

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21525

研究課題名(和文) ドライバー遺伝子肺癌の薬剤感受性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of driver mutation positive lung cancer

研究代表者

武田 真幸 (TAKEDA, Masayuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20510928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：2013年7月～2015年3月に近畿大学で診断された肺癌110例を前向きに解析しホルマリ  
ン固定パラフィン包埋腫瘍検体からDNA、RNA抽出後遺伝子変異解析実施例は、それぞれ95%、96%と高率で実施  
可能であった。少なくとも1つ以上のアミノ酸置換を生じる遺伝子変異は69%の症例に認められ、薬剤感受性に  
関与するActionable遺伝子変異は40%に同定され、Actionable遺伝子変異有り且つ分子標的薬導入群は、変異無  
し群、及び、Actionable遺伝子変異有り且つ分子標的薬導入無し群と比較し、有意に全生存期間を延長す  
ることを示しマルチ遺伝子パネルの臨床的有用性を示すことができた。

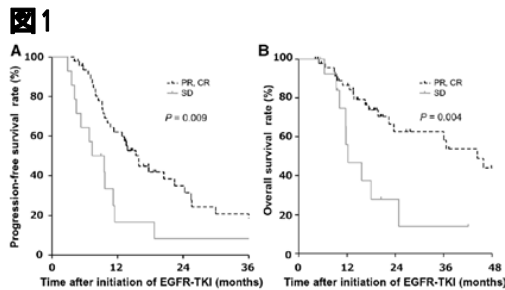
研究成果の概要(英文)：Tumor specimens from 110 patients with lung cancer recruited between July  
2013 and March 2015 were analyzed. The most common genetic alterations were TP53 mutations in 42  
patients, followed by EGFR mutations in 25, STK11 mutations in 12, and KRAS mutations in 10.  
Potentially actionable mutations were identified in 44 patients including 50% of those with  
adenocarcinoma and 14% of those with squamous cell carcinoma. The OS of patients with advanced or  
recurrent cancer who had an actionable mutation and received targeted therapy (median OS not  
achieved) was significantly longer than that of those with no mutation (18.1 months,  $P = 0.041$ ) or  
of those with a mutation not so treated (6.1 months,  $P = 0.0027$ ). Multiplex genomic testing was  
performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor specimens with a success rate of ~95%. Such  
testing can assist physicians in matching patients with approved or experimental targeted  
treatments.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：薬効評価と予測 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍の増殖・転移の鍵となる分子を標的とした分子標的治療の研究は目覚ましい進歩を遂げている。肺癌に於いては、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor:EGFR) 遺伝子の活性型変異陽性肺癌に対する EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) 及び EML4-ALK 陽性肺癌に対する ALK チロシンキナーゼ阻害剤であるクリゾチニブの著明な抗腫瘍効果が示されている。しかし、これらドライバー遺伝子変異陽性肺癌に於ける分子標的薬剤の無増悪生存期間は、約 10~12 ヶ月と未だ満足できるものではない。また、奏効割合及び無増悪生存期間も症例毎に大きく異なることから、これらのドライバー遺伝子変異陽性肺癌も、一様の患者集団ではないことが考えられる。我々は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に於ける EGFR-TKI の奏効と生存期間に与える影響について解析を行い、完全奏効(CR)/部分奏効(PR)症例は、非奏効(SD)症例と比較し、無増悪期間および全生存期間が有意に延長することを示した (Takeda M, et al. J Thorac Oncol. 2014)。



【図1】EGFR遺伝子変異陽性肺癌に於けるEGFR-TKIの奏効と生存期間。CR/PR症例はSD症例と比較し、無増悪生存期間及び全生存期間で有意に延長することが示された。

上記の結果より、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に於いて、如何に奏効させるかが更なる治療効果改善に重要となってくる。我々は以前、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に於いて、EGFR-TKI に初期耐性 (PD) を示す症例について注目し、PD 症例には、診断時組織でEGFR 変異以外に KRAS 変異を高頻度に認め、CR/PR 症例には認められないことを報告した (Takeda M, et al. J Thorac Oncol. 2010)。つまり、初期耐性のメカニズムとして、EGFR 遺伝子変異の下流遺伝子である KRAS に活性型変異があると、EGFR をEGFR-TKI で阻害しても KRAS からの増殖シグナルは阻害されない為、薬剤耐性を示すと考えられた。この様に、ドライバー変異陽性肺癌に於いて、個体間のヘテロジェニティが存在することが示唆され、EGFR 変異及び KRAS 変異が共存する症例に於いては、KRAS もしくはその下流蛋白を阻害するこ

とで更なる治療効果が期待される。本研究では、EGFR 遺伝子変異や、EML4-ALK 変異等のドライバー遺伝子異常を有する肺癌に於いて、分子標的薬の感受性の違いが共発現する遺伝子異常によるとの仮説のもと、ドライバー遺伝子以外の遺伝子解析を実施し、新たな分子異常を同定することで、分子標的薬の治療効果を改善させる治療標的かどうか基礎的検討を行う。

## 2. 研究の目的

EGFR 遺伝子変異や、EML4-ALK 変異等のドライバー遺伝子変異陽性肺癌は、分子標的薬の登場により、従来の治療法を上回る効果が得られている。我々は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に於いて、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤への奏効が、生存期間に関連する因子であることを見出した (Takeda M, et al. J Thorac Oncol. 2014)。本研究は、分子標的薬の感受性の違いが共発現する遺伝子異常によるとの仮説のもと、診断時腫瘍の遺伝子解析を実施し、ドライバー遺伝子異常以外の新たな分子異常を同定することで、分子標的薬の治療効果を改善させる治療標的かどうか基礎的検討を行い、新たな治療ストラテジーを構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

進行非小細胞肺癌の微量な組織検体からの効率的な遺伝子変異、発現解析を可能とするために MassARRAY システムを導入し、解析系の構築に成功している (Sakai K, Takeda M, et al. J Thorac Oncol. 2012, Takeda M, et al. Ann of Oncol. 2012)。本研究においては当院にてクリゾチニブが投与された EML4-ALK 陽性肺癌、EGFR-TKI (ゲフィチニブ、エルロチニブ) が投与された EGFR 変異陽性肺癌のうち、解析可能なパラフィン包埋組織が残存する症例を対象として、MassARRAY を用いて複数の体細胞遺伝子変異の網羅的解析を行い、得られた遺伝子変異情報と治療効果、予後等の臨床情報との関連性を検討する。

### 1) ドライバー変異陽性肺癌に於ける MassARRAY による体細胞遺伝子変異解析

当科にてクリゾチニブが実施された EML4-ALK 陽性非小細胞肺癌症例、及び EGFR-TKI (ゲフィチニブ、エルロチニブ) が投与された EGFR 変異陽性肺癌のうち、解析可能なパラフィン包埋組織が残存する症例 (ALK 変異肺癌 30 例、EGFR 変異肺癌 70 例) を対象とし、MassARRAY を用いて体細胞遺伝子変異解析を行う。MassARRAY システムの OncoCarta® パネルでは現在 600 以上の遺伝子変異部位の測定が可能とされているが、これらのパネルの中から我々は非小細胞肺癌にて報告されている主要な癌遺伝子及び

癌抑制遺伝子を選別し、肺癌に対する遺伝子変異解析パネル(LungCarta パネル)を構築した。変異解析を予定している候補遺伝子変異(変異部位数)は以下の通りである。EGFR(20), KRAS(18), ERBB2(8), NRAS(18), ERBB3(1), BRAF(28), MET(5), AKT1(7), FGFR1(2), PIK3CA(16), FGFR2(2), CDKN2A(7), FGFR4(5), PTEN(14), PDGFR(10), RB1(11), p53(11)。本測定ではパラフィンスライド3~4枚よりDNAを抽出しWhole Genome Amplification(WGA)にてDNAを増幅し体細胞変異解析を行う。気管支鏡検査、針生検で得られた微量腫瘍組織を用いた予備的な実験においてこれらの測定系は確立されており、直ちに実施可能である。

## **2) ドライバー変異陽性肺癌に於ける体細胞遺伝子変異と分子標的薬剤の治療効果との相関解析**

MassARRAYで測定された遺伝子変異測定パネルの結果をもとに、治療効果、予後等の臨床情報との相関解析を行う。具体的には、奏効例(CR/PR)と非奏効例(SDもしくはPD)の2群間で、頻度の異なる遺伝子変異に注目することで、分子標的薬の感受性に寄与している候補遺伝子を抽出する。今回の解析対象となるクリゾチニブ既治療ALK融合遺伝子肺癌30症例、EGFR-TKI既治療EGFR変異肺癌70例の臨床情報データベースは構築されており(Takeda M, et al. J Thorac Oncol. 2010 & 2014, Takeda M, et al. Ann of Oncol. 2012) 遺伝子変異解析結果が取得できれば直ちに臨床情報との相関解析を実施可能である。

## **3) 薬剤感受性に寄与する候補遺伝子の in vitro に於ける強制発現及び siRNA による発現抑制による感受性変化の検討**

上記検討から得られた候補遺伝子について、EGFR変異肺癌細胞株、EML4-ALK肺癌細胞株を用い、候補遺伝子をレトロウイルスベクターを用いた強制発現やsiRNAによる発現抑制により、EGFR-TKI、クリゾチニブの感受性に関わるかを検討する。本研究室では、レトロウイルスを用いた種々の遺伝子の強制発現系を確立しており(Okamoto W, et al. Mol Cancer Ther. 2010)、手技的には問題ない。また、EGFR変異肺癌細胞株PC-9、KT-2、KT-4、Ma-1、H1650(Okabe T, et al. Can Res. 2007)、及びEML4-ALK肺癌細胞株であるH2228、H3122を所持している(Tanizaki J, et al. Br J Cancer. 2012)。候補遺伝子変異の強発現株と、その親株の肺癌細胞株において、薬剤暴露により引き起こされる下流シグナルの変化とアポトーシスについて、それぞれ、Westernblot法とAnnexin法にて比較検討する。これらの系はすでに我々の研究室にて確立しており実施可能であり、候補遺伝子の生物学的意義を明らかにする。

## **本研究を遂行する上での具体的な工夫**

ALK陽性非小細胞肺癌30症例の検体は、ALK融合遺伝子陽性非小細胞肺癌に対する白金製剤の治療効果を検討した症例(Takeda M,

et al. Ann of Oncol. 2012)、EGFR変異肺癌約70例の検体は、EGFR遺伝子変異陽性肺癌に於いて、EGFR-TKIの治療効果を検討した症例(Takeda M, et al. J Thorac Oncol. 2010 & 2014)を利用する為、本研究に於けるパラフィン包埋組織からのDNA抽出作業の一部を省くことができる。

## **4. 研究成果**

2013年7月~2015年3月に近畿大学で診断された肺癌110例を前向きに解析しホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍検体からDNA, RNA抽出後遺伝子変異解析実施例は、それぞれ95%、96%と高率で実施可能であった。少なくとも1つ以上のアミノ酸置換を生じる遺伝子変異は69%の症例に認められ、薬剤感受性に関与するActionable遺伝子変異は40%に同定され、Actionable遺伝子変異有り且つ分子標的薬導入群は、変異無し群、及び、Actionable遺伝子変異有り且つ分子標的薬導入無し群と比較し、有意に全生存期間を延長することを示しマルチ遺伝子パネルの臨床的有用性を示すことができた。

## **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5件)

1. Takeda M, Nakagawa K, Toxicity profile of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with epidermal growth factor receptor gene mutation-positive lung cancer. Mol Clin Oncol,6(1);3-6.2017.
2. Takeda M, Sakai K, Okamoto K, Hayashi H, Tanaka K, Shimizu T, Nishio K, Nakagawa K. Genome sequencing for nonsmall-cell lung cancer identifies a basis for nintedanib sensitivity. Ann Oncol. 2016 Apr;27(4):748-750,2016.
3. Watanabe S, Takeda M, Takahama T, Iwasa T, Tsurutani J, Tanizaki J, Shimizu T, Sakai K, Wada Y, Isogai N, Nishio K, Nakagawa K. Successful human epidermal growth receptor 2-targeted therapy beyond disease progression for extramammary Paget's disease. Invest New Drugs.34(3);394-396,2016.
4. Takeda M, Nakagawa K. Role of EGFR Monoclonal Antibodies in the Management of Non-small Cell Lung Cancer. Curr Cancer Drug Targets.15(9);792-802,2015.
5. Takeda M, Sakai K, Terashima M, Kaneda H, Hayashi H, Tanaka K, Okamoto K,

Takahama T, Yoshida T, Iwasa T, Shimizu T, Nonagase Y, Kudo K, Tomida S, Mitsudomi T, Saigo K, Ito A, Nakagawa K, Nishio K. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. Ann Oncol.26(12);2477-82, 2015.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織 (1)研究代表者

武田 真幸 (TAKEDA, Masayuki)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：20510928