

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870509

研究課題名(和文)末梢血cell free DNAを用いた網羅的・定量的遺伝子変異解析の探索研究

研究課題名(英文) Exploratory analyses of comprehensive and quantitative mutation profiling using cell-free DNA

研究代表者

赤松 弘朗 (Akamatsu, Hiroaki)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10646582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Digital PCRを用いたEGFR遺伝子変異に関するmultiplex検出系確立のために、基礎的検討としてプラスミド・細胞株を用い高感度系を確立した。これを単独の遺伝子変異の検出系と比較し、非常に高い相関($R^2 = 0.99$)が得られることを確認した。続いて前向き研究として臨床検体(進行期肺癌患者60例、健常人17例)を用いた測定を行った。肺癌患者の末梢血において、腫瘍組織と比較した遺伝子異常検出の感度66%、特異度100%であった。中でも遠隔臓器に転移を有する症例では感度78%と高く、今後こうした検討を行う上でのよい対象と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To establish multiplex assay of EGFR mutation using digital PCR, we first develop highly sensitive assay with plasmid and cell-lines. Next, we compared multiplex assay with duplex assay. Sensitivity was highly correlated ($R^2 = 0.99$) between these assays. Thus, we subsequently analyzed clinical samples (60 advanced lung cancer patients and 17 healthy volunteers). Compared with tumor tissues, multiplex assay using plasma samples demonstrated sensitivity of 66% and specificity of 100%, respectively. Of those, patients who had distant metastasis demonstrated higher sensitivity (81%). Thus, this population may be suitable to further clinical trial.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：リキッドバイオプシー EGFR遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

近年、oncogenic driver と称される強力な癌関連遺伝子が複数同定され、特異的分子標的治療薬の開発が進んできた。今後、診断から遅滞なく複数の遺伝子異常を検索する事が必須となりつつあるが、これらを包括的かつ高感度に検出する系の確立は重要な課題である。また、阻害剤耐性例についても、再度組織採取を行って得た新たな分子プロファイルに準じて治療を検討する方法が模索されている。しかしながら、肺癌の臓器特異的な問題として十分量の組織採取が難しい事が多く、採取の容易な液性検体を用いた解析手法の開発は今後重要度を増すと考えらる。

2. 研究の目的

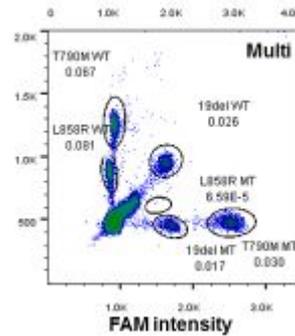
網羅的遺伝子変異解析・定量的高感度 PCR 解析の時代において肺癌の臓器特異的な課題である組織採取の困難性を、末梢血検体の利用により解決可能かを探索的に検討する。

3. 研究の方法

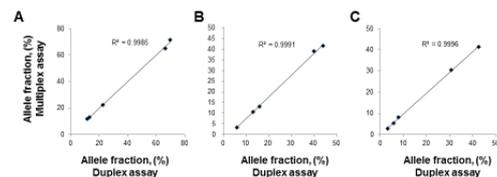
血漿より抽出した DNA を用いて次世代シーケンサーを利用した網羅的遺伝子変異解析の測定プラットフォームを確立する。その際、同一症例の原発組織検体についても次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子変異解析を行い、両者の異同について検討する。最も頻度の多い EGFR 遺伝子変異陽性例については治療前後の末梢血検体を用いて高感度 PCR 法 (digital PCR 法) による遺伝子変異陽性細胞の定量的解析を行う。この結果と臨床情報の関連について解析を行い、治療効果などとの相関を検討するとともに、耐性化や再発予測など病態モニタリングのための診断ツールとしての可能性について検討を行う。

4. 研究成果

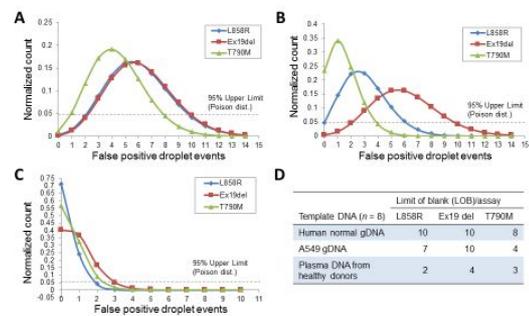
(1) プラスミド・細胞株を用いて Digital PCR における EGFR 遺伝子変異の multiplex 検出系 (exon 19 欠失・exon 20 T790M・exon 21 L858R 点突然変異) を確立した (プラスミドによる検討を下に示す)。



次に確立した multiplex assay を用いて変異毎の Duplex assay と検出率を比較したところ、いずれも $R^2 = 0.99$ と非常に高い相関を示した (下図)。



なお、各変異における陽性的カットオフについては下図のように疑陽性イベント数から、Poisson モデルの 95% 信頼区間を元に決定した。



(2) 続いて臨床検体を用いた前向き研究として、進行期肺癌患者 60 例、健常人 17 例を用いた測定を行った。それぞれ末梢血 6mL を用い、肺癌患者では全ての検体で DNA 抽出が可能であった。解析結果は、同時期に採取された腫瘍組織における EGFR 遺伝子変異の有

無と比較され、感度 66%、特異度 100%、一致率 80%であった。中でも遠隔臓器に転移を有する症例では感度 78%と高く、今後こうした検討を進める上でより適切な対象と考えられた（下図）。

Table 3. Comparison of EGFR mutation status.

Overall	Mutation status in Primary tumor		
	Mutant	Wild-type	Total
Mutation status in plasma	23	0	23
	12	25	37
	35	25	60
	Concordance 60.0%	Sensitivity 65.7%	Specificity 100.0%
Sensitive mutation in patients without distant metastasis			
	Mutation status in Primary tumor		
	Mutant	Wild-type	Total
Mutation status in plasma	5	0	5
	7	7	14
	12	7	19
	Concordance 63.2%	Sensitivity 41.6%	Specificity 100.0%
Sensitive mutation in patients with distant metastasis			
	Mutation status in Primary tumor		
	Mutant	Wild-type	Total
Mutation status in plasma	18	0	18
	5	18	23
	23	18	41
	Concordance 67.8%	Sensitivity 78.3%	Specificity 100.0%

Sensitivity (P = 0.056, Fisher's exact test)

また、主に耐性例において確認される T790M 変異については今回 8 例において末梢血より検出したが、うち 3 例では組織検体の採取が困難な症例であった。近年 T790M 変異に対する阻害剤が臨床導入されており、このような組織採取困難例についても liquid biopsy を用いた耐性変異検出の有用性が示された。この結果を元に、我々は多施設共同での前向き臨床研究として、EGFR 遺伝子変異陽性進行肺腺癌に対するアファチニブ療法における liquid biopsy の意義を探索する第 II 相試験 (WJOG8114LTR) を施行した。昨年時点で 55 例の症例集積を完了し、現在解析を進めている。

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 9 件)

Imai H, Akamatsu H, et al. Prognostic significance of diabetes mellitus in locally advanced non-small cell lung cancer. BMC Cancer 2015 15:989 (査読あり)

Matsunaga K, Hirano T, Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N, et al. Progression of Irreversible Airflow Limitation in

Asthma: Correlation with Severe Exacerbations. J Allergy Clin Immunol Pract. 2015;3(5):759-64.e1. (査読あり)

Imai H, Akamatsu H, et al. Springerplus. 2015;31(4):152 Comparison of platinum combination re-challenge therapy and docetaxel monotherapy in non-small cell lung cancer patients previously treated with platinum-based chemoradiotherapy. (査読あり)

Akamatsu H, Yamamoto N, et al. Respir Investig. 2015;53(2):68-72. Disease flare after gefitinib discontinuation. (査読あり)

Imai H, Akamatsu H, Yamamoto N, et al. Ann Thorac Med. 2015;10(1):61-6. Progression-free survival, post-progression survival, and tumor response as surrogate markers for overall survival in patients with extensive small cell lung cancer. (査読あり)

Kimura M, Akamatsu H, Yamamoto N, et al. Support Care Cancer. 2015;23(6):1699-708 Prognostic impact of cancer cachexia in patients with advanced non-small cell lung cancer. (査読あり)

Ko R, Akamatsu H, et al. Int J Clin Oncol. 2015;20(4):668-73. The effect of gefitinib in patients with postoperative recurrent non-small cell lung cancer harboring mutations of the epidermal growth factor receptor. (査読あり)

Shukuya T, Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N, et al. Lung Cancer. 2014;86(1):35-40. Identification of actionable mutations in malignant pleural mesothelioma. (査読あり)

Miura S, Akamatsu H, Yamamoto N, et al. Invest New Drugs. 2015;33(3):755-60. The efficacy of amrubicin on central nervous system metastases originating from small-cell lung cancer: a case series of eight patients. (査読あり)

[学会発表](計5件)

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N, et al. Establishment of multiplexed ultra-sensitive detection of epidermal growth factor receptor mutations using picodroplet digital PCR. American Association for Cancer Research 2015, Pennsylvania, USA.

Akamatsu H. Early phase trials using liquid biopsy. 4th Japan Taiwan Oncology phase I trial conference. Taipei, Taiwan.

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N, et al. Establishment of novel multiplexed assay to detect EGFR mutations ultra sensitive digital PCR. ESMO Asia 2015, Singapore, Singapore.

Koh Y. Liquid Biopsies: noninvasive longitudinal monitoring of lung cancer
第13回日本臨床腫瘍学会2015, 札幌
洪泰浩 胸部原発悪性腫瘍における個別化医療の現状と今後の展望について 第74回日本癌学会学術総会、名古屋

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤松弘朗 (AKAMATSU, Hiroaki)
和歌山県立医科大学 内科学第3講座助教
研究者番号: 10646582

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者

菊池崇史 (KIKUCHI, Takashi)
和歌山県立医科大学 内科学第3講座助教
研究者番号: 40649050

山本信之 (YAMAMOTO, Nobuyuki)
和歌山県立医科大学 内科学第3講座教授
研究者番号: 60298966

洪泰浩 (KOH, Yasuhiro)
和歌山県立医科大学 内科学第3講座講師
研究者番号: 80426519