

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10625

研究課題名(和文) 大腸癌における循環腫瘍DNAを用いたEGFR抗体薬耐性の検出と個別化治療への応用

研究課題名(英文) Detection of acquired resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA

研究代表者

中村 慶史 (Nakamura, Keishi)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：30608691

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)：RAS遺伝子野生型の切除不能進行再発大腸癌と診断され、抗EGFR抗体薬併用の化学療法を施行した50例を対象とした。全例で化学療法開始前と投与中、病状進行(PD)後の血液採取を行った。化学療法開始前もしくはPD後の血漿から循環腫瘍DNA(ctDNA)を抽出し、デジタルPCRでEGFR抗体薬耐性関連遺伝子の変異解析を行なった。化学療法開始前もしくはPD後に変異が同定された症例に関して、経過中のctDNAの変異解析も行った。今後、臨床情報を収集し、ctDNAによって治療前に抗EGFR抗体薬の治療効果予測が可能かどうか、さらに、化学療法中に治療効果のモニタリングが可能かどうかを検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後解析を進めることにより、切除不能進行再発大腸癌に対する抗EGFR抗体薬投与前に、RAS以外の遺伝子異常が予後不良因子となり得るか、またどの程度の変異アレルで治療無効と予測可能かの知見を蓄積できる。それにより、抗EGFR抗体薬の適応判定および治療効果予測をより精密に行うことが可能となる。また、抗EGFR抗体投与後に、耐性因子と想定される(複数の)遺伝子異常がどのタイミングで検出されるかの新たな知見を得ることができる。それをもとに、ctDNAによる治療標的の同定と治療効果のモニタリングを目的とした繰り返し実施可能な低侵襲検査が提案できる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor DNA (ctDNA) has been attracting attention for its ability to provide comprehensive, minimally invasive tissue profiling. To assess clinical usefulness of ctDNA as prognostic and predictive marker for the treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC), we explored genetic alterations in ctDNA in 50 patients with RAS wildtype mCRC treated with anti-EGFR antibodies. Blood samples were collected before initiation and during administration of anti-EGFR antibodies as well as after disease progression (PD). Extraction of ctDNA from plasma and detection of genetic changes associated with resistance to anti-EGFR antibodies were performed by digital PCR. For patients with genetic alteration identified before chemotherapy or after PD, we also performed analysis of ctDNA during the course of the disease. Analyses are ongoing to determine if ctDNA can be used to predict response to EGFR blockade before treatment, as well as to monitor disease response during EGFR blockade.

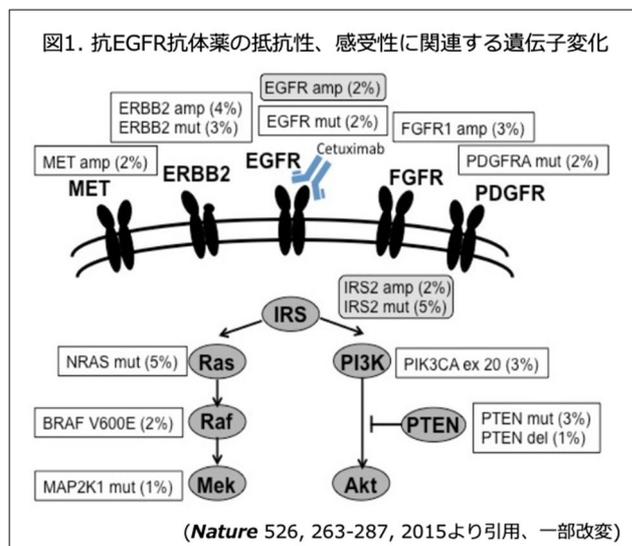
研究分野：下部消化管

キーワード：循環腫瘍DNA 大腸癌 上皮成長因子受容体 遺伝子変異 個別化治療

1. 研究開始当初の背景

切除不能進行再発大腸癌の化学療法は大きく進歩してきた。しかし、遺伝子変異や遺伝子増幅による耐性クローンの出現・増殖に伴う腫瘍の再増大のため、治癒は困難である。

研究開始当初、RAS(*KRAS*, *NRAS*)野生型の大腸癌に限って epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体の投与を行う個別化治療が行われていたが、投与例の約半数においてしか腫瘍縮小効果が得られず、さらなるバイオマーカーの探索が行われてきた。腫瘍移植片モデルを用いた検討では、抗 EGFR 抗体に耐性を示す腫瘍において、同じ RAS 経路に属する *BRAF*, *MAP2K1* 遺伝子に加えて *PIK3CA*, *PTEN*, *EGFR* の変異や *MET*, *ERBB2* (*HER2*) の増幅などが報告された (Bertotti A, et al. *Nature* 526:263-267, 2015) (図1)。



さらに、抗 EGFR 抗体耐性例に対する個別化治療の試みが行われている。*ERBB2* 増幅を認める症例に対して、異なった機序の *HER2* 阻害薬である trastuzumab と lapatinib 併用の有効性が報告された (HERACLES study, *Lancet Oncol*, 17:738-746, 2016)。また、RAS 変異による獲得耐性例でも、休薬により約半数の患者で感受性が回復するため、抗 EGFR 抗体薬の再投与 (リチャレンジ) も検討されている。

一方、癌の原発巣や転移巣から血液中に流出した循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell, CTC) や、循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) などを検出するリキッドバイオプシーが注目され、臨床への応用拡大が強く期待されるようになった。大腸癌においても ctDNA を用いて EGFR 抗体薬の耐性検出を試みる報告が増加しており、初期耐性では、*ERBB2*, *FLT3* の増幅や *MAP2K1* の変異、獲得耐性では *MET* の増幅や *KRAS*, *EGFR* の変異が報告された (Siravegna G, et al. *Nat Med* 21:795-801, 2015)。大腸癌領域においても、ctDNA を用いた治療効果の予測や治療効果のモニタリング、さらには治療無効の早期判断への応用が期待されている。

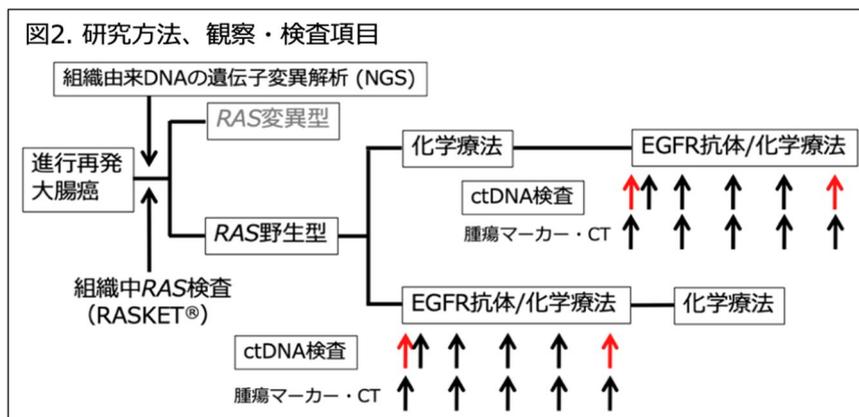
2. 研究の目的

研究開始当初、RAS 野生型の切除不能進行再発大腸癌患者の抗 EGFR 抗体投与中に ctDNA において *KRAS*, *BRAF* など少数の遺伝子変異を調べた研究は存在したが、デジタル PCR 法で複数の候補遺伝子の変異・増幅を一度に検索した研究はなかった。そのため、本研究の目的は以下とした。

- (1) 抗 EGFR 抗体耐性の候補遺伝子変異・増幅を検出するパネルを用いて、抗 EGFR 療法前の ctDNA における変異を同定することで、抗 EGFR 抗体の治療効果予測が可能かどうかを明らかにすること。
- (2) 抗 EGFR 抗体投与中に抗 EGFR 抗体耐性の候補遺伝子パネルを用いて ctDNA の解析を行うことにより、腫瘍マーカーや画像診断よりも耐性獲得を早期に検出し、病状をモニタリングすることが可能かどうかを検討する。

3. 研究の方法

組織由来 DNA で RAS 野生型と確認され、抗 EGFR 抗体薬の投与を行なった切除不能進行再発大腸癌 50 例を対象とした。既に金沢大学、名古屋市立大学を含む研究関連施設の倫理審査委員会の承認を受けて、50 例の症例登録、検体採取を終了した。



具体的には、化学療法開始前と抗 EGFR 抗体薬の投与開始 4 週後、その後は病状進行 (PD) まで 10 週間隔で、腫瘍マーカー測定や画像診断にあわせて血液採取を行った (図 2)。そして、血漿から ctDNA を抽出し、デジタル PCR 法で、抗 EGFR 抗体耐性因子と想定される遺伝子変異 (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*) と遺伝子増幅 (*HER2*, *MET*) の解析を行った。

合わせて、対象症例の診断や治療 (手術) の際に採取、保存された原発腫瘍組織から DNA 抽出を行い、検体採取が可能であった 46 例について、Ion AmpliSeq Cancer HotSpot Panel を用いて、次世代シーケンス法で 50 種類の癌関連遺伝子のホットスポットについての変異解析を行った。さらに転移巣の手術組織が入手可能であった 9 例に関しても、保存された転移巣組織から DNA を抽出し、同パネルを用いて変異解析を行った (図 3)。

4. 研究成果

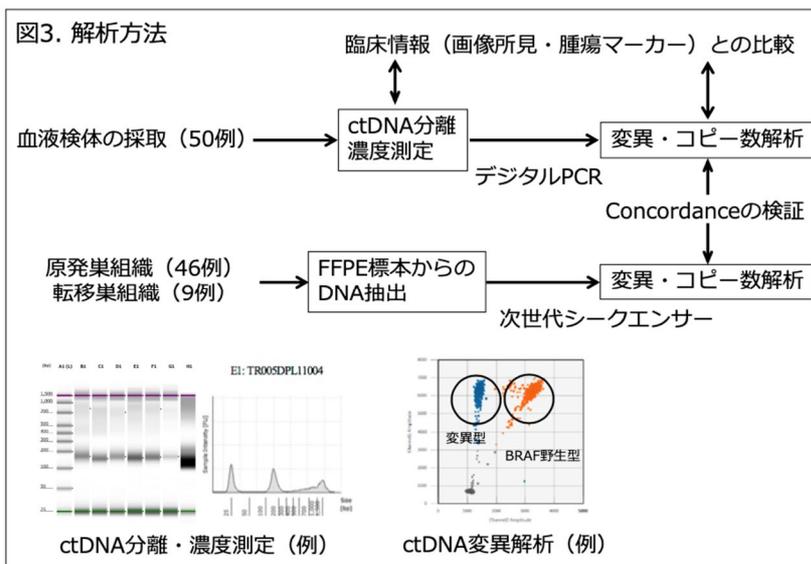
登録された 50 例の平均年齢は 67 才であり、男性 32 例、女性 18 例であった。また、遠隔転移例が 23 例、再発例が 27 例であった。治療ラインは、初回治療が 25 例、2 次治療以降の治療が 25 例であった。化学療法開始前もしくは PD 後の ctDNA における変異は 23 例 (46%) に認められた。うち、治療開始前にのみ変異が認められたのは 7 例 (14%)、PD 後のみ変異が認められたのは 6 例 (12%)、治療開始前と PD 後に変異が認められたのは 10 例 (20%) であった。原発巣組織の解析では、解析が可能であった 39 病変中 35 病変 (90%) に少なくとも 1 つの遺伝子変異が同定された。また、転移巣の解析では、解析が可能であった 12 病変中、10 病変 (83%) に少なくとも 1 つの遺伝子変異が同定された。

現在、奏効率、無増悪生存期間、全生存期間、経過中の腫瘍マーカー・画像所見の推移などの臨床情報を集積している。今後、同定された変異と集積された臨床情報とを比較し、以下の項目について検討する。

- (1) 治療前の ctDNA における EGFR 経路関連遺伝子の変異や増幅の検出による抗 EGFR 抗体薬の効果予測の可能性。
- (2) 抗 EGFR 抗体療法を行っている *RAS* 野生型切除不能大腸癌患者において、ctDNA における EGFR シグナル経路に関連する複数の候補遺伝子の変異・増幅を経時的に検索することによる病状モニタリングの可能性。
- (3) 原発巣もしくは転移組織の変異解析と比較して、ctDNA 検査が腫瘍の不均一性 (heterogeneity) を加味した腫瘍全体の遺伝子変異状態 (predominant one) を反映する可能性。

2019 年 12 月に発刊された「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイドンス(第 4 版)」では、「切除不能進行再発大腸がん患者に対し、抗 EGFR 抗体薬の適応判定および治療効果モニタリングを目的として ctDNA 検査を実施する」ことが推奨されている。しかし、*RAS* 変異アレル以外の抗 EGFR 抗体耐性関連変異の存在が予後不良因子となり得るかかどうかは確立されていない。また、少なくとも 1%以上の *KRAS* 変異アレルの存在により抗 EGFR 抗体薬無効と予測できるとする報告が多いが、明確なカットオフ値は定められていない。今後の解析によって、*RAS* 以外の変異・増幅が予後不良因子となり得るか、またどの程度の変異アレルで治療無効と判断可能かの知見を蓄積できる。

また、同ガイドンスでは、大腸がん切除不能例に対する ctDNA 遺伝子パネル検査は、「治療標的の同定および治療効果のモニタリングを目的とした繰り返し実施可能な低侵襲検査として推奨」されている。今後の解析により、抗 EGFR 抗体投与後に、耐性因子と想定される (複数の) 遺伝子異常がどのタイミングで検出されるかの新たな知見を得ることができる。それをもとに、ctDNA による治療標的の同定と治療効果のモニタリングを目的とした繰り返し実施可能な低侵襲検査が提案できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤田 武, 久保田英嗣, 中村慶史, 高橋直樹, 太田亮介, 井戸川雅史, 佐々木泰史, 時野隆至, 源 利成, 片岡洋望
2. 発表標題 RAS野生型転移性大腸癌患者における循環腫瘍DNA中のRAS, BRAF, PIK3CA変異の同定と腫瘍組織の変異との比較
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤田 武, 中村慶史, 久保田英嗣
2. 発表標題 切除不能進行大腸癌における、デジタルPCRを用いた循環腫瘍DNAの変異検出の試み
3. 学会等名 第59回日本消化器病学会大会 ワークショップ24. ゲノム医療と消化器癌
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 澤田 武, 高橋直樹, 中村慶史, 久保田英嗣, 中西宏佳, 津矢田明泰
2. 発表標題 RAS野生型の転移性大腸癌における、デジタルPCRを用いた循環腫瘍DNA中のEGFR耐性変異検出の試み
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
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	高橋 直樹 (Takahashi Naoki) (20744204)	地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター (臨床腫瘍研究所)・病院 消化器内科・医長 (82402)	

6. 研究組織（つづき）

	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	澤田 武 (Sawada Takeshi) (60345626)	金沢大学・附属病院・医員 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関