

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430161

研究課題名(和文) EGFR遺伝子変異陰性肺癌におけるエルロチニブの効果予測因子の検討

研究課題名(英文) Analysis of predictive biomarker of Erlotinib to non-small cell lung cancer without EGFR mutation

研究代表者

曽根 崇 (Sone, Takashi)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号：30420334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR遺伝子変異陰性の進行再発非小細胞肺癌に対するエルロチニブの有効性安全性の第II相試験に登録された患者の腫瘍を用いて、エルロチニブの効果予測因子となる遺伝子異常を検討した。c-Metの遺伝子増幅は56例で解析可能であり、c-Met遺伝子増幅陰性症例でエルロチニブの無増悪生存期間が長い傾向を認めた。主要な遺伝子変異15を含むパネルを用いた次世代シーケンスを17例で実施し、TP53遺伝子変異を10例で認めたがエルロチニブの効果と関連は認めなかった。本解析では多くの遺伝子変異解析でlow coverageを認めた腫瘍のDNAの質の低下が問題となり次世代シーケンスの結果に影響をもたらした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed predictive biomarker of erlotinib to NSCLC patients(pts) who have wild-type EGFR. We utilized tumor tissue from the phase II study to evaluate of erlotinib in advanced NSCLC pts who have wild-type EGFR. C-Met gene amplification (GA) was evaluable in 56 patients and 11 pts showed c-Met GA. Progression free survivals of erlotinib was longer in pts with c-Met GA than those without GA. Next-generation sequencing (NGS) was analyzed in 17 pts using cancer panel of fifteen oncogene (TruSight Tumor 15). TP53 mutation was detected 10 pts among 17 pts. There was no difference in DCR, PFS between pts with TP53 mutation and those without TP53 mutation. In NGS analysis, "low coverage" was frequently observed due to low amount and low quality of DNA. In our study, we could not detect biomarker of efficacy of erlotinib to EGFR-wild pts. In NGS analysis using tiny tissue collected for diagnosis, it is matter to keep quality of DNA.

研究分野：肺癌

キーワード：EGFR遺伝子変異陰性 エルロチニブ 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

エルロチニブは *EGFR* 遺伝子変異が陰性の非小細胞肺癌に対しても有効な薬剤である。癌化、増殖の過程に重要な driver mutation といわれる遺伝子異常の探索および、分子標的薬の開発が進められてきている。肺癌においては 2004 年に *EGFR* 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌に *EGFR* チロシンキナーゼ阻害薬 (*EGFR*-TKI) が著効することが報告された。申請者らは非小細胞肺癌患者の腫瘍組織を用いて *EGFR* 遺伝子変異が *EGFR*-TKI の効果予測因子であることを報告した。(Sone T et al. Cancer 2007 May 1;109(9):1836-44) *EGFR*-TKI のうちエルロチニブは *EGFR* 遺伝子変異陰性の非小細胞肺癌に対しても約 10%の奏効率を示す。しかしながら *EGFR* 遺伝子変異陰性の肺癌においてエルロチニブがどのような患者に奏効するかは不明である。

EGFR 遺伝子変異の発見以降、driver mutation の探索とその遺伝子異常を標的とした分子標的薬の開発が勧められているが、治療薬が確立された遺伝子異常はわずかであり、非小細胞肺癌患者全体のうち *ALK* 阻害薬の有効性が示された *ALK* 融合遺伝子肺癌患者は約 3%である。既存の分子標的薬であるエルロチニブが奏効する約 10%の非小細胞肺癌患者を分子生物学的な解析により同定することは臨床応用に直結するため意義深いことである。

2. 研究の目的

EGFR 遺伝子変異陰性の非小細胞肺癌に置いてエルロチニブの効果予測因子となりうるバイオマーカーを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

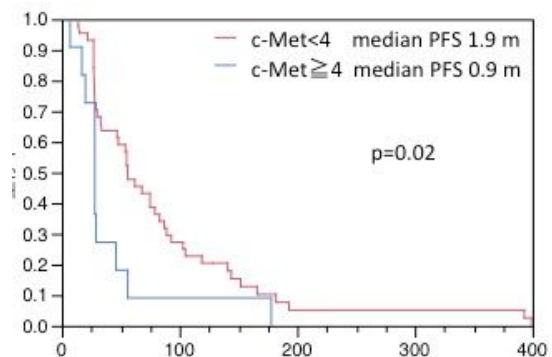
エルロチニブに対する 50%増殖阻害濃度により中等度感受性を示す細胞株は、*EGFR* 遺伝子変異陰性にも関わらず *EGFR*-TKI の奏効を示す非小細胞肺癌のモデルになりうる。エルロチニブ中等度感受性株と耐性株に対し遺

伝子異常の解析を行いエルロチニブ中等度感受性の細胞株で有意に認める遺伝子異常を同定する。

臨床検体を用いてエルロチニブの効果予測因子となりうる遺伝子異常を解析する。我々は「*EGFR* 遺伝子変異陰性の進行再発非小細胞肺癌に対するエルロチニブの有効性を検討する第 II 相試験」を実施してきた。同臨床試験では *EGFR* 遺伝子変異および遺伝子増幅を測定するために、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い腫瘍組織を収集し、二次利用について同意を取得した患者の腫瘍組織から抽出した DNA を保存した。同臨床試験において、エルロチニブ奏効例と、非奏効例の腫瘍細胞から抽出した DNA を用いて、次世代シーケンスを行いエルロチニブの効果と関連する遺伝子異常を明らかにする。

4. 研究成果

「*EGFR* 遺伝子変異陰性の進行再発非小細胞肺癌に対するエルロチニブの有効性を検討する第 II 相試験」における腫瘍検体を用いて、先行して主要な癌遺伝子である *EGFR* 遺伝子、*c-Met* の遺伝子増幅を解析した。臨床試験に登録された 78 名の患者の中、57 検体でバイオマーカー解析が可能であった。*EGFR* 遺伝子増幅は 57 例で解析可能であり、中央値は 1.0(range 0.7-4.0)であった。*c-Met* 遺伝子増幅は 56 検体で解析可能であり中央値は 2.9(range 1.5-8.2)であった。*c-Met* の遺伝子増幅を有する患者群ではエルロチニブの無増悪生存期間は短い傾向にあった。



同検体を用いて K-ras 遺伝子変異についても解析した。52 検体で解析可能であり 12 例で遺伝子変異(7 例 codon 12, 1 例 codon 13)を認めた。K-ras 遺伝子変異はエルロチニブの効果と関連は認めなかった。

次に腫瘍から抽出され保存された DNA を用いて次世代シーケンスを行なった。次世代背シーケンスには 15 の固形がん関連の遺伝子変異(AKT1, GNA11, NRAS, BRAF, GNAQ, PDGFRA, EGFR, KIT, PIK3CA, ERBB2, KRAS, RET, FOXL2, MET, TP53)を含む TruSight Tumor 15 を用いた。TruSight Tumor 15 の解析が可能 DNA 量のある検体は 17 例であった。17 例中、TP53 の遺伝子異常を以下のように 10 例で認めた。

症例番号	遺伝子変異	変異部位
HLCSG 04	TP61	832C>T, 524G>A, 673-1G>T
HLCSG 06	TP53	307-31-del, 524G>A, 451C>T
HLCSG 09	TP54	332T>A
HLCSG 14	TP60	832C>T
HLCSG 18	TP55	332T>A
HLCSG 36	TP53	307-31delTACC
HLCSG 48	TP59	725G>T
HLCSG 65	TP57	569C>T
HLCSG 67	TP56	451C>T
HLCSG 68	TP58	673-1G>T
HLCSG 15	検出なし	
HLCSG 31	検出なし	
HLCSG 35	検出なし	
HLCSG 39	検出なし	
HLCSG 47	検出なし	
HLCSG 63	検出なし	
HLCSG 64	検出なし	

TP53 を有する症例と認めない症例でエルロチニブの効果では TP53 遺伝子変異(+)の患者、(-)の患者で病勢制御率 71% vs 20% (p=0.16), PFS 1.0 ヶ月 vs 2.9 ヶ月 (p=0.13)と有意差は認めなかった。OS は TP53 遺伝子変異のない患者で長い傾向を認め予後因子の一つと考えられた。既述の direct-sequence 法に

よる K-ras 遺伝子変異の解析では、次世代シーケンスを行なった 17 例中 3 例で変異を認めており次世代シーケンスの結果と乖離を認めた。K-ras を含む他の遺伝子については、DNA のクオリティーの低さに起因すると思われる low coverage を認め解析が困難な検体が多くを占めた。

本研究においては、進行非小細胞肺癌の診断に用いられた腫瘍検体を用いて次世代シーケンスを試みたが、有効性と関連する遺伝子異常を見出すことはできなかった。肺癌に診断に用いられる検体は微小なものが多く保存状態を含め、次世代シーケンスに不適な検体が多かった。今後、次世代シーケンスを用いた研究においては検体の採取量及び保存が課題となる。

EGFR 遺伝子変異陰性の非小細胞肺癌に対する二次治療以降の選択肢として、研究開始時はエルロチニブの他にドセタキセルなどの殺細胞性抗がん剤のみであったが、免疫チェックポイント阻害薬の臨床応用が始まり、殺細胞性抗がん剤と血管新生阻害薬ラムシマブの併用など、既存の治療よりも優れた治療選択肢が開発された。免疫チェックポイント阻害薬を始めとする新規抗がん剤の登場により EGFR 遺伝子変異陰性の非小細胞肺癌に対するエルロチニブの役割は限られたものとなってきていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Watanabe S, Kasahara K, Waseda Y, Takato H, Nishikawa S, Yoneda Y, Hara J, Sone T, Kimura H, Nakao S. Imatinib ameliorates bronchiolitis obliterans via inhibition of fibrocyte migration and differentiation. J Heart Lung Transplant. 2017 Feb; 36(2) 138-147.
2. Yoneda T, Kase K, Amino Y, Ogawa N, Watanabe S, Hara J, Abo, M, Sone T, Kimura H, Kasahara K. A case of gingival cancer

with pulmonary metastases that developed complete atrioventricular block and ventricular fibrillation as a result of myocardial metastases. Clin Case Rep. 2016 Oct 10;4(12) 1075-1081

3. Kimura H, Nishikawa S, Koba H, Yoneda T, Sone T, Kasahara K. A Rapid and Sensitive Method for Detection of the T790M Mutation of EGFR in Plasma DNA. Adv Exp Med Biol. 2016; 924:171-174

4. Yoneda T, Koba H, Tanimura K, Ogawa N, Watanabe S, Hara J, Abo M, Sone T, Kimura H, Kasahara K. Postoperative Recurrence of Invasive Thymoma with Cold Agglutinin Disease and Autoimmune Hemolytic Anemia. Intern Med. 2016; 55(18) 2685-9.

5. Watanabe S, Kimura H, Takato H, Waseda Y, Hara J, Sone T, Abo M, Kasahara K. Severe pneumonitis after nivolumab treatment in a patient with melanoma. Allergol Int. 2016 Oct;65(4)487-489.

〔学会発表〕(計5件)

Koba H, Sone T, Kimura H, Kasahara K. Correlation between EGFR mutation T790M predominancy in initial biopsy detected by droplet PCR and acquired resistance mechanism to EGFR TKI. 2016 ASCO Annual Meeting 2015/6/3-6/7 McCormick place, Chicago, Illinois

Sone T, Kimura H, Kasahara K. A phase II study to evaluate the efficacy of erlotinib in advanced NSCLC patients who g]have wild-type EGFR and EGFR gene amplification. 2015 ASCO Annual Meeting 2015/5/29-6/2 McCormick place Chicago, Illinois

曾根崇、木村英晴、笠原寿郎、他 EGFR 遺伝子変異陰性肺癌に対するエルロチニブ第 II 相試験における K-ras 遺伝子変異陽性患者のサブセット解析 第 56 回日本肺癌学会学

術集会 パシフィコ横浜 2015 年 11 月 26 日

曾根崇、木村英晴、笠原寿郎、他 EGFR 遺伝子変異陰性の進行・再発非小細胞肺癌に対するエルロチニブの有効性の検討

第 55 回日本肺癌学会学術集会

京都国際会議場 2014 年 11 月 16 日

Nishikawa S, Sone T, Kimura H, Kasahara K. Retrospective analysis of prognostic factors in non-small cell lung cancer with EGFR mutations. 2014 ASCO Annual Meeting. 2014/5/30-6/3 McCormick place, Chicago, Illinois

〔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

曾根 崇 (SONE, Takashi)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号：30420334

(2) 研究分担者

笠原 寿郎 (KASAHARA, Kazuo)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30272967

木村 英晴 (KIMURA, Hideharu)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40444202

(3) 連携研究者 該当者なし

(4) 研究協力者 該当者なし