

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10657

研究課題名(和文) 循環DNAと循環腫瘍細胞を用いた抗EGFR抗体耐性機序の解明と新規分子標的の探索

研究課題名(英文) Mechanism for resistance EGFR blockade; Analysis using circulating tumor DNA and circulating tumor cell

研究代表者

山田 岳史 (Yamada, Takeshi)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50307948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで抗EGFR抗体を投与すると、半数程度症例でRAS変異が誘導されることが報告されてきたが、ほとんどの症例でRASの変異が誘導されること、RASに加え、EGFRそのものとRASの下流にあるBRAFにも変異が誘導されることを明らかにした。さらに、抗EGFR抗体投与により誘導された変異は、抗EGFR抗体以外の薬物による治療により消失する可能性があることを明らかにした。これらの新規に出現する変異は循環DNAを解析することでを同定したが、循環腫瘍細胞を併用することでさらに感度が改善される可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Liquid biopsyを用いて、抗EGFR抗体はEGFRのみならず、その下流にあるRASやBRAFに変異を誘導することにより耐性化することを明らかにした。がん遺伝子パネル検査が保険適応となり、分子標的薬がより多くの患者に用いられるようになることが予測されるが、これに伴い、耐性化メカニズムの解明、耐性化の早期予知、耐性化後の治療開発、等の重要性が増す。今後Liquid biopsyを用いた様々な分子治療薬に関する研究が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the clinical utility of cfDNA to predict primary or secondary resistance to EGFR blockade in patients with metastatic colorectal cancer. Thirty metastatic colorectal cancer patients without RAS and BRAF mutations were prospectively enrolled and treated with cytotoxic agents and EGFR blockade as first-line therapy. cfDNA was analyzed for the presence of RAS, BRAF, and EGFR point mutations before initiating chemotherapy and at every 2 months during chemotherapy. Of the 30 patients, five had RAS mutations in their cfDNA before starting chemotherapy and did not respond. Twenty-four of the remaining 25 patients without cfDNA RAS mutations had response. Twenty of the 24 responders developed secondary resistance and cfDNA RAS mutations were found in 17 of the 20. cfDNA BRAF mutations were found in seven, and EGFR mutations were found in eight of the 20 patients. Emerging RAS, BRAF, and EGFR mutations occurred in patients with primary and secondary resistance to EGFR blockade.

研究分野：消化器外科

キーワード：抗EGFR抗体 循環DNA 循環腫瘍細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗 epidermal growth factor receptor (EGFR)抗体は強力な腫瘍縮小効果を有しており、切除不能大腸癌の予後を大幅に改善した。抗 EGFR 抗体は RAS 変異を有する症例では奏効しないことが知られているが、RAS 野生型であっても奏効しない症例がある。我々は、原発巣は RAS 野生型であっても転移巣は RAS 変異型である空間的 Heterogeneity がこの原因の一つであると考え、空間的 Heterogeneity がどの程度の割合で不奏効の原因となるかを検証することを試みた。

抗 EGFR 抗体の奏功期間は 10 カ月程度であり、その後耐性化する。これまでに、抗 eGFR 抗体の投与により 3 割程度の患者で RAS 変異が誘導されることが報告されていた。残りの 7 割では、その他の原因による耐性誘導機構が存在すると考えられていたが、もう少し多くの症例で RAS 変異が誘導されている可能性があること、また EGFR そのものや、RAS の下流にある BRAF にも変異が誘導されている可能性があると考えた。

新規変異を同定するために、化学療法の標的となっている転移巣から継続的に生検を採取することは困難である。変異を同定する方法として血液中に存在する circulating tumor cell (CTC) や circulating tumor DNA (ctDNA) を利用する Liquid biopsy が開発された。我々は 2012 年から Liquid biopsy 研究に取り組み、Stage IV 大腸癌症例では原発巣と転移巣の間に空間的 Heterogeneity があること (Yamada T, et al. Cancer Science 2016) を報告してきた。この研究を通じて、ctDNA の同定感度を向上させる様々な方法に取り組んできた。また、当時は末梢血 15mL から 3 個程度しか CTC が採取できず、CTC を用いた変異解析を行えなかった。そこで、抗 EGFR 抗体の研究と平行して、より多くの CTC を採取する方法の開発に着手した。

### 2. 研究の目的

(1) 抗 EGFR 抗体耐性獲得メカニズムの解明: ccfDNA および CTC を用いて抗 EGFR 抗体により誘導される RAS, BRAF, S492R 変異の頻度、変異が生じるまでの期間、変異を生じやすい症例の特徴を明らかにするとともに、epigenetic な変化を含めこれらの変異以外の耐性獲得メカニズムを解明する。

(2) 耐性獲得予測法の開発: Liquid biopsy を用いて治療前に効果を予測し、耐性予測を行いながら治療を継続する Real-time personalized therapy を行うには ccfDNA と CTC のどちらが有効であるか、あるいは併用が望ましいのかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) サンプル採取: 抗 EGFR 抗体を用いた化学療法を一次治療として行う患者から、化学療法前および化学療法開始後は 2 ヶ月毎に末梢血を 8ml 採取した。

(2) 血液から ccfDNA および CTC を抽出

(3) デジタル PCR を用いて、RAS、BRAF、EGFR の変異を検出

(4) 次世代シーケンサーを用いて CTC と ccfDNA の解析

### 4. 研究成果

(1) RAS 変異を検出する感度は、CTC と比較して ccfDNA の方が高かった。しかし、CTC からは ccfDNA からは検出できない変異が検出された。

(2) 原発巣 RAS 野生型大腸癌患者に 1 次治療として抗 EGFR 抗体を投与した 30 例中 5 例から治療を開始する前に Liquid biopsy で RAS 変異が検出され、5 例とも効果を認めなかった。Liquid biopsy で治療前に RAS 変異を認めなかった 25 例中 23 例で奏効した (Figure 1)。23 例中 3 例は Conversion surgery が可能になった。無増悪生存期間 (Progression free survival: PFS) は Liquid biopsy で RAS 変異が同定された症例と比較して、RAS 変異が同定されなかった症例で有意に良好であった (Figure 2)。

(3) 19 例が耐性化し、耐性獲得後に Liquid biopsy で 16 例 (84%) に RAS 変異が、7 例 (37%) に BRAF 変異、8 例 (42%) に EGFR 変異が検出された。RAS 変異は 10 例 (53%) で複数箇所に認められ、最も多かった変異は Q61H、次いで G12V に多かった (Table 1)。

(4) 耐性化した症例のうち 7 例で 2 次化学療法が 6 ヶ月以上行われ、かつ 2 ヶ月毎に Liquid biopsy が継続された。このうち 5 例は 6 ヶ月も RAS、BRAF、EGFR いずれかの変異が検出されたが 2 例は全ての変異が消失していた。

Figure 1

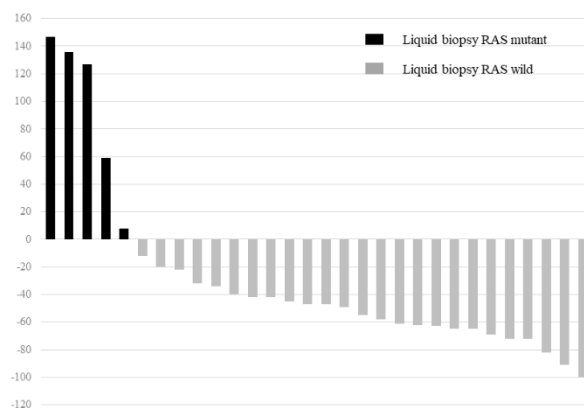
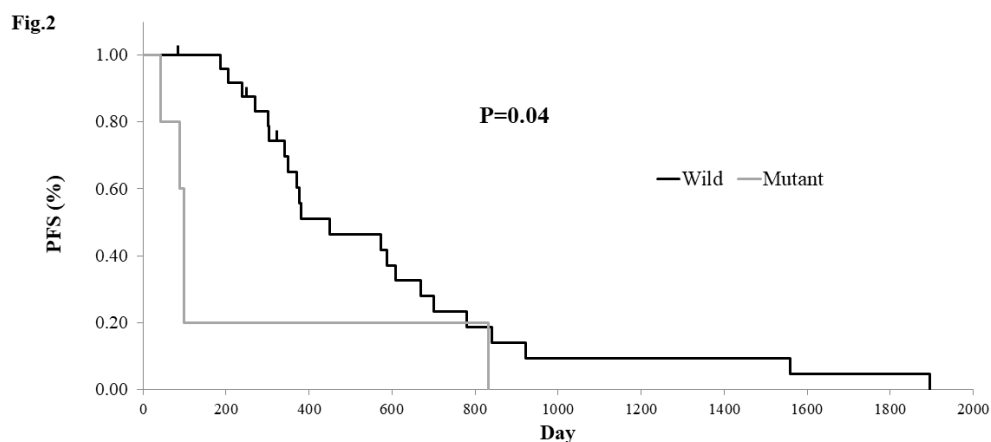


Table 1.pdf

(5) この研究は単施設での研究であったため、100例を集積する他施設共同研究を開始し、これまでに45例が登録されている。



No. at risk	0	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800
Mutant	5	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Wild	25	23	11	8	4	2	2	2	1	1

Table 1. Emerging mutations in patients with secondary resistance

Case	<i>KRAS</i> any	12D	12V	13D	12A	12R	12C	12S	61H	146T	146P	146V	<i>BRAF</i>	<i>EGFR</i>
1	Yes	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
2	Yes	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
4	Yes	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
5	Yes	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
7	Yes	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
9	Yes	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
10	Yes	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
11	Yes	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Yes	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1
14	Yes	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
18	Yes	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1
19	Yes	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
22	Yes	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
23	No	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
24	No	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	Yes	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
26	Yes	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
27	Yes	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
28	Yes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	16	6	8	4	5	2	5	3	10	3	2	1	7	8
Rate (%)	84	32	42	21	26	11	26	16	53	16	11	5	37	42

1=mutation positive, 0=mutation negative

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada T, et al.	4. 巻 99
2. 論文標題 Liquid biopsy for the management of patients with colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 39-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000494411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furuki H, Yamada T, et al.	4. 巻 18
2. 論文標題 Evaluation of liquid biopsies for detection of emerging mutated genes in metastatic colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 975-982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejso.2018.01.224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda K, Yamada T, et al.	4. 巻 110
2. 論文標題 Analysis of colorectal cancer-related mutations by liquid biopsy: Utility of circulating cell-free DNA and circulating tumor cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3497-3509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14186	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yamada T, et al
2. 発表標題 Emergence of KRAS mutation may play a major role in the secondary resistance to EGFR blockade
3. 学会等名 ESMO-GI（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田岳史、他
2. 発表標題 Liquid biopsyを用いた切除不能RAS野生型大腸癌に対する抗EGFR抗体による早期腫瘍縮小効果の予測
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田岳史、他
2. 発表標題 Liquid biopsyを用いたRAS野生型大腸癌の個別化治療
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田岳史、他
2. 発表標題 Liquid biopsyを用いたReal-time Precision Medicine
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada T, et al
2. 発表標題 Emergence of KRAS mutations and acquisition of resistance to EGFR blockade
3. 学会等名 ASCO (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田岳史、他
2. 発表標題 Liquid biopsyを用いた切除不能RAS野生型大腸癌に対する抗EGFR抗体による早期腫瘍縮小効果の予測
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田岳史、他
2. 発表標題 Liquid biopsyを用いたRAS野生型大腸癌の個別化治療
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田岳史、他
2. 発表標題 Liquid biopsyを用いたReal-time Precision Medicine
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamada Y, et al
2. 発表標題 Emergence of KRAS mutation may play a major role in the secondary resistance to EGFR blockade
3. 学会等名 ESMO-GI
4. 発表年 2018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	小泉 岐博  (Koizumi Michihiro)  (40328802)	日本医科大学・医学部・講師    (32666)	