

平 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) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) Liquid Biopsy による分子標的薬の治療感受性・抵抗性の予測および新規獲得耐性機序の解明
(英語) Prediction of sensitivity and resistance to targeted therapy by liquid biopsy and elucidation of novel resistant mechanism

研究開発担当者 (日本語) 近畿大学医学部 教授 西尾和人
所属 役職 氏名： (英語) Kindai University Faculty of Medicine, Professor, Kazuto Nishio

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリング
開発課題名： (英語) Clinical monitoring of acquired resistant mutations to EGFR-TKI by liquid biopsy in lung cancer patients

研究開発分担者 (日本語) 九州大学病院 診療准教授 岡本勇
所属 役職 氏名： (英語) Kyusyu University Hospital, Associate professor, Isamu Okamoto

分担研究 (日本語) ALK, RET, ROS1 融合遺伝子陽性肺癌の分子標的薬に対する耐性化機序の解明
開発課題名： (英語) Elucidation of resistant mechanisms to lung cancers with TKIs in ALK, RET, and ROS1 fusions

研究開発分担者 (日本語) がん研究会有明病院 部長 西尾誠人
所属 役職 氏名： (英語) Cancer Institute Hospital, Medical director, Makoto Nishio

分担研究 (日本語) FGFR 阻害剤への適応に対する Liquid biopsy を含む
FGFR 遺伝子異常スクリーニング

開発課題名: (英語) Genetic screening of oncogenic drivers in squamous cell carcinoma

研究開発分担者 (日本語) 東京医科大学 主任教授 池田徳彦

所属 役職 氏名: (英語) Tokyo Medical University Hospital, Professor, Norihiko Ikeda

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

本研究では、Liquid Biopsy による遺伝子診断技術、すなわち、患者の病態により検体採取が左右されない「非侵襲的なバイオマーカー」診断技術を確立し、分子標的薬の治療感受性・抵抗性の予測ならびに新規獲得耐性機序の解明にこれらの技術を臨床応用することを目的とした。本研究計画では、3つの実施項目(1. Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリング, 2. 血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究, 3. ALK, RET, ROS1 融合遺伝子陽性肺癌の分子標的薬に対する耐性化機序の解明)を計画した。Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングとして、EGFR-TKI 投与前後の比較による Liquid Biopsy の有用性の検討、腫瘍組織検体と血漿検体との比較による Liquid Biopsy の有用性の検討を行い、腫瘍組織検体と血漿検体における EGFR 遺伝子変異の高い一致率を示し、血清・血漿検体における EGFR 遺伝子変異検出の有用性を示した。また Liquid biopsy の新しいアプローチとして遺伝子変異のみならず、EGFR 耐性化機序の一つである MET、HER2 遺伝子コピー数増加を Liquid biopsy で検出する系を確立し、実臨床サンプルでの検出に成功した。これらの成果に基づき、九州大学を中心とした前向き臨床試験を開始し、研究期間内に目標症例 100 症例の登録を完遂した。血中融合遺伝子の検出法の確立について実施した ALK 融合遺伝子陽性患者 47 症例の Liquid biopsy 検体の解析では、残念ながら ALK 二次的変異の検出は叶わなかった。CTC からの検出に関わる研究については、肺癌での各種遺伝子検出は困難であったが、前立腺がんを対象とし、新しい CTC 補足機を用いた解析に期待している。ALK, RET, ROS1 融合遺伝子陽性肺癌の分子標的薬に対する耐性化機序の解明に関わる研究開発」では、初代培養細胞株に樹立が順調に進み、ゲノム解析による耐性化変異が同定された。また、Liquid Biopsy による FGFR 遺伝子異常スクリーニングを対象とした新たなアプローチを試み、FGFR 遺伝子変異の検出系を確立した。同手法を用いて Liquid Biopsy による FGFR 遺伝子異常のスクリーニング研究を開始した。

本研究のゴールとして設定した論文は、採択論文 3 報であり、2 報が執筆中である。これらの研究成果により、分子標的薬の治療感受性・抵抗性の予測におけるリキッドバイオプシーの有用性が予定通り示されたと考えている。

英文

The purpose of this research project is to establish a robust and non-invasive diagnostic technology (digital PCR and deep sequencing) for liquid biopsy. This technology will be utilized to predict drug sensitivity and resistance to targeted agents and for the elucidation of acquired resistant mechanisms.

The plan of action was as follows; 1. Monitoring of secondary gene mutations related to resistance to EGFR-TKI in liquid biopsy, 2. Establishment of detection of fusion genes in blood samples and its feasibility study, 3. Elucidation of the mechanisms of resistance to targeted agents in lung cancer harboring ALK, RET, and ROS1 fusion genes.

We analyzed the gene mutations in matched tumor and plasma samples and demonstrated the clinical utility of detection of EGFR mutation in liquid biopsy. EGFR mutations was detected in tumor and plasma samples with high concordance in a sample cohort.

We also attempted to detect the copy number gain of MET and HER2 in liquid samples by digital PCR and successfully detect the MET and HER2 copy number gain in plasma.

We conducted a prospective clinical study in collaboration with a research group in Kyushu University and completed the collection of clinical samples from 100 patients.

We tried to detect the fusion genes in blood using digital PCR but failed to detect secondary mutations of ALK in liquid biopsy. Detection of driver gene mutation on circulating tumor cells in various cancer patients. We failed to detect any gene mutations on CTCs of lung cancer patients but are now trying to detect the gene mutations in CTCs of prostate cancer patients using new CTC trapping technology. We established ~20 primary culture cell lines from the fusion-positive lung cancer tissues resistant to TKIs successfully and detected the mutations related to resistance by genomic analysis.

We established a new screening system to detect FGFR gene alterations in liquid biopsy and began the screening of liquid biopsy and could detect the FGFR1 gene alteration in the plasma in some cases.

The goal of this research project is publication. Three manuscripts have been accepted and two additional manuscripts are in preparation. In conclusion, we have demonstrated the clinical utility of liquid biopsy for the prediction of sensitivity and resistance to targeted agents as scheduled.

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 7件）

1. Hibi M, Kaneda H, Tanizaki J, Sakai K, Togashi Y, Terashima M, Velasco MA, Fujita Y, Banno E, Nakamura Y, Takeda M, Ito A, Mitsudomi T, Nakagawa K, Okamoto I, Nishio K. FGFR gene alterations in lung squamous cell carcinoma are potential targets for the multikinase inhibitor nintedanib. *Cancer Sci*, 107(11): 1667–76, 2016.

2. Ohira T, Sakai K, Matsubayashi J, Kajiwaru N, Kakihara M, Hagiwara M, Hibi M, Yoshioka K, Maeda J, Ohtani K, Nagao T, Nishio K, Ikeda N. Tumor volume determines the feasibility of cell-free DNA sequencing for mutation detection in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*, 107(11): 1660-6, 2016.
3. Ishii H, Azuma K, Sakai K, Kawahara A, Yamada K, Tokito T, Okamoto I, Nishio K, Hoshino T. Digital PCR analysis of plasma cell-free DNA for non-invasive detection of drug resistance mechanisms in EGFR mutant NSCLC: Correlation with paired tumor samples. *Oncotarget*, 6(31): 30850-8, 2015.
4. Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, Yoneshige A, Ito A, Togashi Y, De Velasco MA, Terashima M, Fujita Y, Tomida S, Tamura T, Nakagawa K, Nishio K. Extended RAS and BRAF Mutation Analysis Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One*, 10(5): e0121891, 2015.
5. Kim H, Terazono H, Nakamura Y, Sakai K, Hattori A, Odaka M, Girault MA, Arao T, Nishio K, Miyagi K, Yasuda K. Development of On-Chip Multi-Imaging Flow Cytometry for Identification of Imaging Biomarkers of Clustered Circulating Tumor Cells. *PLOS ONE*, 9(8): e104372, 2014. 国外
6. Kimura H, Ohira T, Uchida O, Matsubayashi J, Shimizu S, Nagao T, Ikeda N, Nishio K. Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 83(3): 329-33, 2014. 国外
7. Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys PY, Awad MM, Yanagitani N, Kim S, Pferdekammer AC, Li J, Kasibhatla S, Sun F, Sun X, Hua S, McNamara P, Mahmood S, Lockerman EL, Fujita N, Nishio M, Harris JL, Shaw AT, Engelman JA. ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer discovery*, 4(6): 662-73, 2014. 国外

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 西尾和人、金田裕靖、谷崎潤子、坂井和子、富樫庸介、寺嶋雅人、デベラスコマルコ、藤田至彦、坂野恵里、中村雄、武田真幸、伊藤彰彦、光富徹哉、岡本勇、中川和彦、FGFR 遺伝子異常を有する肺扁平上皮癌の術後再発生存期間に対する影響とマルチキナーゼ阻害薬に対する感受性 (ポスター)、第 105 回日本肺癌学会関西支部学術集会、2017/2/25、国内
2. 坂井和子、大平達夫、松林純、梶原直央、垣花昌俊、萩原優、吉田浩一、前田純一、大谷圭志、長尾俊孝、西尾和人、池田徳彦、比較的早期の肺癌患者由来 cell free DNA の体細胞遺伝子変異検出率の臨床病理学的規定因子の検討(ポスター)、第 105 回日本肺癌学会関西支部学術集会、2017/2/25、国内
3. Sakai K, Hibi M, Kaneda H, Tanizaki J, Togashi Y, Terashima M, Velasco MA, Fujita Y, Banno E, Nakamura Y, Takeda M, Ito A, Mitsudomi T, Nakagawa K, Nishio K. FGFR gene alterations in lung squamous cell carcinoma are potential targets for the multikinase inhibitor nintedanib. (口頭発表) The 12th International Conference on Protein Phosphatase, Higashi-Osaka City, 2016/10/27-30, 国内

4. 荒牧直、吉田浩一、大谷圭志、前田純一、萩原優、垣花昌俊、梶原直央、大平達夫、池田徳彦、肺癌における手術時診断N1 切除例の臨床病理学的特徴と予後の検討（口演）、第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016/12/21、国内
5. 牧野洋二郎、裴恩真、尹晶煥、真村瑞子、大平達夫、黒田雅彦、池田徳彦、Linker-phosphorylated Smad2 and STAT3 induce resistance to tyrosine kinase inhibition in lung cancer（ポスター）、第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016/12/21、国内
6. 大平達夫、坂井和子、前原幸夫、前田純一、吉田浩一、萩原優、垣花昌俊、岡野哲也、松林純、梶原直央、長尾俊孝、西尾和人、池田徳彦、肺癌手術患者に対するリキッドバイオプシーの有用性と限界（口演）、第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016/12/19、国内
7. Aramaki N, Ishii G, Aokage K, Hishida H, Yoshida J, Tsuboi M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N, Drastic Morphological and Molecular Differences between Lymph Node Micrometastatic Tumors and Macrometastatic Tumors of Lung Adenocarcinoma（ポスター）、17th World Conference on Lung Cancer, 2016/12/7, 国外
8. Yoneyana R, Aoshiha K, Furukawa K, Saito M, Kataba H, Nakamura H, Ikeda N, Nicotine Enhances Hepatocyte Growth Factor-Mediated Lung Cancer Cell Migration（ポスター）、17th World Conference on Lung Cancer, 2016/12/7, 国外
9. Ohira T, Sakai K, Maehara S, Maeda J, Yoshida K, Hagiwara M, Kakihana M, Okano T, Kajiwara N, Nishio K, Ikeda N, The Feasibility of Cell-Free DNA Sequencing for Mutation Detection in Non-Small Cell Lung Cancer Was Determined by Tumor Volume（ポスター）, 17th World Conference on Lung Cancer, 2016/12/5, 国外
10. Kawaguchi Y, Okano T, Imai KT, Maehara S, Maeda J, Yoshida K, Hagiwara M, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N, Prognostic Impact of EGFR Mutation in Patients with Surgically Resected Lung Adenocarcinoma; Analysis about Subtypes of EGFR Mutations（ポスター）, 17th World Conference on Lung Cancer, 2016/12/5, 国外
11. 大平達夫、今井健太郎、前原幸夫、大谷圭志、前田純一、吉田浩一、萩原優、垣花昌俊、岡野哲也、梶原直央、池田徳彦、呼吸器内視鏡検査で得られた細胞診検体を用いた遺伝子解析の有効性（口演）、第 39 回日本呼吸器内視鏡学会学術集会、2016/6/24、国内
12. Ohira T, Matsubayashi J, Otani K, Maeda J, Yoshida K, Hagiwara M, Kakihana M, Kajiwara N, Nagao T, Ikeda N, The specimen sampling and handling for tailor made treatment of the lung cancer（口演）, The 19th International Congress of Cytology , 2016/5/29, 国外
13. 北園聡、坂井和子、高野夏希、川嶋庸介、小栗知世、丹保裕一、柳谷典子、堀池篤、大柳文義、宝来威、西尾和人、西尾誠人、血中 cfDNA を用いた EGFR 遺伝子変異の検出と afatinib の臨床効果（ポスター）、第 56 回日本肺癌学会学術集会、2015/11/18、国内
14. 西尾和人、がん分子標的薬のバイオマーカーと最適化医療（口頭発表）、第 4 回化学療法カンファレンス、2015/11/18、国内
15. Nakagawa K, Seto T, Satouchi M, Nishio M, Hotta K, Murakami H, Ohe Y, Takeda K, Tatsuno M, Yoshikawa N, Tanaka T, Tamura T. Antitumor activity of alectinib (CH5424802/R05424802) for ALK-rearranged NSCLC with or without prior crizotinib treatment in bioequivalence study（ポスター）. 2014 ASCO Annual Meeting, 2014. 5. 30-6. 4. 国外

16. Justin F. Gainor LF, Katayama R, Awad MM, Lockerman EL, Schultz K, Mahmood S, Nishio M, Yanagitani N, Sequist LV, Mino-Kenudson M, Engelman JA, Shaw AT. Evolution of resistance in ALK-positive patients treated with ALK tyrosine kinase inhibitors (TKIs) (ポスター) . 2014 ASCO Annual Meeting, 2014. 5.30-6.4. 国外
17. Kudo Y, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K, Osawa J, Maehara S, Maeda J, Matsuyabashi J, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Impact of EGFR mutation status on survival after recurrence in patients with completely resected lung adenocarcinoma (ポスター) . 2014 IASLC Asia Pacific Lung Cancer Conference, 2014. 国外
18. 大平達夫、及川武史、山口学、加藤靖文、前田純一、吉田浩一、萩原優、垣花昌俊、梶原直央、筒井英光、池田徳彦、肺癌治療成績向上のためのバイオマーカー研究 (口頭発表)、2014. 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 西尾和人、がんのゲノム医療・遺伝子検査に基づく個別化治療の実相、第9回市民公開講座 (近畿大学医学部附属病院がんセンター主催)、近畿大学医学部、2017/3/14、国内
2. 池田徳彦、肺の病気総力特集非喫煙者の肺がん、NHK きょうの健康、2017/2/16、国内
3. 池田徳彦、肺がんの外科治療、池田徳彦、肺がん医療・疾患啓発のための市民公開講座肺がん疾患啓発キャンペーンもっと知ってほしい肺がんのこと 2016in 東京、2016/11/27、国内
4. 池田徳彦、肺がんの早期発見と外科治療、市民公開講座進歩する肺がん治療～手術、放射線、化学療法、新しい免疫療法について～、2016/4/3、国内

(4) 特許出願

該当なし