

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09195

研究課題名(和文) BIM遺伝子多型を層別化因子とした原発性肺癌の個別化治療法の確立

研究課題名(英文) Individualized therapy for primary lung cancer: BIM polymorphism as a stratification factor

研究代表者

磯部 和順 (ISOBE, Kazutoshi)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：70385607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌における原発巣のBIM蛋白発現はBIM遺伝子多型の有無に一致せず、約半数程度の症例に認められた。また、BIM遺伝子多型陽性例の全例に腫瘍部または非腫瘍部にBIM が発現しており、BIM遺伝子多型陰性例に比べると有意に高頻度かつ相対定量値も高い傾向にあった。BIM の発現陽性例ではgefitinibのPFSは有意に短い傾向にあり、EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌におけるBIM 発現はgefitinibの予後不良因子である可能性が示唆された。また、腫瘍部のBIM発現はPD-L1発現と有意な正の相関が認められた。

研究成果の概要(英文)：Expression of BIM protein in primary lung tumors in EGFR-mutated lung adenocarcinoma did not correlate with presence of BIM polymorphism, which was noted in about half of patients. In all patients with BIM polymorphism, BIM was expressed in the tumor area or non-tumor area. Moreover, the frequency was significantly higher, and the relative quantification value was nonsignificantly higher, than in patients without BIM polymorphism. Progression-free survival for gefitinib was significantly shorter in patients with positive BIM expression, which suggests that BIM expression is associated with poor prognosis in patients with EGFR-mutated lung adenocarcinoma receiving gefitinib. In addition, BIM expression in the tumor area significantly positively correlated with PD-L1 expression.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：BIM遺伝子多型 PD-L1 BIM

1. 研究開始当初の背景

近年、シンガポール大学の Ong Sin Tiong 博士らによって、B-cell CLL/lymphoma 2-like 11 (BCL2L11, 以下 BIM) 遺伝子イントロン 2 内欠失多型が存在し、そのイントロン内部分欠失を有する慢性骨髄性白血病症例 (CML) がイマチニブに治療抵抗性であることが明らかになった (Zhang M, et al. Mol Cell Biol. 2008)。さらに申請者らのグループはペアドエンド DNA 塩基配列解読法を用いて、BIM をコードする生殖系遺伝子のイントロン内に欠失多型を発見し Nature Medicine の中で報告している (Ng KP, Isobe K, et al. Nat Med. 2012)。この遺伝子多型はヨーロッパ人やアフリカ人には認められず、東アジア人にのみ 12.3% の頻度で認められた。BIM は BCL2 ファミリーに属するアポトーシス促進因子であり、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異が原因となる EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) によるアポトーシス誘導には、BIM の発現上昇が必要である。この多型によって、BIM のスプライシングがエクソン 4 からエクソン 3 に切りかわり、その結果としてアポトーシス促進的に作用する BH3 (BCL2-homology domain 3) を欠失する BIM アイソフォームの発現が引き起こされる。この多型は、CML および EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌の細胞株に EGFR-TKI に対する自然耐性を誘導した。本研究に先立ち、我々は血液検体や切除組織で簡便に BIM 遺伝子多型を検出する 2 通りの PCR 法を開発した。A 法) Intron 2 の欠失部位 (chr 2:111,599,666 to 111,602,568, 2903 bp) を含む primer を設定し増幅する。B 法) Wild allele (174 bp) および Deletion allele (177 bp) それぞれを増幅する。B 法は A 法に比べて検査時間が短く B 法でのスクリーニングが最適であると考えられた。この 2 通りの PCR 法では末梢血液検体およびホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織での検体間での不一致例は認められなかった (Isobe K, et al. J. Thorac. Oncol. 2014)。

我々が確立した PCR 法で、健康な日本人ボランティア 30 例における BIM 遺伝子多型を検索した。興味深いことに健康な日本人ボランティアにも BIM 遺伝子多型は 6/30 例 (20%) で認められた。さらに、2008 年 1 月～2013 年 1 月まで当科で EGFR-TKI にて治療を行った EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者 70 例を対象とし、患者の末梢血液検体および FFPE 組織を用いて PCR 法で BIM 遺伝子多型を検索し、BIM 遺伝子多型陽性肺癌の臨床的特徴、EGFR-TKI の効果および副作用、予後について retrospective に検討した。結果、BIM 遺伝子多型は 13/70 例 (18.6%) に認められ、うち 1 例はホモ欠損で 12 例はヘテロ欠損であった。BIM 遺伝子多型陽性例は BIM 遺伝子多型陰性例と比較して EGFR-TKI の無増悪生存期間 (PFS) が短

く、BIM 遺伝子多型は EGFR-TKI の PFS の独立した予後不良因子であった (Isobe K, et al. J. Thorac. Oncol. 2014)。

2. 研究の目的

本研究は新しい BIM 遺伝子多型の診断方法や治療方法が臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。

(1) BIM 遺伝子多型の有無が判明している EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の手術検体から、PCR 法にて mRNA レベルで BIM のアイソフォーム (BIMEL, BIML, BIMS, BIM-) を同定かつ定量化し、BIM の mRNA レベルでの発現と BIM 遺伝子多型の関連性を明らかにする。

(2) BIM 遺伝子多型の有無が判明している EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌で BIM 免疫染色を行い、BIM 蛋白発現の程度や部位と BIM 遺伝子多型の関連性を明らかにする。BIM 遺伝子多型陽性例の形態学的特徴を検討する。

(3) EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌で EGFR-TKI で耐性を獲得した再発巣の re-biopsy した組織を用いて、EGFR-TKI の獲得耐性 (T790M, MET の増幅, HGF の過剰発現など) と BIM 遺伝子多型の関連性を明らかにする。

(4) EGFR 遺伝子変異陰性の非小細胞肺癌 100 例で BIM 遺伝子多型を新たに検索し、既にスクリーニング済みの EGFR 遺伝子変異陽性例 100 例と合わせ 200 例における殺細胞性抗癌剤や血管新生阻害薬の効果や副作用と BIM 遺伝子多型の関連性を検討する。

3. 研究の方法

本研究では BIM 遺伝子多型の未解明な基礎的な問題を feasibility & robust が高い検出系を用いて検証し、BIM 遺伝子多型を層別化因子とした臨床試験へ展開するための研究基盤を確立する。

(1) RNA レベルと蛋白レベルでの BIM の発現

既に BIM 遺伝子多型の有無が判明している EGFR 遺伝子変異陽性の原発性肺癌の手術検体 50 例を選択し、腫瘍を含む部分と含まない部分のブロックを作成する。腫瘍を含む部分と含まない部分のブロックを RNA 用検体 (10 μm, 3~4 片/1 tube) および、パラフィン包埋法で 3 μm 幅に薄切し、BIM 免疫染色用のスライドを作成する。

RNA レベルでの BIM の発現の解明 BIM のアイソフォームのパターンは数多く報告されているが、特に重要なものは BIMEL, BIML, BIMS, BIM- の 4 つである。BIM 遺伝子多型陽性例では BH3 ドメインを持たないアイソフォームの BIM- の割合が増加する仮説を我々は報告している (Ng KP, Isobe K, et al. Nat Med. 2012)。この仮説を裏付けるために BIM の mRNA レベルでの BIM の発現を検討する。最初に BIM4, BIML, BIMS、

BIM- の4パターンのそれぞれを判別するプライマーを作成する。このプライマーを用いて、RNA用検体をPCR法にてBIM4、BIML、BIMS、BIM- の4つに同定かつ半定量化し、BIMのmRNAレベルで発現パターンと定量値とBIM遺伝子多型の関連性を明らかにする。コントロールとして KCL-22 細胞でも同様の検討を行う。

EGFR 遺伝子変異陽性の原発性肺癌の腫瘍部の BIM 蛋白の発現レベルと EGFR-TKI の効果は相関することが報告されている (Faber AC, et al. Cancer Res. 2011)。このため、腫瘍を含む部分と含まない部分においての免疫染色用の未染色用スライドにおいて、BIM 免疫染色 (Cell Signaling #2997) を行う。免疫染色発現を気管上皮細胞の染色度合いを基準として陰性、弱陽性、強陽性の3段階の評価をおこない、BIM 遺伝子多型の関連性を明らかにする。また、BIM 遺伝子多型陽性肺腺癌の形態学的特徴を検討する。

上記の結果を統合的に解析する。BIM 遺伝子多型と BIM の RNA アイソフォームパターンと BIM 免疫染色のそれぞれの関連性について総括する。また、患者背景、喫煙歴、PS、臨床病期、検査値 (腫瘍マーカー)、画像所見、EGFR-TKI の奏効率、PFS や副作用について比較検討する。

(2) BIM 遺伝子多型と EGFR-TKI の獲得耐性との関連性の解明

BIM 遺伝子多型は EGFR-TKI 自然耐性に分類され、EGFR-TKI の獲得耐性としては約 60% に T790M、その他 MET の増幅、HGF の過剰発現などが報告されている (Ohashi K, et al. J Clin Oncol 2013)。しかし、申請者らの過去の検討では BIM 遺伝子多型陽性例でも獲得耐性を有していた (第 54 会日本肺癌学会学術集会、2013 年 11 月、東京で報告)。このため、自然耐性である BIM 遺伝子多型と EGFR-TKI の獲得耐性の関連性を明らかにする。EGFR-TKI の獲得耐性を獲得した再発巣を re-biopsy した組織 20 例を用いて、T790M の発現、MET の増幅、HGF の過剰発現に関して検索を行い、EGFR-TKI の獲得耐性と BIM 遺伝子多型の関連性を明らかにする。

(3) 殺細胞性抗癌剤の効果や副作用と BIM 遺伝子多型の関連性の解明

EGFR 遺伝子変異陰性非小細胞肺癌の BIM 遺伝子多型の頻度は EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の頻度とあまり変わらないことが報告されている (Zhao M. et al. Cancer 2014)。このため、EGFR 遺伝子変異陰性の非小細胞肺癌 100 例で末梢血や組織で、我々の開発した PCR 法にて BIM 遺伝子多型を新たに検索し、患者背景、喫煙歴、PS、臨床病期、検査値 (腫瘍マーカー)、画像所見、殺細胞性抗癌剤の効果、PFS や副作用についてデータベースを作成する。

殺細胞性抗癌剤の効果や副作用と BIM 遺伝子多型の関連性は明らかにされていない

ものの、基礎実験ではタキソールとシスプラチンとゲムシタピンでは BIM の RNA レベルとアポトーシスは相関しないことが報告されている (Faber AC, et al. Cancer Research 2011)。今回スクリーニングを行った EGFR 遺伝子変異陰性の非小細胞肺癌 100 例と以前スクリーニングを行った EGFR 遺伝子変異陽性 100 例を合わせた 200 例を統合解析し、殺細胞性抗癌剤シスプラチン、カルボプラチン、ドセタキセル、ペメトレキセド、S-1、ナベルピン、ゲムシタピンなど) または血管新生阻害薬 (ベバシズマブ等) の効果や副作用と BIM 遺伝子多型の関連性を検討する。

4. 研究成果

(1) BIM 遺伝子多型の有無が判明している EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌の術後再発症例 33 例 (BIM 遺伝子多型: 陽性 6 例、陰性 27 例) における手術検体を用いて腫瘍部および非腫瘍部における免疫染色用の未染色用スライドを使用して、BIM 免疫染色 (Cell Signaling #2997) を行った。免疫染色発現を気管上皮細胞の染色度合いを基準として陰性、弱陽性、強陽性の 3 段階の評価をおこない、BIM 遺伝子多型の関連性を明らかにした。結果、EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌における原発巣の BIM 蛋白発現は BIM 遺伝子多型の有無に一致せず、約半数程度の症例に認められた。

(2) mRNA の isoform である BIM-EL, L, S, を区別可能なプライマーセットを作成し、Real-time PCR 装置 (Thermal Cycler Dice; Real Time System) で解析を行った。また、FFPE サンプルの RNA 断片化を考慮してリファレンス gene (GAPDH) にて各サンプルごとの発現量を補正し、ターゲットとなる遺伝子の mRNA 発現量を確認した。結果、BIM は 8/33 例 (24.2%) に発現が認められた。BIM 遺伝子多型陽性例では BIM は全例 (腫瘍部: 2 例、非腫瘍部: 2 例) で発現を認め、BIM 遺伝子多型陰性例の BIM の発現頻度と比較すると有意に高頻度であった (100% vs. 13.8%, $p = 0.0016$)。さらに、BIM- の発現量は BIM-EL, L, S より有意に高値であった (12.0 ± 15.1 vs. 276.3 ± 163.6 , $p = 0.0018$)。

(3) ゲフィチニブで加療を行い、既に BIM 遺伝子多型の有無が判明している EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌の術後再発症例 33 例の手術検体からのホルマリン固定パラフィン包埋スライドを用いて、同一サンプルの腫瘍部および非腫瘍部の BIM と PD-L1、HER2、MET、VEGFA、PUMA、EGFR の mRNA 発現を PCR 法にて検索し、KCL22 細胞を calibrator としてそれぞれを相対定量し比較検討した。BIM 遺伝子多型陽性例の全例に腫瘍部または非腫瘍部に BIM- が発現しており、BIM 遺伝子多型陰性例に比べると有意に高頻度かつ相対定量値も高い傾向にあった。BIM- の発現陽性

例ではgefitinibのPFSは有意に短い傾向にあった(median:304日 vs .732日、 $p=0.023$)。以上よりEGFR遺伝子変異陽性肺腺癌におけるBIM- 発現はgefitinibの予後不良因子である可能性が示唆された。

(4) 腫瘍部のPD-L1発現陽性例ではBIMが有意に高発現で、VEGFAは有意に低発現であった($p=0.049$ 、 $p=0.009$)。HER2、MET、PUMA、EGFRの発現には有意差は認めなかった。また、腫瘍部のPD-L1の相対定量値はBIMと有意な正の相関を認め($r=0.41$ 、 $p=0.019$)、VEGFAと有意な負の相関を認めた($r=-0.33$ 、 $p=0.043$)。また、腫瘍部のPDL1陽性群は陰性群と比較してゲフィチニブの無増悪生存期間は有意に短い傾向にあった(中央値:283日vs. 584日、 $p=0.05$)。

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3件)

Isobe K, Kakimoto A, Mikami T, Kaburaki K, Kobayashi H, Yoshizawa T, Makino T, Otsuka H, Sano GO, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Tochigi N, Iyoda A, Homma S. PD-L1 mRNA expression in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Oncology Report*, 査読あり、40巻、2018、331-338
DOI: 10.3892/or.2018.6442.

Soh SX, Siddiqui FJ, Allen JC, Kim GW, Lee JC, Yatabe Y, Soda M, Mano H, Soo RA, Chin TM, Ebi H, Yano S, Matsuo K, Niu X, LuS, Isobe K, Lee JH, Yang JC, Zhao M, Zhou C, Lee JK, Lee SH, Lee JY, Ahn MJ, Tan TJ, Tan DS, Tan EH, Ong ST, Lim WT. A systematic review and meta-analysis of individual patient data on the impact of the BIM deletion polymorphism on treatment outcomes in epidermal growth factor receptor mutant lung cancer. *Oncotarget*, 査読あり、8巻、2017、41474-41486
DOI: 10.18632/oncotarget.17102

Isobe K, Kakimoto A, Mikami T, Kaburaki K, Kobayashi H, Yoshizawa T, Makino T, Otsuka H, Sano GO, Sugino K, Sakamoto S, Takai Y, Tochigi N, Iyoda A, Homma S. Association of BIM Deletion Polymorphism and BIM- RNA Expression in NSCLC with EGFR Mutation. *Cancer Genomics Proteomics*, 査読あり、13巻、2016、475-482

[学会発表](計5件)

磯部和順, 一色琢磨 鍋木教平, 小林 紘, 卜部尚久, 伊藤貴文, 澤田哲郎, 佐野 剛, 坂本 晋, 高井雄二郎, 伊豫田 明, 澁谷和俊, 本間 栄、特発性肺線維症にお

けるBCL2L11遺伝子多型とレドックスの検討、第58回日本呼吸器学会、2018年
磯部和順, 鍋木教平, 小林紘, 吉澤孝浩, 牧野 崇, 大塚 創, 柿本篤志, 栃木直文, 三上哲夫, 伊豫田 明, 本間 栄、EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌術後再発例におけるPD-L1のmRNA発現の検討、第57回日本肺癌学会学術集会 2016年
磯部和順, 鍋木教平, 小林紘, 吉澤孝浩, 牧野 崇, 大塚 創, 柿本篤志, 栃木直文, 三上哲夫, 伊豫田 明, 本間 栄、EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌におけるPD-L1のmRNA発現の検討、第14回日本臨床腫瘍学会学術集会、2016年
磯部和順, 鍋木教平, 吉澤孝浩, 小林紘, 柿本篤志, 高井雄二郎, 栃木直文, 伊豫田明, 三上哲夫, 本間栄, EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌におけるBIM-isoform発現の検討、第56回日本呼吸器学会学術集会、2016年
磯部和順, 秦美暢, 栃木直文, 鍋木教平, 吉澤孝浩, 小林紘, 佐野剛, 杉野圭史, 坂本晋, 高井雄二郎, 柿本篤志, 伊豫田明, 三上哲夫, 本間栄, EGFR遺伝子変異陽性肺腺癌におけるBIM遺伝子多型と原発巣のBIM蛋白発現の関連性の検討、第56回日本肺癌学会学術集会、2015年

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯部 和順 (ISOBE, Kazutoshi)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号: 7 0 3 8 5 6 0 7

(2)連携研究者

鍋木 教平 (KABURAKI, kyouhei)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号: 0 0 4 3 9 9 4 4