

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15262

研究課題名（和文）初期腫瘍崩壊を利用した液体生検によるドライバー遺伝子耐性変異の予測

研究課題名（英文）Prediction of driver gene resistance mutations by liquid biopsy

研究代表者

吉田 遼平（Yoshida, Ryohei）

旭川医科大学・大学病院・特任助教

研究者番号：40792883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺癌患者における液体生検を用いた検討に関しては、大学倫理委員会でのプロトコル承認後にドライバー変異陽性患者において10名以上の患者から採血を行った。今後、各患者の臨床結果と合わせて学会や論文で報告予定である。

また本研究に関連して乳癌患者における液体生検での解析を行った。デジタルPCRを用いることで、乳癌患者において液体生検にも適用可能な高感度検出系を構築することができた。同内容に関しては現在、論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで癌患者の診断には主に組織検体が用いられてきた。しかし、近年は血液からのがん診断の精度が向上し注目が集まっている。本研究では、進行期の癌患者における液体生検の新たな活用法について検討した。そのなかで肺癌、乳癌の二つのタイプで解析をすすめることで今後のがん診断において有効とおもわれる液体生検の活用法を提示した。

研究成果の概要（英文）：Regarding the use of liquid biopsies in patients with lung cancer, after the protocol was approved by the University Ethics Committee Blood was collected from more than 10 patients in driver mutation positive patients. We plan to report the clinical results of each patient as well as the results of the study at a conference or in a paper.

Related to this study, we also performed an analysis of liquid biopsies in breast cancer patients. By using digital PCR, we developed a highly sensitive detection system applicable to liquid biopsy in breast cancer patients We have been able to do so. We are now submitting a paper on the same subject.

研究分野：肺癌

キーワード：液体生検 ドライバー遺伝子 耐性変異

1. 研究開始当初の背景

肺癌の組織型の約半数を占める肺腺癌において治療標的となるドライバー遺伝子が発見され、分子標的薬であるチロシンキナーゼ阻害薬 (Tyrosine kinase inhibitor ; TKI) による治療法が確立したが、TKI には必ず治療抵抗性を獲得 (耐性化) する。例えば、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌 (EGFR 肺癌) では耐性機序の半数を T790M 変異とよばれる耐性変異が占めており、それをターゲットとした新規薬剤が開発され、臨床試験では良好な治療効果を示した。

近年、がん診断において血液の中に存在する細胞遊離 DNA (cell free DNA: cfDNA) を利用した液体生検が注目されている。非侵襲的な液体生検は、組織生検を行えない患者に対して有効な検査法である。しかし、液体生検では T790M 変異の偽陰性率が高いという問題がある (J Clin Oncol. 2016 Oct 1;34(28):3375-82.)。その一因として、遠隔転移を来すような進行期でなければ cfDNA 濃度が上昇してこないことが挙げられる。申請者らはこれまでに、ドロップレットデジタル PCR (ddPCR) を用いて「液体生検によるドライバー遺伝子耐性変異の高感度検出法」に関する研究を行ってきた。その中でドライバー遺伝子の一つである ALK 融合遺伝子陽性肺癌 (ALK 肺癌) 患者において、ALK-TKI 投与前と比較し、投与 2 時間後の採血サンプルで cfDNA 濃度が有意に上昇するという結果を経験した。さらに、その cfDNA からは ALK - TKI に対する耐性変異が検出された。申請者らは、この現象を TKI の初回治療に伴う初期腫瘍崩壊を反映していると考え、**チロシンキナーゼ阻害薬誘導初期腫瘍崩壊 (Tyrosine kinase Induction Initial Tumor Bursts; TI-Bursts)** と名付けた。以上より、申請者らは液体生検の耐性変異検出における偽陰性という課題の克服には **TI-Bursts** を利用した液体生検の実施が有用ではないか、と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、分子標的薬の初回治療に伴う初期腫瘍崩壊現象に着目し、血液サンプルから耐性変異を高感度検出法であるドロップレットデジタル PCR 法を用いて解析を行うことで未来に起こりうる耐性変異を予測することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的遂行のために以下のように研究をすすめる。

- 1) EGFR耐性変異保有の担癌マウスモデルを作成し、**TI-Bursts**を利用した液体生検を行い、耐性変異をddPCRで確認する。
- 2) 1)で作成した担癌マウスモデルにTKI治療を行い、再発した腫瘍に対して遺伝子解析検査を行い、耐性変異の一致率を確認する。
- 3) ドライバー遺伝子陽性患者由来の検体を用いて担癌マウスモデルを作成し、上記の1,2)に基づいた解析を行う。
- 4) ドライバー遺伝子陽性患者を対象として**TI-Bursts**を利用した液体生検を行い、耐性時の組織との一致率と薬剤治療効果を検証する。

4 . 研究成果

上記の目的と方法に準拠し、われわれは肺癌のほかに乳癌での検討も行った。以下にその成果を報告する。

4 - 1 . 非小細胞肺癌における検討

EGFR 耐性変異保有の担癌マウスモデルを用いた基礎的検証に関しては、現在も引き続き解析を行っている途中である。

一方で、ドライバー遺伝子陽性患者（主に EGFR 肺癌と ALK 肺癌）を対象とした検討では旭川医科大学の倫理委員会においてプロトコール承認後に、実際に 10 名以上の患者から採血を行い解析を行っている。今後、TKI 治療後の臨床経過、再発や耐性機序の推移などとあわせて検討をすすめ学会や論文などで報告する予定である。

4 - 2 . 乳癌における検討

われわれは本研究の核となる液体生検の活用が他癌種で応用できないかと考え、進行期の乳癌のなかでも有効な治療方針が確立していないトリプルネガティブ乳癌のサブタイプに注目し解析を行った。

目的としてトリプルネガティブ乳癌（TNBC）は他の乳癌に比べて予後が悪いため、早期再発診断マーカーの研究が必要とされている。我々は、TNBC 患者において、頻繁に交互に変化する遺伝子を標的とした液滴デジタル PCR（ddPCR）をベースとした検出のための液体生検をもちいた解析を行った。

研究方法は手術後 2 年以内に再発した TNBC 患者 36 例のコホートを調査した。第一に、次世代シーケンシング（NGS）と ddPCR アッセイを用いて、AKT1、PIK3CA、TP53 の遺伝子変化を解析した。第二に、免疫組織化学（IHC）を用いて、遺伝子変化と腫瘍内のタンパク質のリン酸化との相関を調べた。第三に、PIK3CA または AKT1 陽性患者の血漿を用いて、変異の有無を経時的に追跡した。

結果として、AKT1 および PIK3CA 遺伝子の遺伝子変異については、METABRIC データベースよりも本研究の頻度が高かった（ $P=0.003$ 、 $P=0.054$ ）。PIK3CA H1047R または AKT1 E17K 変異を有する腫瘍は、PIK3CA および AKT1 非変異腫瘍と比較して、pAKT および pS6RP の発現が高かった（ $P=0.044$ 、 $P=0.105$ ）。設計された変異特異的プローブを用いて、PIK3CA H1047R または AKT1 E17K 陽性患者の血液サンプルから変異を検出することが可能であった。

以上より ddPCR を用いることで、cfDNA にも適用可能な高感度検出系を構築することができた。PIK3CA H1047R や AKT1 E17K 陽性例では、PI3K / AKT 経路が細胞増殖に関与しており、この経路の阻害剤が有効である可能性が示唆された。

上記の内容に関して、現在、論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----