

令和元年6月12日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10149

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の循環腫瘍細胞を用いた個別化医療の開発と耐性機序の解明に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of personalized medicine for melanoma and mechanism of drug resistance using circulating tumor cells.

研究代表者

木庭 幸子(Kiniwa, Yukiko)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：20436893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫における循環腫瘍細胞(CTC)のバイオマーカーとしての可能性を探索するために、病期ごとのCTC数の解析、治療経過中のCTC数の推移の解析、および質的变化の解析を行った。(1)ステージⅠの術前患者と遠隔転移を有する進行期患者ではステージが進むにつれて数が増える傾向を予測したが有意差が見出されなかった。(2)ダブラフェニブ+トラメチニブを投与された患者では、腫瘍の抗腫瘍効果とCTC数の推移が相関する傾向がみられた。(3)進行期悪性黒色腫患者のCTCの体細胞遺伝子変異の解析を行ったところ、CTCにはリンパ節転移にみられた変異以外にも多様な体細胞変異が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではCTCの多様性を示すとともに、個別化医療の標的となる体細胞変異を検出できる可能性を示した。また、分子標的治療の治療効果と相関することが示され、治療効果予測のバイオマーカーとしても有用であるとともに、血液は転移病巣にくらべて採取しやすいため治療薬の選択にも役立つ。解析手法の複雑性が課題であり、より簡便で迅速な解析方法の開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：In this study, circulating tumor cells (CTCs) from melanoma patients were analyzed. CTCs were detected from the early stage, suggesting that CTCs may be provided from primary tumors as well as metastasis. In addition, number of CTCs changed with disease progression/remission during target therapies. Further, CTCs showed heterogenous somatic mutations. For example, CTCs from a patients with BRAF K601E revealed BRAF V600E and V600A as well as K601E. Our study clarified that CTCs are an important indicator of the potential for poor prognosis, treatment response, and disease recurrence.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：悪性黒色腫 循環腫瘍細胞 病期 分子標的治療薬 体細胞変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性黒色腫の個別化医療の到来

2014年に本邦において抗PD-1抗体治療薬ニボルマブが承認され、悪性黒色腫に対する治療薬が30年ぶりに発売された。現在、切除不能悪性黒色腫の第1選択薬として広く用いられている。2015年にはBRAF変異阻害薬ベムラフェニブ、および抗CTLA4抗体治療薬イピリムマブが発売され、悪性黒色腫に対する治療は大きく変化した。ニボルマブとイピリムマブはがん微小環境における抑制的な免疫チェックポイント分子を制御する薬剤であり、2018年以降には両者の併用が承認された。また、ベムラフェニブは悪性黒色腫の進展に強く関わる分子異常で、かつ高頻度に認められるBRAF遺伝子の変異を標的にする薬剤である。ベムラフェニブに続いてダブラフェニブ+トラメチニブもBRAF変異の分子標的薬として発売された。いずれも、従来の抗悪性腫瘍治療薬とは全く異なる機序で作用し、より高い抗腫瘍効果を発揮する。悪性黒色腫においては、MAPK経路、PI3K経路が強く活性化しており、これらの経路に主要な癌遺伝子と癌抑制遺伝子が集中している。近年、世界規模で全エクソーム解析やコピー数異常の解析が行われ、既知の遺伝子異常以外のマイナーな分子異常も次々と明らかになってきた。今後、新規の分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の開発が進み、個別化医療のさらなる展開が予想される。今後の課題として、新規治療薬の薬剤耐性の機序の解明と予測に役立つバイオマーカーの探索が急務である。

(2) 悪性黒色腫の遺伝学的多様性

悪性黒色腫には病型ごとに分子遺伝学的な多様性があり、人種間での分子異常の違いは発生する病型の頻度差に起因する(Bastian C, Annu Rev Pathol Mech Dis. 2014,)。とくに、白人と有色人種では大きな違いがある。目下のところ、近年報告されたマイナーな遺伝子変異の日本人悪性黒色腫患者における頻度はまだ十分解明されていない。したがって、本邦で悪性黒色腫の個別化医療を進めるためには、日本人における遺伝子変異をマイナーな遺伝子変異を含めて、いくつか組み合わせてバイオマーカーとすることが望ましい。

(3) 個別化医療に必要なバイオマーカー

悪性黒色腫では経過とともにゲノム異常が変化し、原発巣と転移巣で異なることも稀ではない。すなわち、転移が出現した時点で治療法を選択する際に、参考にすべきゲノム異常を原発巣の解析のみに頼ることは正確性に欠ける危険性がある。しかしながら、転移巣から腫瘍組織の採取は、アプローチが困難で、侵襲が大きすぎるために、実現できないことが少なくない。そこで、個別化医療を考える上で有用なバイオマーカーとして、頻回に採取できる血液を用いたマーカーが理想的である。循環腫瘍細胞(以下CTC)もその1つであり、研究代表者らは、これまでCTCの解析を行い、その有用性を示してきた。末梢血は頻回に採取することができる上、リアルタイムに患者体内に存在する腫瘍のゲノム異常を知ることができるため大変有用である。さらに同じタイムポイントで分離されたリンパ球などの免疫担当細胞を用いて抗腫瘍免疫応答を解析することも可能である。これらのデータは、治療薬の選択や効果予測に役立つことが期待できる。また、経過中の変化を解析することにより、耐性機序の解明や予後予測に有用なバイオマーカーを探索する上でも有用と思われる。

2. 研究の目的

上述のように、進行期悪性黒色腫の治療は個別化医療の時代に入ったと言えるが、多様な悪性黒色腫の分子異常に対応すべきバイオマーカーは十分ではない。また悪性黒色腫はゲノム異常が非常に多く、経過中に変化することも稀ではない。さらに、BRAF変異阻害薬の耐性の機序も十分に解明されておらず、まだ多くの課題が残されている。本研究では、末梢血に存在する悪性黒色腫のCTCを同定し、CTCを用いて治療中に変化するゲノム異常、免疫チェックポイント分子発現などをリアルタイムにモニタリングする手法の確立を試みる。切除不能悪性黒色腫の個別化医療に役立つ分子異常の解析と耐性機序の解明を通して、日本人に適した個別化医療の確立を目指す。

3. 研究の方法

末梢血を流れるCTCは、末梢血の単核球(リンパ球や単球など)と同等の比重である。全血を比重法で処理し、単核球が含まれる分画を分離したのち、白血球のマーカーと悪性黒色腫のマーカーを用いて、CTCを識別することとした。本研究においては、白血球のマーカーとしてCD45 PEを用い、悪性黒色腫のマーカーとしては免疫染色にも標準的に用いられるMART-1とgp100のカクテルを用い、Alexa fluor 488を標識した2次抗体を使用し、細胞内染色を施

した。これを蛍光顕微鏡で撮像した画像を用いて測定を行うこととした。また、細胞の質的解析のためには、同定した CTC を分取し解析を行った。

(1) CTC の同定

CTC の検出条件の設定のために、健常人白血球に培養悪性黒色腫細胞を混和したものと混和しないものを準備し、それぞれの悪性黒色腫細胞を測定した。健常人で 1 個以下の検出を閾値とすべく、CD45 PE と MART-1/gp100 Alexa 488 の検出設定を行った。つぎに、患者末梢血を比重法で単核球分画を分離して保存しておいたものを融解して測定に用いた。健常人では 1 個以下の条件で CTC 数を測定した。

(2) 悪性黒色腫患者の病期ごとの CTC 数の解析

悪性黒色腫のステージ I ~IV の患者各 5 名ずつと健常人 5 名の末梢血 4 mL を用いて、CTC 数を測定した。ステージ間の CTC 数に有意差の有無を t 検定で統計処理を行った。

(3) 治療経過中の数的変化の解析

分子標的治療：ダブラフェニブ+トラメチニブ、ならびに免疫チェックポイント阻害薬：PD-1 抗体治療薬により治療を受けている悪性黒色腫患者から、治療前・治療開始 2 週間後・1 ヶ月後・3 ヶ月後・6 ヶ月後のタイムポイントで末梢血を採取し単核球を分離保存しておく。前述の方法で末梢血 4mL 中の CTC を測定し、CTC 数と病勢を比較した。病勢の評価項目として、血清 LDH および、悪性黒色腫の腫瘍マーカーである 5-S-CD を用いた。また、適宜 RECIST ver.1.1 による抗腫瘍効果を組み合わせた。

(4) 質的变化の解析：CTC の体細胞遺伝子変異の解析

母趾原発で、鼠径リンパ節に転移をきたした悪性黒色腫患者から CTC を分取し、DNA を抽出し、nest PCR で増幅したのち、*BRAF*V600 変異についてサンガー法で解析した。治療経過との相関を調べた。

(5) CTC を用いた癌遺伝子 / 癌抑制遺伝子のパネル解析

分取した CTC のシングルセル から全ゲノム増幅を行い、得られた DNA をエマルジョン PCR と癌遺伝子・癌抑制遺伝子のパネル解析をするため、タカラバイオに委託した。このとき、胚細胞対照として白血球もシングルセルで分取し、同様に全ゲノム増幅の処理を行い解析に付した。

4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫患者の病期ごとの CTC 数の解析

健常人では CTC は 4mL 中 0 - 1 個であった。ステージ I ~ の術前患者と遠隔転移を有する進行期患者では様々な数の CTC が検出された。それぞれのステージ内では CTC 数の患者間のばらつきがあった。ステージが進むにつれて CTC 数が増える傾向を予測したが、t 検定では有意差が見出されたのはステージ と だけであった。また、進行期であるにも関わらず CTC が非常に少ない患者があり、その要因の 1 つとして、gp100 と MART-1 の発現が低下していることが推察された。

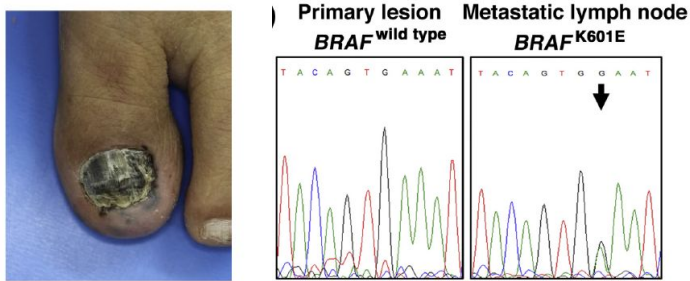
(2) 悪性黒色腫患者に対する治療経過中の CTC 数の推移の解析

BRAF 変異を有する悪性黒色腫患者でダブラフェニブ+トラメチニブを投与された患者では、腫瘍の抗腫瘍効果と CTC 数の推移が相関する傾向がみられた。5-S-CD よりも病勢との相関が強く、CTC 数は病勢バイオマーカーとして優れていることが示された。免疫チェックポイント阻害薬を投与された患者の治療経過中に複数ポイントの CTC では、抗腫瘍効果と CTC 数の相関はみられなかった。

(3) 質的变化の解析：CTC の体細胞遺伝子変異の解析

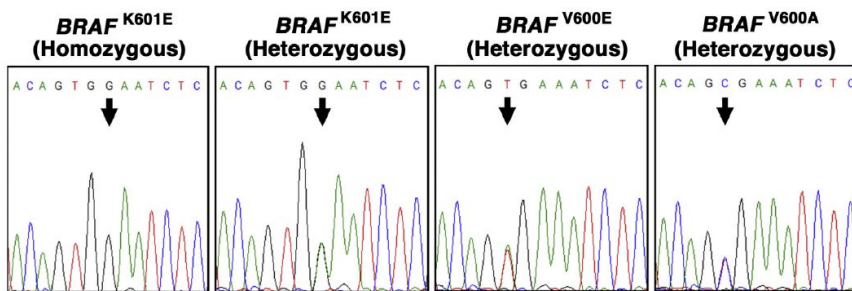
母趾原発で、鼠径リンパ節に転移をきたした悪性黒色腫患者の腫瘍組織の解析では、原発巣は *BRAF*V600 野生型であったが、リンパ節転移には *BRAF* K601E の変異があった。(図 1)

図1 原発腫瘍の臨床像 および 原発とリンパ節転移の BRAFV600 塩基配列



この患者の血液から採取した CTC をダイレクトシーケンスしたところ，*BRAF* 野生型のほかに，*BRAF* K601E homozygous と *BRAF* K601E heterozygous，*BRAF* V600E heterozygous，および *BRAF* V600A という多様な体細胞変異をそれぞれ持つ CTC が発見された。(図2)

図2 各 CTC の BRAF 遺伝子変異



(4) CTC を用いた癌遺伝子 / 癌抑制遺伝子のパネル解析

進行期悪性黒色腫患者 2 名の末梢血から CTC を単離し、パネル解析したところ、KIT, NRAS, PIK3CA, ERBB2, TP53, PTEN, RB など癌遺伝子・癌抑制遺伝子の既知の遺伝子変異が見つかった。いっぽうで、悪性黒色腫に多い *BRAF* 変異はこの解析では検出されなかった。その要因として、解析結果によると全ゲノム増幅が均一に行われておらず、*BRAF* を含む部分の評価には十分でなかったことが判明した。CTC をシングルセルで分取すると、全ゲノム増幅の効率が不良となることが課題であると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

木庭幸子; 皮膚科セミナーリウム『発癌の仕組み』悪性黒色腫の発癌に関わる分子異常と治療への応用. 日本皮膚科学会雑誌 (査読無), 2019; *in press*

② Kiniwa Y, Nakamura K, Mikoshiba A, Uchiyama A, Akiyama Y, Morimoto A, Okuyama R. Diversity of circulating tumor cells in peripheral blood: Detection of heterogeneous *BRAF* mutations in a patient with advanced melanoma by single-cell analysis. *J Dermatol Sci* (査読有), 2018 90(2): 211-213.

③ Nakamura K, Yaguchi T, Ohmura G, Kobayashi A, Kawamura N, Iwata T, Kiniwa Y, Okuyama R, Kawakami Y. Involvement of local renin-angiotensin system in immunosuppression of tumor microenvironment. *Cancer Sci* (査読有), 2018 Jan; 109(1): 54-64.

④ Inoue H, Park JH, Kiyotani K, Zewde M, Miyashita A, Jinnin M, Kiniwa Y, Okuyama R, Tanaka R, Fujisawa Y, Kato H, Morita A, Asai J, Katoh N, Yokota K, Akiyama M, Ihn H, Fukushima S, Nakamura Y. Intratumoral expression levels of PD-L1, GZMA, and HLA-A along with oligoclonal T cell expansion associate with response to nivolumab in metastatic melanoma. *Oncoimmunology* (査読有), 2016 June; 5(9), e1204507.

木庭幸子, 奥山隆平: 癌の分子病理学, 皮膚腫瘍・悪性黒色腫. 病理と臨床 (査読無), 2016; 34 巻臨増; 229-36.

〔学会発表〕(計 3 件)

木庭幸子; 悪性黒色腫の病態と分子異常 ～治療への新しい扉～, 第 117 回日本皮膚科学会総会, 2018 年 6 月, 広島市

Yukiko Kiniwa, et al.; Diversity of circulating melanoma cells; detection of heterogenetic *BRAF* mutations by single-cell analysis. 第 42 回日本研究皮膚科学会, 2017 年 12 月, 高知市

Yukiko Kiniwa, et al.; Diversity of circulating melanoma cells; detection of heterogenetic *BRAF* mutations by single-cell analysis. 9th World Congress of Melanoma, 2017 年 10 月, Brisbane (オーストラリア)

〔図書〕(計 2 件)

木庭幸子 ; ; 10 章 疾病別での診断・治療の現状と求める医薬品・医療機器・再生医療像, 19 節「悪性黒色腫」『希少疾患用医薬品の採算性ある事業化と適応拡大戦略』(技術情報協会) p.286-93. 2018 年刊行

木庭幸子 ; ; 悪性黒色腫における免疫チェックポイントを標的とした治療の実際, 『先端治療技術の実用化と開発戦略(核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品)』(技術情報協会), p 293-300, 2017 年刊行

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：奥山隆平

ローマ字氏名：Ryuhei Okuyama

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：80292332

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。