

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名：(日本語) 血中循環腫瘍細胞を用いた肺がん薬物療法における効果予測バイオマーカーの開発とその診断技術の確立
(英語) Development of a diagnostic platform and predictive biomarkers for lung cancer therapeutics utilizing circulating tumor cells

研究開発担当者 (日本語) 公立大学法人和歌山県立医科大学 内科学第三講座 教授 山本 信之
所属 役職 氏名：(英語) Third Department of Internal Medicine, Professor, Nobuyuki Yamamoto

実施期間：平成28年 9月 1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) CTCを用いた抗PD-L1抗体治療における効果予測バイオマーカーの開発
開発課題名：(英語) Development of predictive biomarkers for the efficacy of anti-PD-1 antibody therapy using circulating tumor cells

研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人和歌山県立医科大学 内科学第三講座 教授 山本 信之
所属 役職 氏名：(英語) Wakayama Medical University, Third Department of Internal Medicine, Professor, Nobuyuki Yamamoto

分担研究 (日本語) EGFR 阻害剤耐性獲得肺がんにおける CTC 診断の開発
開発課題名：(英語) Development of diagnostic tools for resistant mechanisms to EGFR tyrosine kinase inhibitors utilizing circulating tumor cells

研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人和歌山県立医科大学 内科学第三講座 准教授 洪 泰浩
所属 役職 氏名：(英語) Wakayama Medical University, Third Department of Internal Medicine, Associate professor, Yasuhiro Koh

分担研究 (日本語) 次世代自動化 CTC 濃縮実用装置の設計開発
開発課題名: (英語) Development of the next-generation automated enrichment system for the capture of circulating tumor cells

研究開発分担者 (日本語) 日立化成株式会社 メディカル事業ユニット 主任研究員 樋口 雅之
所属 役職 氏名: (英語) Hitachi Chemical Co.,Ltd. Medical business unit
Senior Researcher Masayuki Higuchi

II. 成果の概要 (総括研究報告)

【和文】

前向きのコホートにて免疫チェックポイント阻害剤治療における CTC の効果予測バイオマーカーとしての評価を行う試験を開始した。試験デザインは、和歌山県立医科大学で肺癌と診断され、本研究に腫瘍組織や血液検体を提供でき、抗 PD-L1 抗体にて治療を受ける症例で、治療開始前、治療開始後 4 週、8 週、12 週、24 週及び増悪時に CTC の検出を行い、CTC における PD-L1 発現を測定する。平成 28 年度の登録症例数は 40 例であった。その中の 30 例を対象として解析を行った。投与された免疫チェックポイント阻害剤は全例においてニボルマブであった。組織型は腺癌が約 70%であった。病期としては IV 期が約 70%であった。CTC と組織における PD-L1 発現の比較を行ったが、染色強度を加味しない tumor proportion score (TPS) 及び染色強度を加味する H-score のいずれにおいても相関は認めなかった。ニボルマブの治療効果との相関の検討においては、CTC における PD-L1 発現割合が高い症例において治療効果が高い傾向を認めた。このことは CTC が組織に替わって PD-L1 発現の評価に用いることができる可能性を示唆していると考えられた。平成 29 年度からの取り組みを予定している西日本がん研究機構での多施設における検証コホートでの取り組みについては、研究計画書の作成について取り組みを開始した。本コホートにおいては、他施設から送付されてくる血液検体での CTC 検出が重要課題となっていたが、血液保存管の選定とともに染色条件の最適化を行い、検出法の確立を行った。

EGFR 阻害剤に対する耐性獲得の機序として、約 50%を占める EGFR T790M 変異以外に AXL や HER2 といった分子の高発現が関与すると考えられている。再生検等の取り組みが現在積極的に行われているが、主要な耐性機序以外のものを限られた組織検体を用いて評価することは難しい。そこで本研究開発においては、CTC における AXL や HER2 の発現の評価を行うとともに、原発巣における発現との比較検討を行うことを目指し、CTC の代替組織としての可能性について探索的検討を開始した。平成 28 年度は、臨床検体での測定のための基礎検討として、CTC での HER2 及び AXL の発現の検出系の確立に取り組んだ。AXL 及び HER2 の発現レベルが既知の肺癌培養細胞株を用いて、健常人の末梢血に混入を行う、いわゆるスパイクインモデルにて検出条件の最適化を行った。その結果、AXL 及び HER2 の検出方法を確立できたことを確認し、次年度以降は臨床検体での測定を実施する予定にしている。加えて、AXL の過剰発現により EMT (epithelial mesenchymal transition) が誘導されることが知られており、EMT マーカーである vimentin 等による CTC の染色についても検討を実施しており、EMT マーカーについても臨床検体での評価を次年度以降に実施する予定である。

CTC 濃縮装置の開発においては、実用化向け CTC 診断パイロット装置の仕様設計および製作を行い、利便性および基本性能を評価し、目標特性に達していることを確認した。

【英文】

A clinical study to evaluate the predictive value of CTCs for advanced lung cancer patients who receive anti-PD-L1 antibodies has been launched. Peripheral whole blood was collected for CTC evaluation at baseline, week 4, 8, 12, 24 and disease progression. CTCs were detected using microcavity array system. PD-L1 expression was immunohistochemically examined on both tumor tissues and CTCs. Forty patients were registered in the study at Wakayama Medical University Hospital and 30 were analyzed. All patients received nivolumab as an immune checkpoint inhibitor. Demographics of the patients were as follows: median age 70 (range, 49 to 86); male 73 %; stage IV, 70 %; squamous/non-squamous, 27/73 %. No positive correlation was observed on PD-L1 expression between tumor tissues and CTCs based on TPS. Patients harboring CTCs with PD-L1 TPS 50% or more at baseline were significantly more likely to achieve non-PD than those harboring CTCs with TPS less than 50% ($p < 0.05$). PD-L1-expressing CTCs are suggested to hold potential for predicting clinical benefit. Predictive impact of CTCs and their PD-L1 expression will be evaluated in the validation cohort, which is a multicenter clinical study by West Japan Oncology Group. In this multicenter clinical study, blood samples will be stored up to 72 hours. CTC detection should be performed with these stored samples. We addressed this issue and optimized the condition for preserved blood samples for the study.

It is well-known that EGFR T790M mutation confers resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in about 50% of resistance cases. Other mechanisms have been reported such as AXL and HER2 overexpression/amplification. It is, however, difficult to test all resistance mechanisms with small biopsies, especially in lung cancer patients. In this study, we aimed to utilize CTCs to evaluate the expression of AXL and HER2 instead of tumor tissues, which can allow us noninvasive and real-time diagnosis. We first performed spike-in experiments using cell lines expressing various levels of AXL and HER2 and established immunohistochemistry for detecting those target proteins. Clinical evaluation using blood samples from lung cancer patients will be conducted next year. We also plan to detect EMT (epithelial mesenchymal transition) markers such as vimentin to evaluate the relationship of AXL expression and EMT status.

For the development of improved enrichment system, a pilot model has been designed and built. We confirmed that the pilot model met the levels of convenience, performance and advantages we desire.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Comparison of PD-L1 expression between tumor tissues and circulating tumor cells and tumor tissues in patients with lung cancer, 口頭, Koh Y, Yagi S, Akamatsu H, Tanaka A, Kanai K, Hayata A, Tokudome N, Akamatsu K, Higuchi M, Kanbara H, Ueda H, Nakanishi M, Yamamoto N, EORTC-NCI-AACR 2016, 2016/12/1, 国外（ドイツ、ミュンヘン）。
2. Comparative analysis of PD-L1 expression between circulating tumor cells and tumor tissues in patients with lung cancer. ポスター発表, Koh Y, Yagi S, Akamatsu H, Tanaka A, Kanai K, Hayata A, Tokudome N, Akamatsu K, Higuchi M, Kanbara H, Ueda H, Nakanishi M, Yamamoto N, IASLC 17th World Conference on Lung Cancer 2016/12/6, 国外（オーストリア、ウィーン）。
3. Diverse patterns of PD-L1 expression on circulating tumor cells in Japanese patients with advanced lung cancer. ポスター発表, Koh Y, Akamatsu H, Yagi S, Tanaka A, Kanai K, Hayata A, Tokudome N, Higuchi M, Kanbara H, Nakanishi M, Ueda H, Yamamoto N. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内。
4. Development of the automated size-based filtration system for isolation of CTCs in lung cancer patients. ポスター発表, Yagi S, Koh Y, Akamatsu H, Tanaka A, Kanai K, Hayata A, Akamatsu K, Higuchi M, Kanbara H, Nakanishi M, Ueda H, Yamamoto N, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内。
5. 肺がん患者における CTC 自動検出システムの開発. 口頭, 八木理美, 洪泰浩, 赤松弘朗, 田中彩加, 金井一修, 早田敦志, 徳留なほみ, 赤松啓一郎, 樋口雅之, 上原寿茂, 中西正典, 上田弘樹, 山本信之, 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 2016/12/21, 国内。
6. 肺がんにおける循環腫瘍細胞での PD-L1 発現の検討. ポスター発表, 上林聡之, 洪泰浩, 赤松弘朗, 八木理美, 田中彩加, 金井一修, 早田敦志, 徳留なほみ, 赤松啓一郎, 樋口雅之, 上原寿茂, 中西正典, 上田弘樹, 山本信之, 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 2016/12/21, 国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 肺がん医療の最前線, 洪泰浩, 平成 28 年度生涯研修センター研修会 最新の医療カンファレンス, 2016/9/8, 国内。
2. 肺癌診療の現状と展望, 山本信之, 日本呼吸器学会 第 37 回生涯教育講演会(秋季), 大阪市, 2016/11/6, 国内。

(4) 特許出願
該当なし。