

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06878

研究課題名(和文) VHL変異を標的とした悪性胸膜中皮腫の新規治療法開発研究

研究課題名(英文) Development of VHL-targeted therapy in malignant pleural mesothelioma

研究代表者

洪 泰浩 (Koh, Yasuhiro)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80426519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：VHL変異を有する悪性胸膜中皮腫における分子生物学的特性に関する検討を行った。VHL変異悪性胸膜中皮腫細胞株においてはHIF-1の恒常的活性化を認め、HIF-1阻害剤でのアポトーシスの誘導による増殖抑制効果を認めた。HIF-1のノックダウン実験の結果からは、純粋なHIF-1阻害のみでは増殖抑制には十分でないことが示され、HIF-1は重要な治療標的であるが、単独での阻害では十分な効果が得られない可能性が示唆された。今後は併用療法を含めたさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We previously reported on VHL mutations in malignant pleural mesothelioma (MPM) patients' samples. Here we conduct in vitro study to access the therapeutic approaches in VHL-mutant MPM. MPM cell lines with or without VHL mutation were used in this study. Molecular targeted agents were tested for growth-inhibitory effect and the effects of HIF-1 knockdown by siRNA were also evaluated in these cell lines. NCI-H28 MPM cells harboring VHL L89H mutation were sensitive to YC-1, known as a hypoxia inducible factor (HIF)-1 inhibitor, and YC-1 treatment induced massive apoptosis. YC-1 had no effect in the other MPM cells without VHL mutations. Knockdown of HIF-1 by siRNA partially inhibited the growth of NCI-H28 cells, suggesting additional blockade may be required for complete shutdown of growth signaling. Further investigation is necessary to detect other molecules relevant to VHL-HIF pathway for the development of better therapeutic approaches.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 VHL変異 がん個別化医療

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国における悪性新生物による死亡数において、肺がんが男性では第1位、女性では第2位となっており、治療成績の向上が喫緊の課題である。近年、その発症および進行に關与する重要な遺伝子異常が同定され、それらに対する分子標的薬の開発も進んでいる。進行期肺がんにおいては現在4つの標的遺伝子の変異に対してそれぞれ分子標的薬が開発され、いくつかは保険収載されている。上皮成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor; 以下、EGFR) 遺伝子変異陽性例に対するチロシンキナーゼ阻害剤(TKIs: gefitinib, erlotinib, afatinib) がそれまでの標準化学療法を凌駕する治療効果を示し、未分化リンパ腫リン酸化酵素(Anaplastic Lymphoma Kinase) 融合遺伝子異常に対する crizotinib および BRAF 遺伝子変異に対しては vemurafenib がそれぞれ高い治療効果を示している。KRAS 変異に対しては、CD4/6 阻害剤が期待されており、現在臨床開発中である。

(2) 申請者は、肺がんを中心とした悪性腫瘍における新薬開発に長年従事し、多施設臨床試験グループにおいて数多くの臨床試験を遂行し、標準治療法を確立してきた。その中で、バイオマーカーや薬理ゲノミクスを中心に、特に次世代シーケンシングを利用したゲノム研究を通じて「個別化医療」の改善に関する研究を行ってきた。申請者はこれらの研究を通して、肺がんの究極的個別化医療の実現のためには、治療標的となる遺伝子における低頻度変異アリルの検出を可能とする、高感度および高精度の検出法の確立が不可欠であるとの認識を持つに至った。また高感度検出系は、侵襲性が低く繰り返し採取可能な末梢血を中心とした液性検体を用いた診断法(いわゆるリキッドバイオプシー)の確立においても不可欠である。本研究においては、既存の方法を遙かに凌駕する感度(0.001%)を実現したデジタル PCR 技術を用いての変異検出法の確立および複数の遺伝子変異を同時に検出できるマルチプレックス検出系の開発および確立に取り組む。デジタル PCR 技術を用いたマルチプレックス検出については克服すべき技術的な課題があるが、実現できれば、スループットとコストにおける問題解決にもつながり、意義は大きい。以上より、実臨床に応用可能なデジタル PCR 法を用いた超高感度マルチプレックス変異検出法の開発とその臨床的意義を検討する研究の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究は、高感度かつ定量的に遺伝子変異を検出する技術であるデジタル PCR 法を用いて、肺がん治療の標的となる複数の遺伝子変異を高感度かつ効率的に測定することを可能とする遺伝子変異測定パネルを開発する試

みである。

3. 研究の方法

(1) 標的遺伝子変異をクローニングしたプラスミドを用いて、複数の遺伝子変異を同時に検出できるデジタル PCR の測定パネルを確立する。具体的には3種類の EGFR 遺伝子変異(L858R、Exon19 Deletion、T790M)を同時に検出する5つのパネル検出系の確立を目指す。

(2) 上記で確立したパネルを用いて、肺がん患者から採取した臨床検体を用いて遺伝子変異検出の評価を行う。既存の方法で検出した変異情報をレファレンスとしてその異同について詳細に検討する。組織検体を用いて検出条件を最適化した後に、末梢血検体と原発組織検体における遺伝子変異の比較を行う。本申請のような広範な遺伝子変異の検出にデジタル PCR を活用した例はなく、臨床における実用化を視野に入れた高感度変異検出手法の開発を目指す。

(3) 上記で確立した解析手法を多施設共同臨床試験において前向きに評価する。腫瘍生検を用いた既存の方法と液性検体を用いたデジタル PCR パネル法との遺伝子変異結果の異同だけでなく、検体の輸送や試料の調整方法を含めて、解析手法の実臨床における忍容性の評価を行う。さらに、測定結果と臨床情報の関連について解析を行い、治療効果、耐性獲得や再発予測等の病態モニタリングのための診断ツールとしての可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) 非小細胞肺がんにおいて重要な3種類の EGFR 変異(L858R、exon 19 deletion、T790M)を同時に測定できるマルチプレックス検出系の確立について、ドロップレット式デジタル PCR 法を用いて取り組んだ。(図1)

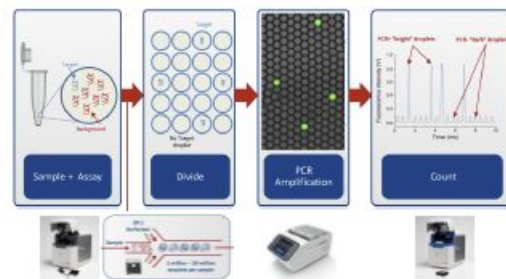


図1. ドロップレット式デジタル PCR 法

まずはプラスミド DNA を用いた系で検討を行った後に、EGFR 活性化変異である L858R、exon 19 deletion と EGFR 阻害剤に対する耐性獲得の原因遺伝子変異である T790M を有する肺がん細胞株から抽出したゲノム DNA を用いての検討を行った(図2)

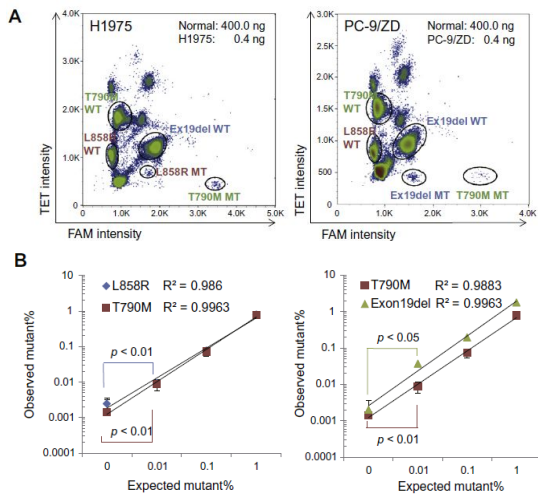


図2 . EGFR 変異のマルチプレックス測定

その検討の結果、3つのEGFR変異について一回のPCR反応によって同時に測定できることを確認した。加えて、鋳型DNA量を希釈しての検討においても検出感度とともに線形性が良好に保たれることを確認した。

(2) マルチプレックス検出系を確立した後に、本検出系の臨床的応用を探索する臨床試験を実施した(図3)。

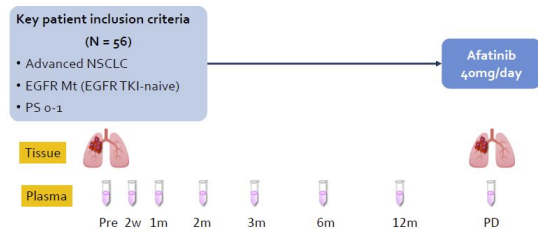


図3 . 試験シエーマ

本臨床試験は日本国内にける多施設共同の前向き試験であり、EGFR阻害剤であるアファチニブ治療を初回治療として受けるEGFR変異陽性の進行非小細胞肺癌患者を対象としたものである。治療前から増悪までの8ポイントにおいて経時的に血液を採取し、血漿より抽出したDNAを用いてEGFR変異の推移を観察し、治療効果及び臨床情報との相関について解析を行う研究である。

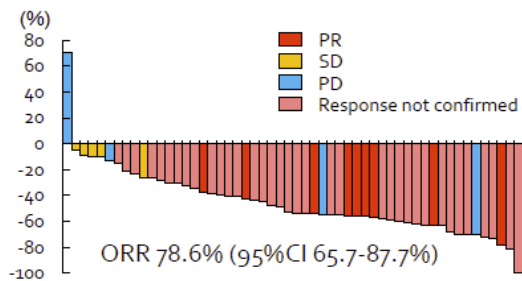
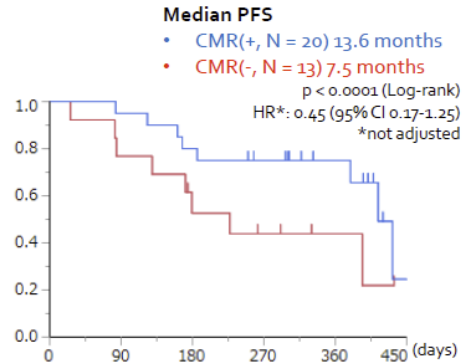


図4 . EGFR 阻害剤に対する奏功

その結果であるが、最終的には56例の解析対象の登録があり、その内訳は男性26例、年齢中央値69歳、非喫煙者31例、病期IIIB/IV/術後再発2/38/16例であった。全体の奏功率は78.6%であり、既報と大きな違いを認めなかった(図4)。登録された症例の各ポイントにおいて採取された血液から抽出した血漿DNAを用いて上記で確立したデジタルPCR法を利用したマルチプレックスEGFR変異検出法にてEGFR変異の有無とそのアレル頻度の測定を行った。

a) PFS: CMR (+) vs (-) at 2W



b) PFS: CMR (+) vs (-) at 4W

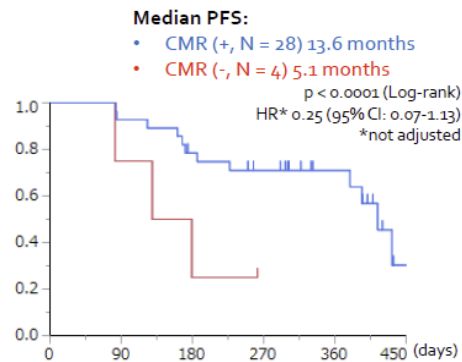


図5 . 血漿DNAにおけるEGFR変異検出の有無と無増悪生存期間の解析(a:治療開始後2週、b:治療開始後4週)

治療開始前に血漿DNAにおいてEGFR変異を検出した症例において、治療開始後2週と4週の時点でのEGFR変異の有無を検討したところ、2週目もしくは4週目の時点でEGFR変異を検出なかった症例群は、EGFR変異を検出する症例群と比較して無増悪生存期間(progression free survival, PFS)が有意に長いことが示された(図5)。このことは治療前のみならず、治療後の早期の時点において血漿DNAを用いてEGFR変異を測定することが、EGFR治療(本試験ではアファチニブ)を受ける患者の中でも、より恩恵を受けることができる患者と、効果が乏しい患者を選別できる可能性があることを示している。本試験結果は治療後のEGFR変異を血漿DNAで測定することの臨床的意義を示した初めての報告であり、非常に大きな意義がある。

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 8件)

Shibaki R, Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N: Nivolumab induced radiation recall pneumonitis after two years of radiotherapy. *Ann Oncol* 28(6): 1404-1405, 2017. doi: 10.1093/annonc/mdx115. (査読あり)

Sawa K, Koh Y, Yamamoto N: PIK3CA mutation as a distinctive genetic feature of non-small cell lung cancer with chronic obstructive pulmonary disease: a comprehensive mutational analysis from a multi-institutional cohort. *Lung Cancer* 112: 96-101, 2017. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.07.039. (査読あり)

Watanabe M, Koh Y: Multiplex Ultrasensitive Genotyping of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer for Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations by Means of Picodroplet Digital PCR. *EBioMedicine* 21: 86-93, 2017. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.06.003. (査読あり)

Kasahara N, Koh Y: Plasma epidermal growth factor receptor mutation testing with a chip-based digital PCR system in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 106: 138-144, 2017. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.02.001. (査読あり)

Takahashi T, Yamamoto N: Prophylactic cranial irradiation versus observation in patients with extensive-disease small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18(5): 663-671, 2017. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30230-9. (査読あり)

Isaka M, Koh Y, Yamamoto N: Comparison of Clinically Relevant Mutation Profiles Between Preoperative Biopsy and Corresponding Surgically Resected Specimens in Japanese Patients With Non-Small-cell Lung Cancer by Amplicon-based Massively Parallel Sequencing. *Clin Lung Cancer*. 2017

Sep;18(5):519-526.e1. doi: 10.1016/j.clcl.2016.11.022. (査読あり)

Iwama E, Akamatsu H: Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for EGFR activating mutations. *Ann Oncol* 28(1): 136-141, 2017. doi: 10.1093/annonc/mdw531. (査読あり)

Sato K, Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N: Correlation between immune-related adverse events and efficacy in non-small cell lung cancer treated with nivolumab. *Lung Cancer* 115: 71-74, 2018. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.11.019.

[学会発表](計 13件)

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N: PD-L1 expression on circulating tumor cells and its comparison with tumor tissues in Japanese lung cancer patients. *AACR 2017*, 2017.4.1-5, Washington DC, USA

Koh Y, Akamatsu H, Yamamoto N: Increased migration ability of osimertinib-resistant EGFR-T790M mutant non-small-cell lung cancer cells. *AACR 2017*, 2017.4.1-5, Washington DC, USA

Koh Y, Akamatsu H, Yamamoto N: Non-invasive identification of tumor cells using near infrared composition imaging system. *AACR 2017*, 2017.4.1-5, Washington DC, USA

Koh Y, Akamatsu H, Yamamoto N: Predictive impact of PD-L1-expressing circulating tumor cells in NSCLC patients treated with nivolumab. *ASCO 2017*, 2017.6.2-6, Chicago, USA

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N: Predictive impact of complete molecular response in plasma: A phase II, liquid biopsy study in EGFR mutated NSCLC patients treated with afatinib (WJOG 8114LTR). *ASCO 2017*, 2017.6.2-6. Chicago, USA

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N: Correlation between immune-related adverse events and efficacy in non-small cell lung cancer treated

with nivolumab. IASLC 18th World Conference on Lung Cancer 2017, 2017.10.15-18, Yokohama, Japan

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N: Is efficacy result in phase 2 trial replicated in phase 3 trial in advanced NSCLC: A meta-analysis. IASLC 18th World Conference on Lung Cancer 2017, 2017.10.15-18, Yokohama, Japan

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N: Updated results of phase II, liquid biopsy study in EGFR mutated NSCLC patients treated with afatinib (WJOG 8114LTR). IASLC 18th World Conference on Lung Cancer 2017, 2017.10.15-18, Yokohama, Japan WJOG 2017.10.15-18, Yokohama, Japan

Akamatsu H, Koh Y, Yamamoto N: Sequential tracking of PD-L1 expression on circulating tumor cells in NSCLC patients treated with nivolumab. AACR-NCI-EORTC 2017, 2017.10.26-30, Philadelphia, USA

Koh Y, Akamatsu H, Yamamoto N: Serial evaluation of multiple serum protein levels in non-small-cell lung cancer patients treated with nivolumab. AACR-NCI-EORTC 2017, 2017.10.26-30, Philadelphia, USA

洪泰浩, 赤松弘朗, 山本信之: Comparison of PD-L1 expression between tumor tissues and circulating tumor cells in patients with lung cancer. 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会, 神戸市, 2017.7.27-29

赤松弘朗, 洪泰浩, 山本信之: ニボルマブ投与を受けた非小細胞肺癌における免疫関連有害事象と効果の相関について. 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会, 神戸市, 2017.7.27-29

洪泰浩, 赤松弘朗, 山本信之: ニボルマブ治療を受けた非小細胞肺癌患者におけるPD-L1陽性血中循環腫瘍細胞の経時的解析. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜市, 2017.9.28-30

〔図書〕(計 4件)

山本信之: 総説 非小細胞肺癌の化学療法. エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック 2017, メディカルレビュー社, p56-p73, 2017

山本信之, 赤松弘朗: 小細胞肺癌. 1336 専門家による私の治療 2017-18 年度版, 監修 猿田享男, 北村惣一郎, 日本医事新報社, p216-p217, 2017

山本信之: 総説 非小細胞肺癌の化学療法. 第1章 - 非小細胞肺癌, エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック 2017, 総監修 大津敦, 第1章 - 非小細胞肺癌監修 山本信之, p56-p73, メディカルビュー社, 東京, 2017

山本信之, 赤松弘朗: 肺癌診療ガイドライン 2017年版. 日本肺癌学会 編, 金原出版株式会社

〔産業財産権〕
出願状況(計 1件)

名称: Method for predicting the durable efficacy of EGFR tyrosine kinases inhibitors in EGFR-mutated non-small lung cancer
発明者: 山本信之, 洪泰浩, 赤松弘朗
権利者: 和歌山県立医科大学
種類: 特許
番号: U.S. Provisional 62/507,010
出願年月日: 2017年5月16日
国内外の別: 外国

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・准教授
研究者番号: 80426519

赤松 弘朗 (AKAMATSU, Hiroaki)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10646582

(3) 連携研究者

菊池 崇史 (KIKUCHI, Takashi)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40649050

(4) 研究協力者

なし