオリティー管理を行うバイオバンクが必要である。本研究提案を実施する上で必要な質の高い検体採取・管理を実現するために、以下に示すバイオバンクシステムの構築を進める。

検体の採取、輸送、保管、解析用の試料の調整などの操作過程を逐次記録できるシステムとし、臨床検体の品質の管理を可能とする検体管理システムとする。

停電などの不測の事態に対応可能な冷凍保管のバックアップ体制をより強固なものとする。

(2) 胸部悪性腫瘍の "oncogenic driver" もしくは、分子標的治療薬の効果予測バイオマーカーである遺伝子異常の検出系を構築し、腫瘍組織検体（手術、生検）を採取できた胸部悪性腫瘍の全症例について遺伝子異常の検出を行う。解析結果は臨床現場に提供し、個々の患者における診断・治療選択そして新薬の臨床試験への登録において活用する。遺伝子異常の検出には、Pyrosequencing法、フラグメント解析法、RT-PCR法を用いる。遺伝子増幅については、定量PCR法を用いる。

(3) 今後、新しい分子標的治療薬の開発に比例し、効果予測バイオマーカーとして検査対象となる遺伝子変異や薬理ゲノムスマーカとして検査が必要な遺伝子多型が大幅に増加することが予測される。本研究では検出対象となる変異の網羅性と高い変異検出感度の両立を目指し、次世代シーケンサーを用いた網羅的高感度変異検出系の構築を行う。そして個別化医療の推進を図ることを目的に、臨床への導入の可能性を探索する。

## 4. 研究成果

(1) バイオバンクが確立され、病院診療部門（呼吸器内科、呼吸器外科、病理診断科、画像診断科）と研究所測定部門（新規薬剤開発・評価研究部）の協力体制に基づく、胸部悪性腫瘍全症例の臨床検体を、体系的に収集・保管できる体制を確立した。研究期間中に、新鮮凍結手術検体が約 500 サンプル、ホルマリン固定検体を含めると約 1400 サンプルの取得を行った（図 1）。

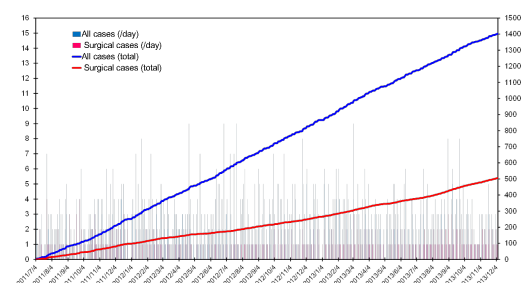


図 1. サンプル取得状況

(2) 肺腺がんにおいて、がん関連遺伝子での変異の測定を実施した。測定項目としてはEGFR、KRAS、BRAF、PIK3CA、NRAS、MEK1、AKT1、PTEN、およびHER2の9遺伝子（EGFR、KRAS、BRAF、PIK3CA、NRAS、MEK1、AKT1、PTEN、およびHER2）における23か所の変異検出を実施した。411例中最も頻度が高く検出されたのはEGFR変異であり（35.0%）、その他にKRAS変異（8.5%）およびALK遺伝子融合（5.0%）等が頻度高く検出された（図2）。また22例（5.4%）において、同時に2つ以上の遺伝子変異が観察された。日本人の肺腺がん症例におけるこれまで最大規模の検討であり、論文報告を行うことができた。

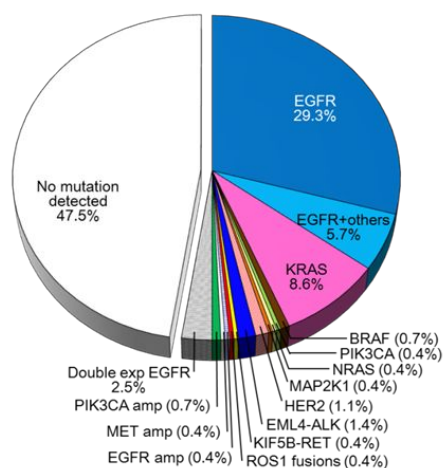


図2．肺腺がんにおける変異の頻度

(3) 小細胞肺がんにおける検討では、肺腺がんと比較すると遺伝子変異検出率は大幅に低く、いわゆるドライバー遺伝子変異とされるものの存在は頻度が高くないことが示唆される結果であった。その中で、PIK3CA増幅が6例において検出され、小細胞肺がんにおける治療標的となり得る可能性が示唆された（図3）。また小細胞肺がん患者からの組織を用いてチロシンキナーゼ活性の網羅的測定を行い、治療標的となり得る特異的なキナーゼを同定することができた。

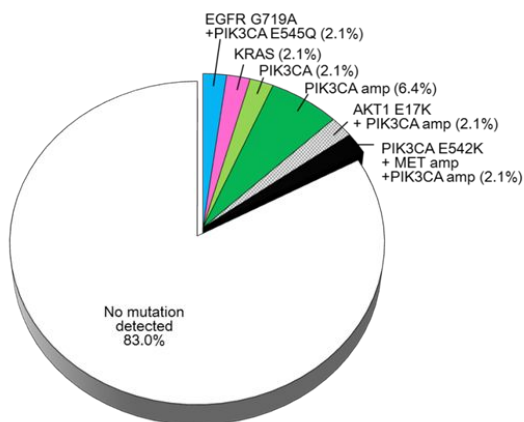


図3．小細胞肺がんにおける変異の頻度

(4) 肺扁平上皮がんにおける検討では、129症例において変異検出を実施した。肺腺がんと比較すると遺伝子変異検出率は低いが、PIK3CAにおいて変異と増幅を多く認める結果となった（図4）。加えて、少数ではあるものの、KRAS、NRAS、AKT、FGFR1に遺伝子変異もしくは増幅を認める結果となった。これらのデータに関しても日本人における報告は少ないため、意義が高いと考える。

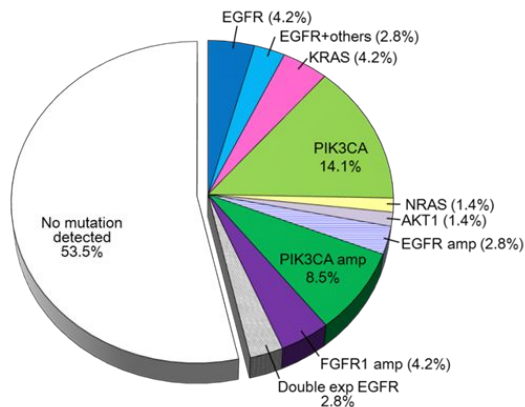


図4．肺扁平上皮がんにおける変異の頻度

(5) 上記のような遺伝子変異解析結果を臨床現場に提供し、個々の患者における診断・治療選択そして新薬の臨床試験への登録において活用する試みを行い、実際に解析結果を電子カルテ上に取り込み、日常臨床における参考データとして取り扱うことを実現した（図5）。あくまで研究で得たデータであることより、日常臨床においてこれらのデータに基づいた診療や薬剤選択はできないが、臨床試験への登録時の参考データとしての活用や治療の選択肢が複数存在する際の参考データとして利用することが可能であった。

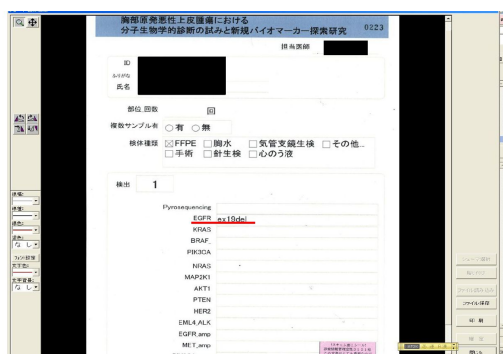


図5．電子カルテにおける解析結果表示

(6) 次世代シーケンサーを用いての遺伝子変異解析については、検出対象とする遺伝子及び領域を絞った Targeted resequencing における取り組みを開始した。具体的には48のがん関連遺伝子において、重要と考えられ

る体細胞変異の検出を実施した。試料としては、肺腺がん、肺扁平上皮がん及び小細胞肺がんの外科手術症例(279 症例)から取得した検体を利用して、次世代シーケンサーによる変異検出を行った。これらのうち、158 検体については上記の従来法での変異検出も実施しており、変異結果について高い一致率を確認した。

#### 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 8 件)

Kenmotsu H, Yamamoto N (他 14 名、16 番目): Prospective genetic profiling of squamous cell lung cancer and adenosquamous carcinoma in Japanese patients by multitarget assays. *BMC Cancer* (in press). (査読あり)

Shukuya T, Yamamoto N (他 16 名、17 番目): Identification of actionable mutations in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 2014 Oct;86(1):35-40. (査読あり)

Ono A, Yamamoto N (他 13 名、13 番目): Mutant allele frequency predicts the efficacy of EGFR-TKIs in lung adenocarcinoma harboring the L858R mutation. *Ann Oncol*. 2014 Oct;25(10):1948-53. (査読あり)

Serizawa M, Koh Y (他 14 名、16 番目): Assessment of Mutational Profile of Japanese Lung Adenocarcinoma Patients by Multitarget Assays: A Prospective Single-institute Study. *Cancer*. 2014 May 15;120(10):1471-81. (査読あり)

Wakuda K, Koh Y (他 14 名、16 番目): Molecular Profiling of Small Cell Lung Cancer in a Japanese Cohort. *Lung Cancer*. 2014 May;84(2):139-44. (査読あり)

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N (他 14 名、17 番目): Multiplexed molecular profiling of lung cancer using pleural effusion. *J Thorac Oncol*. 2014 Jul;9(7):1048-52. (査読あり)

Yamamoto N, Koh Y (他 11 名、1 番目): The effect of CYP2C19 polymorphism on the safety, tolerability, and pharmacokinetics of tivantinib (ARQ 197): Results from a phase I trial in advanced solid tumors. *Ann Oncol* 24(5): 1653-1659, 2013 (査読あり)

Akamatsu H, Yamamoto N (他 14 名、16 番目): The Impact of Clinical Outcomes According to EGFR Mutation Status in Patients with Locally Advanced Lung Adenocarcinoma Who Received Concurrent Chemoradiotherapy. *Am J*

*Clin Oncol*. 2012 Dec 1. [Epub ahead of print] (査読あり)

#### [学会発表](計 11 件)

山本 信之、Bevacizumab と EGFR-TKI との併用: Erlotinib+Bevacizumab vs Erlotinib の randomized phase II study の経験から、第 55 回日本肺癌学会学術集会、2014 年 11 月 14 日~2014 年 11 月 16 日、京都府・京都市

山本 信之、抗がん剤の副作用対策の現状と問題点、第 40 回日本毒性学会学術集会、2013 年 6 月 17 日~2013 年 6 月 19 日、千葉県・千葉市

芹澤 昌邦、肺腺癌における個別化医療の推進を目的とした体細胞変異プロファイリング、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日、神奈川県・横浜市

劔持 広知、肺扁平上皮癌における遺伝子プロファイリング、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日~2013 年 10 月 5 日、神奈川県・横浜市

Yasuhiro Koh、Identification of actionable mutations in surgically resected tumor specimens from Japanese patients with non-small cell lung cancer by ultra-deep targeted sequencing, 49th American Society of Clinical Oncology, 2013 年 5 月 31 日~2013 年 6 月 4 日、シカゴ(米国)

Kazushige Wakuda、Molecular profiling of small cell lung cancers in Japanese patients, 49th American Society of Clinical Oncology, 2013 年 5 月 31 日~2013 年 6 月 4 日、シカゴ(米国)

芹澤 昌邦、Implementation of multiplexed mutational profiling into the lung cancer clinic at Shizuoka Cancer Center, 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日~2012 年 9 月 21 日、北海道・札幌市

劔持 広知、Biomarker analysis of lung cancer by formalin-fixed paraffin-embedded samples, 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日~2012 年 9 月 21 日、北海道・札幌市

内藤 立暁、Biomarker analysis of lung cancer by pleural or pericardial effusion samples, 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日~2012 年 9 月 21 日、北海道・札幌市

井坂 光宏、Biomarker analysis of lung cancer by surgically resected samples, 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日~2012 年 9 月 21 日、北海道・札幌市

Masakuni Serizawa、Multiplexed mutational profiling in Japanese patients with thoracic malignancies

for personalized cancer therapy、  
EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular  
Targets and Cancer Therapeutics、2012  
年11月6日～2012年11月9日、アイル  
ランド(ダブリン)

〔図書〕(計 3件)

山本 信之、呼吸と環境、変化を厭わな  
い、2014、1

赤松 弘朗、中外医学社、最新がん薬物  
療法学 がん薬物療法の最新知見、2014、  
124-126

赤松 弘朗、中外医学社、肺癌診療Q&A  
第2版一つ上をいく診療の実践、2013、  
263-264

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 信之(YAMAMOTO, Nobuyuki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60298966

(2) 研究分担者

洪 泰浩(KOH, Yasuhiro)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80426519

芹澤 昌邦(SERIZAWA, Masakuni)

静岡県立静岡がんセンター研究所・新規薬  
剤開発・評価研究部・研究員

研究者番号：00569915

(3) 連携研究者

近藤 晴彦(KONDO, Haruhiko)

杏林大学・呼吸器・甲状腺外科・教授

研究者番号：60399590

遠藤 正浩(ENDO, Masahiro)

静岡県立静岡がんセンター・画像診断科・  
部長

中島 孝(NAKAJIMA, Takashi)

静岡県立静岡がんセンター・病理診断科・  
部長

研究者番号：20124422