

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870518

研究課題名(和文)テーラーメイド治療のための血漿遊離DNAを用いた遺伝子変異モニタリングシステム

研究課題名(英文) A non-invasive system for monitoring molecular markers with plasma DNA for tailored medicine

研究代表者

中村 朝美 (Nakamura, Tomomi)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者において重要な治療薬であるEGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)獲得耐性機序の約50%を占めるT790M変異を非侵襲的に採取可能な血漿で検出することの有用性を検討し、獲得耐性患者の40%で血漿T790M変異が陽性であり組織とほぼ同等の良好な結果である事を示した。また、EGFR-TKI獲得耐性機序の中で大きな割合を占めるT790M変異とHGFを血漿を用いてモニタリングすることが、EGFR-TKI獲得耐性機序の推定と、その後のEGFR-TKI再投与やT790M変異に対しても有効な第2世代、第3世代EGFR-TKIの効果予測に有効である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Because the biological characteristics of lung cancer may alter during treatment, it is necessary to clarify the molecular events in each individual at the time of acquired resistance to EGFR-TKI and before re-challenge with EGFR-TKI for selection of the appropriate patient population. However, analyses of biomarkers at those times have not typically been performed because of difficulty obtaining cancer specimens during disease progression. To solve this problem, we chose plasma as the sample for monitoring molecular events related with acquired resistance. In results our prospective study using plasma, T790M was detected in 40% of patients who acquired resistance to first generation EGFR-TKI and it was comparable level to re-biopsy. With respect to our retrospective study to clarify predictive marker for EGFR-TKI re-challenge, combination of T790M detection and HGF quantification using plasma is a potentially useful assay system for predicting the effect of EGFR-TKI re-challenge.

研究分野：肺癌

キーワード：血漿遊離DNA テーラーメイド治療 EGFR-TKI T790M HGF

1. 研究開始当初の背景

(1) がん分子標的療法は、標的分子が明確であるためバイオマーカーを用いた効果予測や耐性化機序の推定が可能である。肺癌では、EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の効果予測因子として EGFR 活性型遺伝子変異 (exon19 欠失、L858R) 獲得耐性機序として EGFR T790M 変異や HGF 過剰発現などが報告されている (Kobayashi N Engl J Med, 2005、Yano J Thorac Oncol, 2011)。しかし、がん細胞の分子生物学的特性は、治療前後で変化するため、経時的な遺伝子変異モニタリングを行い、その時々のがん細胞の特性に適した治療法を選択する必要がある。肺癌の再発のほとんどが遠隔転移であることを考慮すると、頻回な遺伝子変異検査には非侵襲的検査が必要である。

(2) 我々は、非侵襲的に繰り返し採取可能な血漿を用いて EGFR-TKI 獲得耐性変異である T790M (Nakamura, J Thorac Oncol, 2011)、EGFR-TKI 効果予測因子である exon19 欠失、L858R (Nakamura, J Thorac Oncol, 2012) のモニタリングシステムを構築した。血漿遊離 DNA T790M の検出率は EGFR-TKI 獲得耐性の 53% (10/19) で、がん組織を用いた結果と同等であった。また、exon19 欠失と L858R は各々 44.7% (21/47) と 8.7% (2/23) で検出され、癌の進行に相関して検出率が高くなる傾向がみられた。

2. 研究の目的

本研究は、血漿分子マーカーを経時的にモニタリングすることで EGFR-TKI 獲得耐性機序を推定し、**耐性化機序に応じてより適切な次治療を選択することで、個々の患者により適したテーラーメイド治療を行うこと**を目的とし、以下のテーマについて検討する。

(1) 血漿遊離 DNA を用いた非侵襲的 EGFR 遺伝子変異モニタリングシステムの確立

(2) 血漿分子マーカーを用いた EGFR-TKI 再投与や次世代 EGFR-TKI の効果予測因子の検討

3. 研究の方法

(1) 血漿遊離 DNA を用いた非侵襲的 EGFR 遺伝子変異モニタリングシステムの確立

1) 血漿遊離 DNA T790M 検出と EGFR-TKI 獲得耐性の相関について多施設共同前向き研究

(2) 血漿分子マーカーを用いた EGFR-TKI 再投与や次世代 EGFR-TKI の効果予測因子の検討

1) 第一世代 EGFR-TKI 獲得耐性後の第一世代 EGFR-TKI 再投与の効果予測因子としての血漿 T790M 変異、血漿 HGF モニタリング有用性の検討

2) 第一世代 EGFR-TKI 獲得耐性後の第二世代 EGFR-TKI であるアファチニブ再投与効果予測因子としての血漿 T790M 変異、血漿 HGF モニタリング有用性の検討

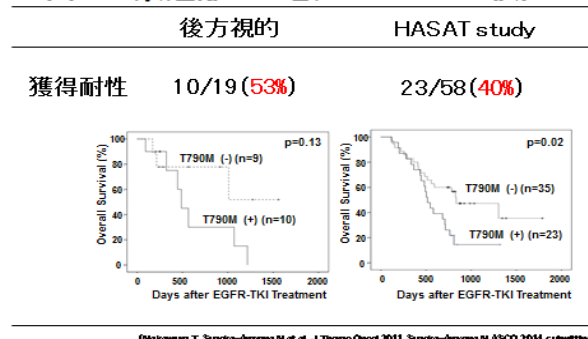
4. 研究成果

(1) 血漿遊離 DNA を用いた非侵襲的 EGFR 遺伝子変異モニタリングシステムの確立

1) 血漿遊離 DNA T790M 検出と EGFR-TKI 獲得耐性の相関について多施設共同前向き研究 (HASAT Study)

第一世代 EGFR-TKI にて加療中の肺癌患者にて血漿 T790M 変異を経時的にモニタリングし、臨床的な増悪と、血漿からの T790M 変異検出に相関があるかの多施設共同前向き観察研究を施行し、EGFR-TKI 獲得耐性となった肺癌患者の 40% で血漿から T790M 変異が検出された (図 1)。この結果は組織を用いた検討や、以前我々が行った後ろ向き研究の結果とほぼ同等であり、再現性のある結果であると考えられた。また、血漿 T790M 変異陽性の患者は陰性の患者より有意に予後不良であり、こちらも再現性のある結果であった。

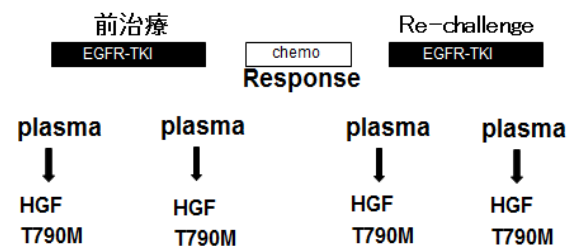
図1 血漿遊離DNAを用いたT790M検出



(2) 血漿分子マーカーを用いた EGFR-TKI 再投与や次世代 EGFR-TKI の効果予測因子の検討

図 2 で示すように EGFR-TKI 前治療と再投与の前後で血漿 T790M 変異の検出状況と、HGF 量を経時的に測定することで再投与の効果予測因子を検討した。

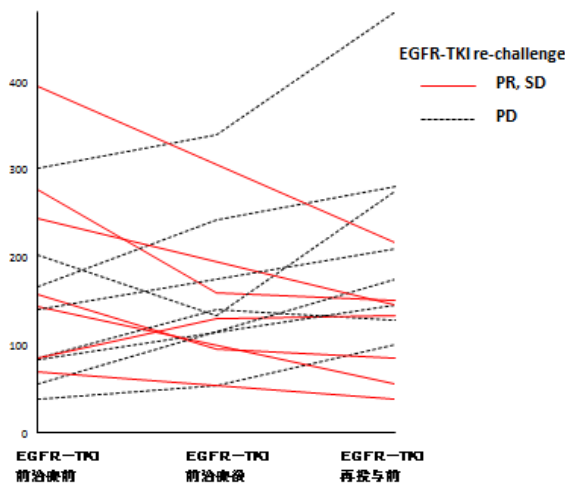
図2 EGFR-TKI re-challenge症例の検討



第一世代 EGFR-TKI 前治療 PD 後から第一世代 EGFR-TKI 再投与前にかけての血漿 HGF を経時的に測定したところ、血漿 HGF が低下傾向の

症例では EGFR-TKI 再投与が有効であるのに対して血漿 HGF が上昇傾向の症例では再投与無効であった(図3)。そのため EGFR-TKI 再投与前の HGF を前治療前の HGF で割った比を求めることは EGFR-TKI 再投与の効果予測に有用ではないかと考えられた。

図3 血漿HGF値の推移



1) 第一世代 EGFR-TKI 獲得耐性後の第一世代 EGFR-TKI 再投与の効果予測因子としての血漿 T790M 変異、血漿 HGF モニタリング有用性の検討

第一世代 EGFR-TKI 獲得耐性から再投与までの間に血漿 T790M 変異が検出された症例が 5 例あったが、5 例中 4 例は再投与無効であった。また、血漿 HGF 比 1.5 に上昇している症例が 8 例あったが 8 例中 7 例は再投与無効であった(表 1)。血漿分子マーカーと第一世代 EGFR-TKI 再投与の治療効果について単変量解析を行ったところ血漿 HGF 比 < 1.5 (P=0.005)、血漿 T790M 検出歴がなく、かつ血漿 HGF 比 < 1.5 (P<0.001) の症例で有意に再投与の効果が高かった。

表1 血漿分子マーカーと第一世代EGFR-TKI 再投与治療効果

No	EGFR-TKI 前治療		血漿分子マーカー		EGFR-TKI 再投与	
	効果	T790M 検出歴	HGF比	効果	PFS	
1	PR	(-)	0.4	PR	78	
2	PR	(+)	0.5	PR	95	
3	PR	(-)	0.6	SD	81	
4	SD	(-)	0.6	SD	60	
5	SD	(-)	NE	SD	77	
6	SD	(-)	0.5	SD	149	
7	PR	(-)	1.7	SD	138	
8	PR	(-)	0.6	SD	95	
9	SD	(-)	1.9	PD	16	
10	PR	(-)	1.7	PD	22	
11	PR	(-)	3.2	PD	34	
12	PR	(-)	1.5	PD	25	
13	PR	(+)	2.3	PD	26	
14	SD	(+)	1.5	PD	40	
15	PR	(+)	1.7	PD	44	
16	PR	(+)	1.4	PD	18	

2) 第一世代 EGFR-TKI 獲得耐性後の第二世代 EGFR-TKI であるアファチニブ再投与効果予測因子としての血漿 T790M 変異、血漿 HGF モニタリング有用性の検討

第一世代 EGFR-TKI 獲得耐性からアファチニブ再投与までの間に血漿 T790M 変異が検出された症例が 7 例あったが、7 例中 5 例(71%)で SD 以上の効果が得られていた(表 2)。これは第一世代 EGFR-TKI 再投与と比較しても明らかに良い結果であり、アファチニブは細胞株を用いた実験では T790M 変異に対して効果が得られていることとも合致する結果であった。

表2 血漿分子マーカーとafatinib再投与治療効果

No	EGFR 遺伝子変異	Afatinib投与前血漿分子マーカー		Afatinib治療効果	
		T790M	HGF比	効果	PFS(day) 平均(day)
1	L858R	(+)	NA	PR	165
2	exon19del	(+)	NA	PR	385
3	L858R	(+)	0.8	SD	85
4	L858R	(+)	0.7	SD	328
5	exon19del	(+)	1.6	SD	131
6	exon19del	(-)	1.5	SD	124
7	L858R	(-)	0.8	SD	98
8	L858R	(-)	1.3	SD	75
9	L858R	(-)	0.6	SD	175
10	L858R	(-)	NA	SD	119
11	L858R	(+)	1.2	PD	14
12	L858R	(+)	1.3	PD	56

また、アファチニブ獲得耐性後にアファチニブ再投与を施行されている症例 3 例の検討では、1 回目のアファチニブ獲得耐性後に全例 T790M 変異陽性、HGF 比 1.5 の上昇を認めており、その結果全例でアファチニブ再投与は無効であった(表 3)。この結果よりアファチニブは T790M 変異陽性でもある程度の効果は期待できるが、HGF 比の上昇を伴うと効果が乏しいと考えられた。

表3 afatinib獲得耐性後afatinib再投与例

No	EGFR 遺伝子変異	初回Afatinib投与前血漿分子マーカー		初回Afatinib治療効果		Afatinib再投与前血漿分子マーカー		初回Afatinib治療効果
		T790M	HGF比	効果	PFS(day)	T790M	HGF比	
1	L858R	(+)	NA	PR	165	(+)	1.7	PD
7	L858R	(-)	0.8	SD	98	(+)	1.5	PD
8	L858R	(-)	1.3	SD	75	(+)	1.7	PD

これらの結果より、血漿 T790M と HGF のモニタリングは第一世代 EGFR-TKI 再投与や第二世代 EGFR-TKI であるアファチニブの治療効果予測因子として有効背ある可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Naoko Sueoka-Aragane et al, Monitoring EGFR T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. Cancer Science, 査読有 107,2016,162-7

〔学会発表〕(計14件)

血漿を用いた EGFR 活計化型変異モニタリングシステムの確立(発表者 中村朝美)第53回日本呼吸器学会学術講演会  
EGFR-TKI 再投与症例における血漿 DNA を用いた EGFR 遺伝子変異モニタリング(発表者 中村朝美)第54回日本肺癌学会総会

血漿を用いた EGFR-TKI 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第54回日本肺癌学会九州支部会

血漿を用いた EGFR-TKI 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第54回日本呼吸器学会学術講演会

Monitoring EGFR T790M using plasma DNA in lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitor in a prospective observational study(発表者 荒金尚子)2014年米国癌治療学会  
血漿を用いた EGFR-TKI 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第12回日本臨床腫瘍学会

血漿を用いた EGFR-TKI 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第73回日本呼吸器学会日本結核病学会九州支部秋季学術講演会

血漿を用いた EGFR-TKI 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第55回日本肺癌学会

血漿を用いた EGFR-TKI 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第55回日本肺癌学会九州支部会

血漿を用いた afatinib 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第55回日本呼吸器学会学術講演会

血漿を用いた afatinib 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第19回日本がん分子標的治療学会

Potential predictive markers for re-challenge with first generation and second generation EGFR-TKI(発表者 中村朝美)第16回世界肺癌学会

血漿を用いた afatinib 再投与効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第75回日本呼吸器学会日本結核病学会九州支部秋季学術講演会

血漿を用いた EGFR-TKI s 効果予測因子の検討(発表者 中村朝美)第56回日本肺癌学会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 朝美 (NAKAMURA Tomomi)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号: 90457490

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: