

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07198

研究課題名(和文) 耐性化遺伝子検出の為の適切な再生検と、liquid biopsyの臨床応用

研究課題名(英文) Optimization of re-biopsy and liquid biopsy to detect mutations relevant to acquired resistance

研究代表者

中村 朝美 (Tomomi, Nakamura)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：90457490

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)：EGFR遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者22例の検討で、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)獲得耐性機序であるT790M変異の検出状況を組織再生検とliquid biopsyで比較し、両者の特徴と両者を組み合わせでより効果的な治療戦略に貢献できる可能性について検討した。また、分子標的治療薬の標的となるような遺伝子変異を有する再生検部位推定のため、T790M変異陽性癌細胞に結合可能な薬剤を放射線同位元で標識してマウスに投与後SPECT撮影を行うことで、T790M陽性の転移巣と陰性の転移巣を識別できるかの検討を行ってきたが、薬剤の腫瘍特異的な集積が得られず期間内に達成できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討から、治療薬の対象となる遺伝子変異を有する癌細胞が体内に存在するかという全身的な評価にはliquid biopsyが優れているが、どの病巣に治療の標的となる遺伝子変異が認められ、使用する薬剤にて縮小が期待できるかについては、現時点ではそれぞれの転移巣の組織再生検を行わないと判断が難しいことが確認された。今回の研究期間内には結果を出すことができなかったものの、放射線同位元素で標識した薬剤を投与後にSPECT撮影を行うことで目的とする遺伝子変異を有する病変を推定するという試みは、複数個所の再生検という侵襲をさけつつ治療効果を予測する点で期待がもたれる検査法ではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We performed a retrospective analysis of 22 patients with EGFR mutation-positive non-small cell lung cancer who exhibited 1st/2nd generation EGFR-TKI resistance to consider appropriate application of liquid and re-biopsy through analysis of current status in practice. T790M detection rate was 52% with re-biopsy and 58% with liquid biopsy. The concordance between tissue and plasma was 58%. Liquid biopsy reflects the whole body, whereas re-biopsy is useful for spatial diagnosis. In an effort to discover a noninvasive method for predicting cancer lesion harboring T790M mutation, we tried to develop SPECT imaging agents which selectively target the T790M positive EGFR. We completed mouse model which harbor T790M positive and negative metastatic lesions and tried to detect T790M positive metastatic lesions by administration SPECT imaging agent. However, specific accumulation of SPECT imaging agents to tumor lesion could not be detected.

研究分野：肺癌

キーワード：re-biopsy liquid biopsy T790M テーラーメイド治療 EGFR-TKI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

第1世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の獲得耐性機序として T790M 変異は約 50 ~ 60% と大きな割合を占めており (Yano, J Thorac Oncol, 2011)、T790M 変異に対しても有効な第3世代 EGFR-TKI の開発がすすめられた。第3世代 EGFR-TKI である osimertinib は T790M 変異陽性症例に対して奏効率約 61%、無造悪生存期間中央値 9.6 カ月と良好な効果を認めている (Janne N, New Engl J Med, 2015)。osimertinib は re-biopsy にて採取した組織から T790M 変異を検出することが使用条件となっており、**今後も新たな獲得耐性機序に対する新規薬剤が開発されていく中で、耐性化機序を評価し、適切な薬剤を選択することは非常に重要になる。**

しかし、獲得耐性機序評価のための re-biopsy には次のような問題がある。

### **盲目的な再生検で治療標的となる耐性化機序を検出できるのか**

薬剤耐性化後の肺がんは腫瘍不均一性が高く、再生検の部位により適切な耐性化遺伝子の検出ができない場合がある。肺がん症例での re-biopsy と liquid biopsy の一致率は、EGFR-TKI 治療前 EGFR 活性型遺伝子では 80 - 90% に対し、耐性化後 T790M では 50 ~ 60% で、別の転移部位から再再生検を行うことでその一致率が上昇したと報告された (Sunderman TK, Clin Cancer Res, 2015)。このように re-biopsy は適切な部位で行わなければ偽陰性となり、患者は有効な薬剤を使用する機会を失う可能性がある。

### **侵襲を伴い、頻回な検査が困難**

re-biopsy を複数個所で行えば耐性化遺伝子の検出率は上昇するが、患者に大きな負担をかけることになる。全身状態が悪い患者では、侵襲ゆえに re-biopsy が困難となり治療選択肢が狭まることになる。

一方、血漿を用いた分子マーカーの測定 (liquid biopsy) は非侵襲的で繰り返し行うことが可能である。liquid biopsy は、re-biopsy の代用として耐性化機序モニタリングの有用な手段となりうることを期待されるが、**腫瘍量や転移の状況などにより一定割合の偽陰性が生じることが避けられないという問題点がある。**

患者が耐性化機序に応じた適切な治療を受ける機会を逃さないためにも、re-biopsy と liquid biopsy のそれぞれの特徴を理解し、お互いを相補的に活用していくことが重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床的検討および動物モデルを用いて獲得耐性後の治療法決定に最も有効な re-biopsy の方法を明らかにし、さらに liquid biopsy との併用により、効果的な薬剤耐性化遺伝子診断が可能か検討する。

これらの目的のために、以下のテーマについて検討する

1. 耐性化遺伝子検出のためのより適切な re-biopsy 方法の検討
2. 再発形式による liquid biopsy 陽性率の検討

## 3. 研究の方法

### 1. 耐性化遺伝子検出のためのより適切な re-biopsy 方法の検討

- (1) 臨床的検討：EGFR-TKI 獲得耐性後血漿 T790M 陽性症例において、再生検部位、臨床背景における組織 T790M 陽性率と osimertinib 効果を検討する
- (2) 動物モデルを用いた検討：SPECT を用いて適切な re-biopsy 部位決定が可能か第三世代 EGFR-TKI の osimertinib は T790M 変異陽性 EGFR に対しても結合し効果を発揮するが、第一世代 EGFR-TKI の gefitinib は結合できない。その点を利用し両者の集積の違いで T790M 変異陽性細胞を有する転移巣を同定する。
  - 1) SPECT 撮影のための放射線標識を行った gefitinib<sup>RI</sup>、osimertinib<sup>RI</sup> の作成
  - 2) EGFR-TKI 獲得耐性モデルマウスの作成
  - 3) gefitinib<sup>RI</sup>、osimertinib<sup>RI</sup> の集積状況による、T790M 陽性転移巣予測の検討

## 2. 再発形式による liquid biopsy 陽性率の検討

- (1) 臨床的検討：EGFR-TKI 耐性化後組織 T790M 陽性症例において、転移部位、臨床背景による血漿 T790M 陽性率の検討
- (2) 動物モデルを用いた検討：SPECT を用いた再発形式と血漿 T790M 陽性率の検討
  - 1) gefitinib<sup>RI</sup>、osimertinib<sup>RI</sup> を用いた、T790M 陽性転移巣のモニタリング  
EGFR-TKI 獲得耐性マウスに gefitinib<sup>RI</sup>、osimertinib<sup>RI</sup> を投与して SPECT 撮影を行い、osimertinib<sup>RI</sup> のみが集積する T790M 陽性転移巣の数や分布を経時的にモニタリングする。
  - 2) T790M 陽性転移巣の割合、分布による血漿 T790M 検出率の比較検討

## 4. 研究成果

### 耐性化遺伝子検出のためのより適切な re-biopsy 方法の検討

- (1) 臨床的検討：EGFR-TKI 獲得耐性後血漿 T790M 陽性症例において、再生検部位、臨床背景における組織 T790M 陽性率と osimertinib 効果を検討する

当院にて第一世代、第二世代 EGFR-TKI を投与され、その後獲得耐性となった EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者 22 例について組織再生検、liquid biopsy における T790M 検出状況と、その後の第三世代 EGFR-TKI である osimertinib の治療効果についてレトロスペクティブに検討した。T790M 変異の検出率は組織再生検で 52%、liquid biopsy で 58% であり、両者の一致率は 58% であった。症例の中には liquid biopsy では T790M 陽性であるにもかかわらず組織再生検では T790M 変異が検出されず、複数回、複数部位の再生検を繰り返してやっと T790M 変異が検出された症例があった。また、Figure 1A,B に示すようにリンパ節転移からは T790M 変異が検出されたが肝転移からは T790M が検出されなかった症例もあり、この症例では T790M 陽性であったリンパ節転移は osimertinib が有効であったが、T790M 陰性であった肝転移では無効であった。これらの結果から、ある患者において T790M 変異陽性の病巣があるかどうかの全身的な評価には liquid biopsy が優れているが、どの転移巣で T790M 変異が陽性が、すなわちどの病巣に対して osimertinib の効果が期待できるかの評価には組織再生検が必要であると考えられた。

Figure 1A

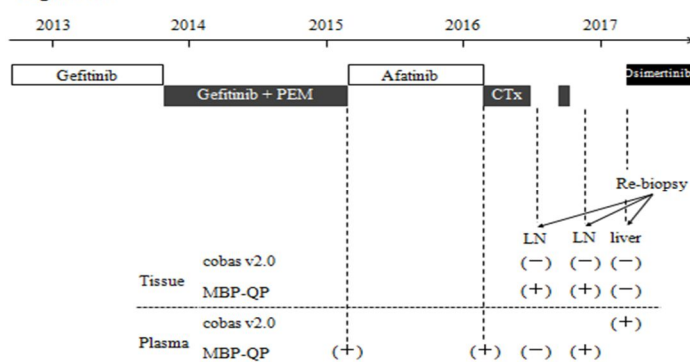
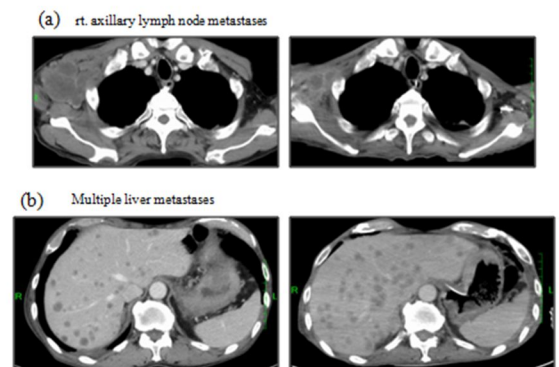


Figure 1B



- (2) 動物モデルを用いた検討：SPECT を用いて適切な re-biopsy 部位決定が可能か

T790M 陽性の転移巣を同定するために複数個所の再生検を行うことは侵襲が強く、部位によっては再生検が不可能な場合もある。そこで、SPECT を用いて画像的に T790M 変異が陽性の転移巣と陰性の転移巣が識別できないかを検討した。

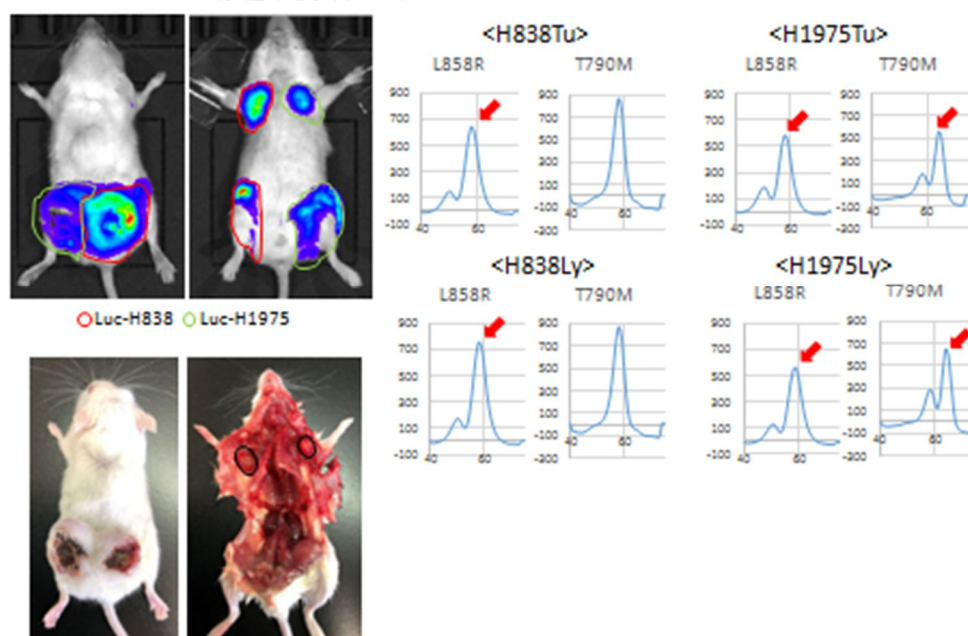
- 1) EGFR-TKI 獲得耐性モデルマウスの作成

我々はすでに肺癌細胞株を皮下移植することで血行性、リンパ行性の転移を認める肺癌転移モデルマウスを作成し、報告している (Sueoka-Aragane, PLoS one, 2014)。今回はこの肺癌転移モデルマウスを応用し、T790M 陽性と陰性の転移巣が混在する EGFR-TKI 獲得

耐性時の肺癌患者と同様の病態を再現できる EGFR-TKI 獲得耐性モデルマウスを作成した。Balb/c DKO (Balb/c Rag2<sup>-/-</sup>/Jak3<sup>-/-</sup>)マウスに、EGFR 活性化型変異 (L858R) を有する H838 肺癌細胞株、L858R と耐性化変異である T790M を共に有する H1975 肺癌細胞株 (共にルシフェラーゼ導入) を皮下移植した。IVIS で肺転移、リンパ節転移などの遠隔転移はおこなっていることを確認し、その後マウスを解剖して各転移巣の遺伝子変異解析を行ったところ、L858R のみ陽性の H838 由来の転移巣と L858R、T790M 共に陽性の H1975 由来の転移巣が混在していることが確認できた。

Figure 2 EGFR-TKI獲得耐性マウスと転移巣からの遺伝子変異検出状況

Luc-H838+Luc-H1975移植マウス(10W)



## 2) SPECT 撮影の為の分子イメージングプローブの作成

SPECT 分子イメージングプローブの作成は、京都大学、京都薬科大学で行った。

AZD9291 (osimertinib) 及び CO-1686 を用いて、L858R のみ及び L858R/T790M を共に有する EGFR に対する阻害活性を評価し、T790M 変異に対する選択性の有無を確認した。IC<sub>50</sub> 値 (nM) を Table 1 に示す。AZD9291 (osimertinib) は、両方の EGFR-TKI に同程度の阻害活性を示し、T790M 変異に対する選択性は見られなかった。一方、CO-1686 は、L858R/T790M を有する EGFR に対し約 35 倍高い阻害活性を示した。CO-1686 が L858R/T790M 有する EGFR に対して相対的に高い阻害活性を示したことから、CO-1686 は L858R/T790M に対し、高い選択性があることが示唆された。この結果より L858R/T790M を標的とした PET/SPECT 用分子イメージングプローブのリード化合物に、CO-1686 を用いることとした。

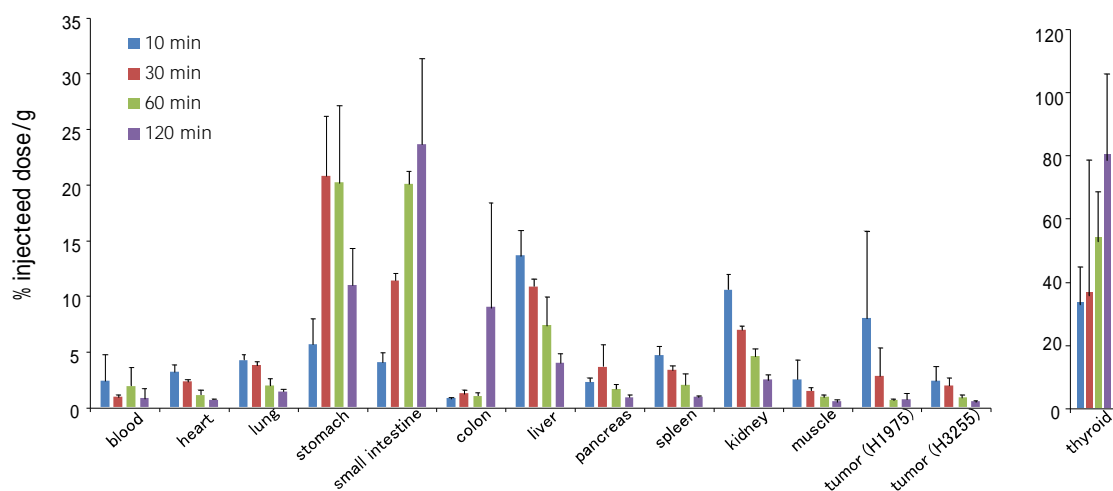
Table1	IC <sub>50</sub> (nM)		
	test compounds	EGFR (L858R)	EGFR (L858R/T790M)
	AZD9291	19 ± 5	14 ± 2
	CO-1686	763 ± 239	19 ± 5

化合物を標識する放射線同位元素として <sup>123</sup>I 核種を導入し CO-1686 誘導体 ([<sup>123</sup>I]RT-23) を設計した。RT-23 は 2 次変異 EGFR (L858R/T790M) に対する選択性は、CO-1686 に比べ低下したものの、選択性を示す可能性があることが示唆された (Table 2)。

Compounds	IC <sub>50</sub> (nM)	
	EGFR (L858R)	EGFR (L858R/T790M)
RT-23	238.1	73.85
CO-1686	763 ± 239	19 ± 5

BALB/c slc-nu/nu ノードマウスの左肩に H3255 細胞株 (L858R 陽性)、右肩に H1975 細胞株 (L858R/T790M 陽性) をそれぞれ皮下移植し、<sup>125</sup>I]RT-23 を 0.5% Tween80 生理食塩水で 23.3 kBq/100 μL となるように調製したものを 1 匹あたり 23.3 kBq/100 μL ずつ尾静脈注射し、10、30、60、120 分後 (n=4) それぞれの血液、脾臓、心臓、肺、胃、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、骨を摘出した。その後、各臓器をガンマカウンターで測定し、単位重量当たりの放射能の集積量 (% injection dose/g) を算出した。各臓器のタイムポイントごとの <sup>125</sup>I]RT-23 の単位重量当たりの放射能の集積量 (% injection dose/g) を Figure 3 に示す。

Figure 3



投与後 10 分の H1975 腫瘍へは、バラツキが見られたものの、同じく投与後 10 分の H3255 腫瘍に比べ高い集積が見られた。しかし、継時的に集積量の減少が見られた。<sup>125</sup>I]RT-23 は H1975 腫瘍に対して良好な集積が認められた一方で、EGFR (L858R/T790M) との持続した結合性が低いことが示唆された。一方、甲状腺へは継時的に高い集積が見られ、化合物のヨウ素が脱離したためだと考えられた。肝臓に集積後、継時的に小腸や大腸への集積が増加していたことから、<sup>125</sup>I]RT-23 は主に肝臓で代謝を受け、その後、腸管循環することが示唆された。このように <sup>125</sup>I]RT-23 は EGFR (L858R/T790M) に高い特異性と長時間の集積を認める薬剤とまではいかず、SPECT 撮影も試みたが、H1975 腫瘍の画像化に成功する事はいまだ来ていない。そのため今回の研究期間中に EGFR-TKI 獲得耐性モデルマウスを用いた SPECT 撮影までには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komiya Kazutoshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Current Status and Problems of T790M Detection, a Molecular Biomarker of Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors, with Liquid Biopsy and Re-biopsy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3559 - 3566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12628.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小宮一利
2. 発表標題 当院における液体生検と再生検の現状と問題点、その克服に向けて
3. 学会等名 第58回日本肺癌学会九州支部学術集会、第41回日本呼吸器内視鏡学会九州支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小宮一利
2. 発表標題 液体生検と再生検はどのように使い分けるべきか？
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小宮一利
2. 発表標題 Correlation and problems of re-biopsy and liquid biopsy for detecting T790M mutation
3. 学会等名 第18回世界肺癌学会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小宮一利
2. 発表標題 当院におけるRe-biopsyの現状と問題点
3. 学会等名 第15回臨床腫瘍学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荒金 尚子 (Aragane Naoko)  (20321846)	佐賀大学・医学部・准教授  (17201)	
研究分担者	佐藤 明美 (Sato Akemi)  (20568357)	佐賀大学・医学部・助教  (17201)	
研究分担者	渡邊 裕之 (Watanabe Hiroyuki)  (40710786)	京都大学・薬学研究科・講師  (14301)	
研究分担者	木村 寛之 (Kimura Hiroyuki)  (50437240)	京都薬科大学・薬学部・准教授  (34306)	