様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：３２６６６
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：２６４６２０３０

研究課題名（和文）cell free DNAを用いたEGFR阻害剤耐性獲得機序解明

研究課題名（英文）Interpretation for the mechanism of acquired resistance of EGFR blockade by using cell free DNA

研究代表者

山田　岳史（Yamada, Takeshi）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：５０３０７９４８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：臨床検体を用いて以下のことを明らかにした。(1) 転移を有する原発巣KRAS野生型の約10%で循環DNAから変異型KRASが検出され、これらの症例では抗EGFR抗体による腫瘍縮小効果が得られない。(2)循環DNAのKRAS, BRAFが野生型であれば90%の確率でEarly Tumor Shrinkage (ETS)が得られる。(3)抗EGFR抗体の2次耐性を獲得する前に、80%の症例で循環DNAからKRAS変異が、40%からBRAF変異が検出される。

研究成果の概要（英文）：KRAS mutation is detected in circulating cell-free DNA of 10% of patients with KRAS wild colorectal cancer. EGFR blockade has no cyto-reductive effect in those patients. EGFR blockade has cyto-reductive effect in patients with both KRAS and BRAF wild in primary tumor and circulating cell free DNA. KRAS mutation is detected in circulating cell free DNA of 80% of patients who have got acquired resistance to EGFR blockade. Also, BRAF mutation is detected in circulating cell free DNA of 40% of patients who have got acquired resistance to EGFR blockade.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌　抗EGFR抗体　Liquid biopsy　Circulating DNA　Circulating tumor DNA

１．研究開始当初の背景

抗 EGFR 抗体は切除不能大腸癌患者の生存期間を延長させたが、原発巣が KRAS 野生型であっても 1 次耐性を示す症例があり、またいずれ 2 次耐性をきたすが、そのメカニズムは明らかでない。

1 次耐性の原因としては discordance、すなわち原発巣が KRAS 野生型であっても転移巣が KRAS 変異型であることが想定される。2 次耐性の原因としては emerging mutation、すなわち KRAS 野生型腫瘍に対し抗 EGFR 抗体を投与し続けることで KRAS が変異することが想定される。

Discordance、emerging mutation はいずれも転移巣で生じる現象であることから転移巣よりサンプルを採取し解析する必要があるが、転移巣の多くは肝または肺であり、サンプル採取は侵襲的である。

我々はこれまでに循環 DNA(circulating cell free DNA; ccfDNA)を用いて KRAS 変異症例の約 9 割で KRAS 変異を同定できることを報告してきた。ccfDNA を用いることで discordance や emerging mutation を同定できる可能性がある。

２．研究の目的

原発巣 KRAS 野生型症例における抗 EGFR 抗体の 1 次耐性および 2 次耐性のメカニズムを明らかにする。

原発巣 KRAS 野生型であっても 20-30%の症例では抗 EGFR 抗体が奏効しない。このうち Discordance が原因となる症例がどの程度存在するのか、また Discordance がない症例が奏効しない原因を解明する。

EGFR 阻害剤治療により、末梢血内に変異型 KRAS が出現する頻度、出現するまでの期間、および変異型 KRAS の出現と治療効果の相関を検証する。さらに、EGFR 阻害剤による KRAS 以外の genetic あるいは epigenetic な変化をダイナミックに解析し、EGFR 阻害剤の 2 次耐性獲得の機序を解明する。研究で得られた知見を基に大腸癌の real-time personalized therapy のアルゴリズムを確立する。

癌患者の末梢血からは ccfDNA 以外に循環腫瘍細胞(circulating tumor cell; CTC)が採取できる。これまでは CTC が採取できる症例が少なく、また採取できても十分な DNA 量が抽出できなかったため、CTC を用いた変異解析が行えなかった。しかし新たな CTC 採取機器が次々と開発されているため、変異解析に最も適した CTC 採取機器を選定することも本研究の目的とした。

３．研究の方法

1)EGFR 阻害薬を投与する大腸癌患者を対象とし、治療前、治療中、治療終了後の ccfDNA を採取し、KRAS、BRAF、S492R 等の変異を同定する。
2) ccfDNA の KRAS、BRAF、S492R 等の変異が抗 EGFR 抗体の 1 次耐性に関与するか検証する。
3)ccfDNA の KRAS、BRAF、S492R 等の変異が抗 EGFR 抗体の 2 次耐性に関与するか検証する。
4)化学療法開始 2-3 ヶ月後の CT で PR 以上の効果が得られた症例を奏効例とする。
5)ccfDNA が抗 EGFR 抗体の 1 次および 2 次耐性の予測に有用であるかを検証するための pilot study を行う。
6)pilot study の結果を元に他施設共同研究を企画する。

４．研究成果

ccfDNA を用いて抗 EGFR 抗体の 1 次および 2 次耐性を予測するための biomarker 開発を目的とした 30 例の pilot study から以下の知見が得られた。
1)原発巣 KRAS 野生型大腸癌のうち 10%の症例では ccfDNA から KRAS 変異が同定される。
2)ccfDNA から KRAS 変異または BRAF 変異が同定された症例では抗 EGFR 抗体が奏効しない。
3)原発巣と ccfDNA が共に KRAS、BRAF 野生型で抗 EGFR 抗体が奏効しなかった症例は 1/26 (4%)のみであり、その他の症例では Early Tumor Shrinkage (ETS)が得られた。
4)抗 EGFR 抗体に対し 2 次耐性を獲得した症例の 90%では ccfDNA から KRAS、BRAF、S492R のいずれか、あるいは複数の変異が同定された。
5)いくつもの CTC 採取機器を試用した結果、Thermo Fisher Scientific 社の LiquidBiopsy™ が最も CTC、DNA 採取量が多かった。同機を用いることで、転移を有するほとんどの症例で CTC が採取可能であり、更に次世代シーケンサーを用いた Target sequence および digital PCR を用いた KRAS、BRAF の変異解析を行えることがわかった。

以上の結果から以下の 2 つの臨床研究を計画した。
1)原発巣 KRAS 野生型症例における ccfDNA の KRAS、BRAF 変異が抗 EGFR 抗体効果予測の negative biomarker となるかを検証する他施設共同研究：約 10%に KRAS 変異を認めることが予測される。100 例中 10 例程度に KRAS 変異が同定されることが予想され、この場合に 95%信頼区間は 4-16%となる。原発巣、ccfDNA ともに KRAS、BRAF 野生型で抗 EGFR 抗体が奏効しなかったのは 1 例(4%)のみであり、この症例の解析からは KRAS、BRAF の discordance 以外の原因は同定できなかった。90 例の concordance 症例で非奏効例が 4%存在すれば 3-5 例程度のサンプルが収集できる。
2)原発巣 KRAS 野生型で抗 EGFR 抗体に 1
ことが予測され、この場合の 95%信頼区間は 71-89%になる。

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　1　件）

Takeshi Yamada, Takuma Iwai, Goro Takahashi, Hayato Kan, Michihiro Koizumi, Akihisa Matsuda, Seiichi Shinji, Aya Yamagishi, Yasuyuki Yokoyama, Atsushi Tatsuguchi, Tatsuro Kawagoe, Shiro Kitano, Masato Nakayama, Satoshi Matsumoto, Eiji Uchida. Utility of KRAS mutation detection using circulating cell-free DNA from patients with colorectal cancer. **Cancer Science** (2016) 107 (7): 936-43.
doi: 10.1111/cas.12959.

〔学会発表〕（計　14　件）

1. Yamada T, Koizumi M, et al. Liquid biopsy detection of KRAS and BRAF mutations may be useful as a prognostic or predictive marker. **European Society for Medical Oncology 2014　Barcelona**
2. Iwai T, Yamada T, Koizumi M, et al. Prediction and response evaluation of EGFR blockade for colorectal cancer using circulating cell-free DNA. **American association for Cancer Research 2015 Philadelphia**
3. Takahashi G, Yamada T, Koizumi M, et al. Novel, highly sensitive molecular biomarkers for metastatic colorectal cancer. **European Society for Medical Oncology Asia 2015 Singapore**
4. Yamada T, Koizumi M, et al. Prediction and response evaluation of EGFR blockade for colorectal cancer by using circulating cell free DNA. **American association for Cancer Research 2016 New Orleans**
5. Yamada T, Koizumi M, et al. Tracking emerging KRAS and BRAF mutations through ccfDNA in colorectal cancers treated with EGFR blockade. **European Society for Medical Oncology 2016 Copenhagen**
6. Yamada T, Koizumi M, et al. Tracking emerging KRAS, BRAF and EGFR mutations through circulating cell-free DNA in patients with colorectal cancers treated by epidermal growth factor receptor blockade. **ASO-GI 2017 San-Francisco**
7. **山田岳史、小泉岐博、他。第** 101 **回日本消化器病学会シンポジウム**(2015) Liquid biopsy **を用いた抗** EGFR **抗体の効果予測と耐性化の早期予測**
8. **山田岳史、小泉岐博、他。第** 26 **回日本消化器癌発生学会シンポジウム**(2015) EGFR blockade induce KRAS mutation in colorectal cancer
9. **山田岳史、小泉岐博、他。第** 70 **回日本大腸肛門病学会シンポジウム**(2015) Circulating cell free DNA **を用いた大腸癌集学的治療：**Multi-biopsy **による** Real time personalized therapy
10. **山田岳史、小泉岐博、他。第** 116 **回日本外科学会総会パネルディスカッション**(2016)　**末梢血を用いた** Multi liquid biopsy **による大腸癌** Real time personalized therapy
11. **山田岳史、小泉岐博、他。第** 71 **回日本消化器外科学会ワークショップ**(2016) **循環** DNA **を用いた大腸癌新規バイオマーカーの開発**
12. **山田岳史、小泉岐博、他。第** 27 **回日本消化器癌発生学会シンポジウム**(2016) **抗** EGFR **抗体は** BRAF **変異を誘導する**
13. **山田岳史、小泉岐博、他。**JDDW **ワークショップ**(2016)　Circulating cell free DNA **を用いた大腸癌に対する抗** EGFR **抗体の効果および耐性予測**
14. **山田岳史、小泉岐博、他。第** 71 **回日本大腸肛門病学会シンポジウム**(2016) Circulating cell free DNA **を用いた** real-time **な分子情報に基づく大腸癌化学療法**

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　1　件）

名称：末梢血中のがん遺伝子変異検出方法
発明者：山田岳史、高橋吾郎、北野史朗
権利者：同上
種類：特許
番号：2017-005102
出願年月日：2017 年 1 月 16 日
国内外の別：　国内

○取得状況（計　1　件）

名称：健康状態の評価方法及び抗がん剤に対する長期奏功性の予測方法
発明者：山田岳史、岩井拓磨、北野史朗
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2016/070963
取得年月日：2016 年 7 月 15 日
国内外の別：国内・国外

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究代表者
　山田岳史（Yamada, Takeshi）

日本医科大学　医学部　准教授
研究者番号：50307948

(2)研究分担者

小泉岐博（Koizumi, Michihiro）
日本医科大学　医学部　助教
研究者番号：40328802

(3)連携研究者

（　　　）

研究者番号：

(4)研究協力者

（　　　）