

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462013

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた大腸癌末梢血の抗EGFR抗体非侵襲的感受性診断の検討

研究課題名(英文) A novel noninvasive screening assay for RAS mutations in the peripheral blood sample using next-generation sequencing for anti-EGFR antibodies therapy

研究代表者

竹政 伊知朗 (Takemasa, Ichiro)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50379252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：進行大腸癌に対する抗EGFR療法の効果はRAS野生型の患者に限られているため、あらかじめ生検など癌組織の遺伝子検査により患者を選別する必要がある。RAS変異は抗EGFR治療中にも獲得され、獲得耐性の重要なメカニズムの一つである。血液中から低頻度の変異クローンを検出できれば、治療経過中変異を来した場合、無益な治療の継続を回避することが可能となり、治療成績・費用対効果の改善につながることを期待される。本研究により血液検体を用いた非侵襲性RAS変異検査を確立し、病勢モニタリングや耐性変異を標的とする新しい分子標的薬の適用決定の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Because the effect of anti-EGFR antibodies in advanced colorectal cancer is limited to RAS wild type patients, it is necessary to select the patients by the genetic screening assay of the cancer tissue including the biopsy sample before the treatment. In addition, RAS mutations will be acquired during anti-EGFR antibodies therapy. Detection of a low-frequency clone with RAS mutations in the plasma during anti-EGFR antibodies therapy make it possible to identify the patient for a useful treatment and to evade continuation of a useless treatment. This approach is expected to improve the clinical outcomes and a nationwide cost-effectiveness of this treatment. A novel noninvasive screening assay for RAS mutations in the blood sample using next-generation sequencing as liquid biopsy was established in this study and our methods will help molecular monitoring of the disease over the time is necessary to identify mechanisms of resistance and to adapt the therapy to the new molecular target.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 非侵襲性KRAS変異検査 次世代シーケンサー 感受性診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 進行大腸癌の抗 EGFR 療法は KRAS 変異症例では非常に低い反応が予測されるため、生検サンプルなどを用いた KRAS 変異検査が必須で、非侵襲性検査の確立が期待されている。KRAS 変異状況はダイレクトシーケンス法で調べられているが、低信号の変異を識別する客観性の欠如や感度が低いといった問題がある。一方、パイロシーケンス法は一塩基多型を正確に定量できる強力で高感度の配列法であり、最近では KRAS 変異の検出にルーチンに行われるようになりつつある。その陽性シグナルの閾値は 10% に設定されているが、現時点では 10% 未満の低頻度 KRAS 変異が抗 EGFR 療法の効果に与える影響はわかっていないが、効果が減弱するとの報告がされてきている。さらには KRAS 変異が、抗 EGFR 抗体治療中に発現することも、獲得耐性の一つの重要なメカニズムとして注目されている。

2. 研究の目的

進行大腸癌に対する抗 EGFR 療法の

benefit は野生型 KRAS の患者に限られているため、生検サンプルなどあらかじめ癌組織の遺伝子検査を行い、適用のある患者を選別する必要がある。KRAS 変異は抗 EGFR 治療中にも獲得されることが認識され、獲得耐性の重要なメカニズムの一つとして提唱されるようになった。血液中から低頻度の変異クローンを検出できれば、原発巣が野生型の患者が治療経過中変異を来した場合、無益な治療の継続を回避することが可能となり、診断精度の改善および費用対効果の改善につながることを期待される。本研究では、従来の検査の感度を向上させることで血液検体を用いた非侵襲性 KRAS 変異検査を確立し、病勢モニタリングや耐性変異を標的とする新しい分子標的薬の適用決定

など新しい用途の研究開発を行うことを目的とする。

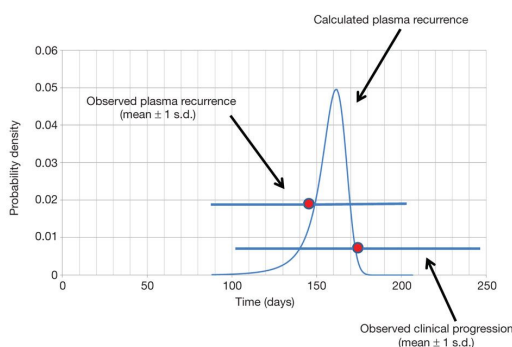
3. 研究の方法

- (1) 次世代シーケンサーを用いた血漿中大腸癌由来変異 DNA 検出法を確立し、高度進行大腸癌における、診断ないし手術時の原発巣および血液の KRAS 変異を測定する。生検サンプルと血液サンプルの KRAS 変異の相同性について検証し、その KRAS 野生型患者を対象に、抗 EGFR 抗体導入前後、増悪後の各ポイントで血液を測定し、化学療法中の簡便な KRAS 測定による極めの細かい個別化化学療法の実践の可能性を検討する。
- (2) 大腸癌症例集積 (臨床情報、サンプル) システムの確立
札幌医科大学および大阪大学とそれぞれの基幹関連施設から高度進行大腸症例を集積し、中央登録システムと標本 (原発巣、生検サンプル、全血) の回収・保管システムを構築する。またアッセイで得られた情報を迅速に担当医にフィードバックするシステムを構築する。
- (3) 次世代シーケンサーを用いた血漿中大腸癌由来変異 DNA 検出法の確立
測定感度は 10,000 正常分子中 1 個の変異分子の検出を目標とする。また処理速度の目標は 24 検体/人・週とする。PCR 増幅した KRAS 断片を 10 万回以上配列決定することにより、変異を探索する。従来の次世代シーケンサーは一測定あたりの所要時間とコストの点で臨床検体の解析には不向きであったが、パーソナル次世代シーケンサー (ライフテクノロジー社、イルミナ社) はこれらの不都合を解消している。
- (4) 生検サンプルでの KRAS 変異と血液サンプルでの KRAS 変異の相同性についての検証

100 症例以上のサンプルについて、血液中と生検での KRAS 変異結果と合致した結果が得られるかどうか検討する。また、薬剤応答との比較により、その感度と特異度をしらべ、それぞれの技術の特徴を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) ダイレクトシーケンス法で KRAS 野生型と診断され抗 EGFR 療法を受けた遠隔転移を有する大腸癌 168 例を用いた腫瘍標本のパイロシーケンス法による解析では、138 例は野生型のままであり、30 例 (17.9%) で低頻度 KRAS 変異が検出された。PD の患者はダイレクトシーケンス法による野生型 168 例では 36.3% であり、パイロシーケンス法による野生型 138 例では 29.0% と減少していた。ダイレクトシーケンス法で野生型とされた遠隔転移を有する大腸癌患者のうち 17.9% がパイロシーケンス法にて KRAS 変異を有していることがわかり、また KRAS 変異が 10% 未満であっても低頻度の KRAS 変異のある LMT 患者群においては、変異対立遺伝子量が 2.3% 以下の純粋な KRAS 野生型患者に比べて抗 EGFR 療法から受けるベネフィットが低いことが明らかになった。



- (2) 札幌医科大学および大阪大学とそれぞれの基幹関連施設をベースに、対象となる高度進行大腸癌症例の標本（原発巣、生検サンプル、全血）臨床病理所見データ

の回収・保管システムを構築した。また次世代シーケンサーを用いて PCR 増幅した KRAS 断片を 10 万回以上配列決定することにより、エラー率の低い血漿中大腸癌由来変異 DNA 検出法を確立した。さらに同一鋳型を逆方向から配列決定するオプション技術や、個々の塩基のエラー率を正確に調べることで配列読み取り精度を向上させることに成功した。

- (3) 次世代シーケンサーを用いた血漿中大腸癌由来変異 DNA 検出法の確立するため、実験系のバックグラウンドノイズを測定し、コマーシャルのゲノム DNA サンプルを用いて解析により条件設定を完了した。
- (4) 遠隔転移を有する 10 例のサンプルを対象として、生検サンプルと血液サンプルの解析で同じ KRAS 変異を検証した。引き続き採取部位の違いにより、異なる結果を想定し、血液中サンプルを用いた場合の感度の安定性を検証すると共に、生体サンプルを複数調べることにより、双方の結果の安定性の違いを検証した。サンプルにより、組織、術前血漿での mutation の割合が高く、術後の血漿においては、mutation が少なくなっていることを確認した。
- (5) 薬剤応答との比較により、その感度と特異度を検証するため、遠隔転移を有し、薬剤投与によって腫瘍は縮小したケース、一旦腫瘍縮小効果が得られたが failure して、腫瘍増大に転じたケースのサンプルを 20 例収集した。組織サンプルでの heterogeneity と血漿サンプルのタイムコースを取得し、耐性変異の検出を目指している。そのために、また前回、ctDNA の収量が良くなかったサンプルについては、組織からの DNA を活用して、KRAS と Cancer Panel (他の遺伝子) で変異を調

べるとともに、血漿サンプルについてPCR
で増幅が可能であるかどうかを検討した。

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2件)

- 1: Ogawa T, Hirohashi Y, Murai A, Nishidate T, Okita K, Wang L, Ikehara Y, Satoyoshi T, Usui A, Kubo T, Nakastugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Kutomi G, Furuhashi T, Hirata K, Sato N, Mizuguchi T, Takemasa I, Torigoe T. , ST6GALNAC1 plays important roles in enhancing cancer stem phenotypes of colorectal cancer via the Akt pathway. *Oncotarget*. 2017 Nov 8;8(68):112550-112564. doi:10.18632/oncotarget.22545. eCollection 2017 Dec 22. PubMed PMID: 29348846; PubMed Central PMCID: PMC5762531. 査読有
- 2: Hata T, Takemasa I, Takahashi H, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Mizushima T, Doki Y, Mori M. Downregulation of serum metabolite GTA-446 as a novel potential marker for early detection of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2017 Jul 11;117(2):227-232. doi: 10.1038/bjc.2017.163. Epub 2017 Jun 20. PubMed PMID:28632728; PubMed Central PMCID: PMC5520513. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹政伊知朗 (TAKEMASA Ichiro)
札幌医科大学・消化器・総合、乳腺・
内分泌外科・教授
研究者番号 50379252

(2) 研究分担者

水島恒和 (MIZUSHIMA Tsunekazu)

大阪大学・医学系研究科 炎症性腸
疾患治療学寄附講座・教授
研究者番号 00547707

山本浩文 (YAMAMOTO Hirofumi)
大阪大学・医学部 保健学科 分子
病理学研究室・教授
研究者番号 30322184

佐藤太郎 (SATO Taro)
大阪大学・医学系研究科 消化器癌
先進化学療法開発学寄附講座・教授
研究者番号 40368303

畑 泰司 (HATA Taishi)
大阪大学・医学系研究科 消化器外
科学・助教
研究者番号 70644912