

T790M disappear? Successful gefitinib rechallenge after T790M disappearance in a patient with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 2013;8:e27-9.

- 15) Hata A, Katakami N, Yoshioka H, Kunimasa K, Fujita S, Kaji R, Notohara K, Imai Y, Tachikawa R, Tomii K, Korogi Y, Iwasaku M, Nishiyama A, Ishida T. How sensitive are epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors for squamous cell carcinoma of the lung harboring EGFR gene-sensitive mutations? *J Thorac Oncol*, 2013; 8: 89-95.
- 16) Saito H, Yoshizawa H, Yoshimori K, Katakami N, Katsumata N, Kawahara M, Eguchi K. Efficacy and safety of single-dose fosaprepitant in the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting in patients receiving high-dose cisplatin: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Ann Oncol*, 2013; 24:1067-73.

## 2. 学会発表

### 第 53 回日本呼吸器学会 2013.4.19-21 東京

1. 肺腺癌の EGFR-TKI 既治療例に対する EGFR-TKI+bevacizumab 治療の成績  
竹下純平
2. 獲得耐性後に検出された T790M が一定期間後に消失し、gefitinib 再投与が奏効した EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌の一例  
秦明登

### 第 36 回日本呼吸器内視鏡学会 2013.6. 20-21 埼玉

3. 気管支鏡検査時の鎮静薬投与方法の違いによる患者満足度の検討  
松本健、大歳丈博、藤本大智、川村卓久、玉井浩二、竹下純平、田中広祐、門田和也、永田一真、大塚今日子、中川淳、立川良、大塚浩二郎、富井啓介、藤田史郎、片上信之

### 第 18 回日本緩和医療学会 2013.6.21-22 横浜

4. 化学療法起因性の難治性嘔吐に対するプログステロン製剤（ヒスロン H®）の有効性の検討  
秦明登、藤田史郎、片上信之、増田義雄、岡田裕、蓬萊亜矢、高取健人、北島直人、白井裕子、三船祐佳

### 第 98 回日本肺癌学会関西支部会 2013.7.27 大阪

5. 獲得耐性後に検出された T790M が一定期間後に消失し、gefitinib 再投与が奏効した EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌の一例  
秦明登、竹下純平、加地玲子、真砂勝泰、藤田史郎、片上信之
6. 当院における動体追尾肺定位放射線治療を実施した 6 例に関する検討  
竹下純平、秦明登、加地玲子、真砂勝泰、藤田史郎、片上信之、高山賢二、小久保雅樹

### 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2013.8.29-31

## 仙台

7. 次世代 EGFR-TKIs  
片上信之
  8. Multiple primary malignancies in Japanese patients with non-small cell lung cancer  
藤田史郎、竹下純平、田中広祐、秦明登、加地玲子、高山賢二、小久保雅樹、片上信之
  9. Prognostic impact of central nervous system metastases and T790M status after Acquired resistance to EGFR-TKI  
秦明登、片上信之、吉岡弘鎮、加地玲子、藤田史郎、富井啓介、石田直
  10. EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌の CNS 病変に対する Gefitinib PD 後の erlotinib の有効性  
田中広祐、秦明登、加地玲子、藤田史郎、片上信之
  11. 中等度催吐性化学療法を受ける嘔気高リスク患者でのアプレピタント：プラセボ対照無作為化第 II 相試験(阪神がん研究グループ)  
谷岡真樹、北尾章人、松本光史、柴田直子、山口聡、藤原潔、南博信、片上信之、森田智視、根来俊一
- ### 第 54 回日本肺癌学会総会 2013.11.21-22 東京
12. Vero4DRT を用いた導体追尾肺定位放射線治療の初期臨床経験  
小久保雅樹、松尾幸憲、植木奈美、藤田史郎、高山賢二、片上信之、平岡真寛
  13. EGFR-TKI 憎悪後 EGFR 変異陽性 non-Sq-NSCLC に対する CBDCA+PTX+BEV 併用の第 2 相試験(阪神がん研究グループ 0109)  
西村尚志、砂留広伸、服部剛弘、里内美弥子、片上信之、藤田史郎、横田総一郎、難波良信、今村文生、西野和美、立原素子、森田智視、根来俊一
  14. ALK, EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌(手術不能 3 期)における根治的放射線化学療法の有効性  
田中広祐、小栗知世、朴将哲、清水淳市、堀尾芳嗣、吉田公秀、樋田豊明、矢田部恭、古平毅、片上信之、高山賢二、小久保雅樹
  15. 非小細胞肺癌(NSCLC)に対するペメトレキセド(PEM)単剤長期投与例の検討  
川村卓久、片上信之、加藤了資、清水亮子、大歳丈博、藤本大智、玉井浩二、松本健、永田一真、大塚今日子、中川淳、大塚浩二郎、竹下純平、秦明登、加地玲子、真砂勝泰、藤田史郎、富井啓介
  16. 当院における CT ガイド下生検(CTGB)の診断率と安全性の検討  
竹下純平、秦明登、加地玲子、真砂勝泰、藤田史郎、片上信之
  17. EGFR-TKI 獲得耐性後における中枢神経転移および T790M と予後の関連

秦明登、片上信之、吉岡弘鎮、富井啓介、石田直

18. 非小細胞肺癌症例における多重癌の検討  
藤田史郎、加藤了資、高島健司、竹下純平、  
秦明登、加地玲子、真砂勝泰、小久保雅樹、  
片上信之

**ERS ANNUAL CONGRESS BARCELONA**  
**Spain, 7-11 September**

19. Multiple primary malignancies in Japanese patients with non-small cell lung cancer  
藤田史郎、竹下純平、田中広祐、秦明登、加地玲子、高山賢二、小久保雅樹、片上信之

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。

**BIM遺伝子多型に起因するEGFR変異肺がんのEGFRチロシンキナーゼ阻害薬耐性を  
ポリノスタット併用で克服する研究（H25-創薬一般-005）**

**研究分担者 里内 美弥子 兵庫県立がんセンター 呼吸器内科**

**研究要旨**

本研究は、BIM 遺伝子多型を有する上皮成長因子受容体 (EGFR) 変異肺がんの臨床的特徴を明らかにするとともに、BIM 遺伝子多型に起因する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) 耐性克服を目指した医師主導治験でゲフィチニブ+ポリノスタット併用療法の安全性を検証することを目標としている。本施設では、本疾患群の臨床を明らかにする多施設共同前向き試験の共同研究施設になっており、本年度はプロトコールおよび患者説明文書を作成し、倫理委員会に承認申請を行った。

**A. 研究目的**

EGFR変異肺癌は、東アジア人に多く肺癌の約25%を占め、わが国では年間約2万人が発症していると推定され、EGFR-TKI（ゲフィチニブ、エルロチニブ）が一旦著効することが多いが、著効例でも必ず再発する（獲得耐性）ことや最初から奏効しない（初期耐性）症例が存在することが大きな問題となっている。2012年に共同研究者の間野らは、BIM遺伝子多型が東アジア人に特異的にみられEGFR変異肺癌のEGFR-TKI耐性の原因の一つであることを報告した (Nat Med, 2012)。BIM遺伝子多型は日本人を含む東アジア人の12~13%に存在するため、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌は、わが国で年間約2500人（2万x12.5%：肺癌の3%）存在すると推定される希少疾患群である。この症例群はPCRによるBIM遺伝子検査と保険収載されたEGFR変異測定とで正確に個別化でき、しかもキードラッグであるEGFR-TKIに耐性を示すため、個別化に基づいた新たな治療法の確立が必要である。

矢野らは、皮膚T細胞性リンパ腫に認可されたポリノスタットをEGFR-TKIに併用することでEGFR変異肺癌細胞のEGFR-TKI耐性を解除しうることを世界で初めて発見した (Cancer Res, 2013)。本研究は矢野らが独自に発見した基礎研究成果を臨床に橋渡しし、昨今の日本創薬に置ける『死の谷』を克服する意味においても非常に重要な位置づけとなる臨床研究である。

本研究の目的は、BIM遺伝子多型に起因した耐性症例の臨床的特徴を明らかにすること、およびEGFR-TKIに耐性となったBIM遺伝子多型陽性のEGFR変異肺がんを対象にゲフィチニブ+ポリノ

スタット併用の第1相試験により安全性プロファイルを明らかにし、最大耐容量を決定することである。

**B. 研究方法**

1. BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺がんの臨床的特徴を明らかにする前向き研究（PEOPLE-J）：新たにEGFR-TKI治療を受けるEGFR変異肺がん400例（約51例のBIM遺伝子多型陽性が見込まれる）において、末梢血を用いBIM遺伝子多型を測定し、ゲフィチニブの奏効性や生存期間との相関を前向きに検討する。H25年度は、研究計画書および患者説明・同意文書を作成し、分担研究機関の倫理審査を行うとともに、症例登録システムの作成、検体収集および解析方法の確立など、研究体制を構築する。

（倫理面への配慮）

患者の人権の保護のため、本医師主導治験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）およびその改正、関連通知を遵守して本研究を実施する。実施にあたり、あらかじめ当該研究機関の長の承認、届出、確認等を研究開始前に手続きする。動物実験を行う場合には、研究実施機関での事前承認を得て、使用する動物の匹数も最小限にとどめて行う。

**C. 研究結果**

# 1. BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺がんの臨床的特徴を明らかにする前向き研究 (PEOPLE-J) :

本前向き研究に参加する全施設の意見を集約するために開催された第1回班会議(平成25年8月30日)および第2回班会議(平成26年3月7日)に出席しプロトコールおよび患者説明同意文書作成について討議を行った。さらに、兵庫県立がんセンターの倫理委員会に承認申請を行った。

また、症例登録の準備として、登録候補者のリストアップ、症例の主治医や登録を補助するCRCに本研究内容を周知し、来年度の症例登録に向けて、院内における実施体制を整備した。

D. BIM 遺伝子多型に起因した症例は、EGFR 変異肺がんの8人に1人程度と希少であることが予想され、確実に対象症例を登録する院内体制の整備が重要と考え、本年度内に整備を行った。倫理委員会での承認が得られ次第、症例登録を開始する予定である。

## E. 結論

耐性症例の臨床的特徴を明らかにする試験の実施体制を整備した。H26年度には症例登録を開始する予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 英文

- 1) Urata Y, Okamoto I, Takeda M, Hattori Y, Okuno K, Shimada T, Kurata T, Kaneda H, Miyazaki M, Terashima M, Tanaka K, Morita S, Nakagawa K, Negoro S, Satouchi M. Phase 2 study of S-1 and carboplatin plus bevacizumab followed by maintenance S-1 and bevacizumab for chemotherapy-naïve patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer. **Cancer**, 2013; 119: 2275-81.
- 2) Satouchi M, Okamoto I, Sakai H, Yamamoto N, Ichinose Y, Ohmatsu H, Nogami N, Takeda K, Mitsudomi T, Kasahara K, Negoro S. Efficacy and safety of weekly nab-paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, 2013; 81: 97-101.
- 3) Yoshioka H, Okamoto I, Morita S, Ando M, Takeda

K, Seto T, Yamamoto N, Saka H, Atagi S, Hirashima T, Kudoh S, Satouchi M, Ikeda N, Iwamoto Y, Sawa T, Nakanishi Y, Nakagawa K. Efficacy and safety analysis according to histology for S-1 in combination with carboplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: updated results of the West Japan Oncology. **Ann Oncol**, 2013; 24:1326-31.

- 4) Hattori Y, Iwasaku M, Satouchi M, Nishiyama A, Korogi Y, Otsuka K, Fujita S, Katakami N, Mori M, Nishino K, Morita S, Negoro S. A Phase II Study of pemetrexed in chemotherapy-naïve elderly patients aged  $\geq 75$  years with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (HANSHIN Oncology Group 003). **Jpn J Clin Oncol**, 2013; 43: 1184-9.
- 5) Hattori Y, Satouchi M, Katakami N, Fujita S, Kaji R, Hata A, Urata Y, Shimada T, Uchida J, Tomii K, Morita S, Negoro S. A Phase II study pemetrexed in patients with previously heavily treated non-squamous non-small cell lung cancer. (Hanshin Oncology Group 001) **Cancer Chemother Pharmacol**, 2014; 73: 17-23.
- 6) Satouchi M, Kotani Y, Shibata T, Ando M, Nakagawa K, Yamamoto N, Ichinose Y, Ohe Y, Nishio M, Hida T, Takeda K, Kimura T, Minato K, Yokoyama A, Atagi S, Fukuda H, Tamura T, Saijo N. Phase III study comparing amrubicin plus cisplatin with irinotecan plus cisplatin in the treatment of extensive-disease small-cell lung cancer: JCOG 0509. **J Clin Oncol**, 2014; in press.

#### 和文

- 1) 服部 剛弘、里内 美弥子. 肺がんの薬物療法-最近の進歩 Beyond PD : Bevacizumab、腫瘍内科 2013;1125-32.

### 2. 学会発表

#### 海外

- 1) 2013 ASCO Annual Meeting. Benjamin J. Solomon, Scott N. Gettinger, Gregory J. Riely, Hiroshi Nokihara, Ji-Youn Han, Toyooki Hida, Miyako Satouchi, Editta Baldini, Salvatore Siena, Nobuyuki Yamamoto, Leora Horn, Vanessa Roberts Tassell, Anna Polli, and D. Ross Camidge. Subgroup analysis of crizotinib versus either pemetrexed (PEM) or docetaxel (DOC) in the phase III study (PROFILE 1007) of advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC), 2013年5月 Chicago, USA.

- 2) 15th World Conference on Lung Cancer. Aoe K, Aragane N, Nobuyuki K, Satuchi M, Yokota S, Iwanaga K, Kimura S, Negoro S. Monitoring EGFR T790M with plasma DNA in lung cancer patients treated with EGFR tyrosine kinase inhibitor in prospective observational study. 2013 年 10 月 Sydney, Australia
- 3) 15th World Conference on Lung Cancer. Namba Y, Hattori T, Satouchi M, Yokota S, Kumagai T, Imamura F, Fujita S, Katakami N, Nishimura T, Sunadome H, Tachihara M, Morita S, Negoro S. A phase II study of bevacizumab in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with non-squamous (Non-Sq) non-small-cell lung cancer (NSCLC) harboring mutations of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene after failing first-line EGFR-tyrosin kinase inhibitor. 2013 年 10 月 Sydney, Australia

#### 国内

- 1) 第 93 回日本呼吸器内視鏡学会近畿支部会、里内 美弥子、分子標的治療薬の適格患者の選択と ASCO2013 の TOPICS、2013 年 7 月、大阪市中央区
- 2) 第 98 回日本肺癌学会関西支部会 内堀 健、里内 美弥子、杉村 春佳、浦田 佳子、島田 天美子、服部 剛弘、根来 俊一、佐久間 淑子. Crizotinib 耐性時の投与中止により flare をきたした二症例、2013 年 7 月、大阪市中央区
- 3) 第 98 回日本肺癌学会関西支部会、杉村 春佳、里内 美弥子、内堀 健、浦田 佳子、島田 天美子、服部 剛弘、根来 俊一. クリゾチニブ治療中に発症した複雑性腎嚢胞の 1 例、2013 年 7 月、大阪市中央区
- 4) 第 53 回日本呼吸器学会・学術講演会、里内 美弥子. ALK 肺癌における治療戦略～組織採取から治療まで～、東京都、2013 年 4 月
- 5) 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 浦田 佳子、里内 美弥子、福正 りさ、奥野 恵子、島田 天美子、服部 剛弘、根来 俊一. クリゾチニブ加療後の増悪に関する検討、2013 年 8 月、仙台
- 6) 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会 内堀 健、里内 美弥子、浦田 佳子、島田 天美子、服部 剛弘、奥野 恵子、福正 りさ、根来 俊一、佐久間 淑子、梶本 和義. Pemetrexed 長期奏効例における EML4-ALK 融合遺伝子と EGFR 遺伝子変異についての検討、2013 年 8 月、仙台
- 7) 第 54 回日本肺癌学会総会 辻野 佳世子、橋本 知久、川口 弘毅、太田 陽介、島田 天美子、里内 美弥子、根来 俊一、副島 俊典. DVH・臨床因子の組み合わせによる重症放射線肺炎予測精度の向上、2013 年 11 月、東京
- 8) 第 54 回日本肺癌学会総会 西村 尚志、砂留 広伸、服部 剛弘、里内 美弥子、片上 信之、藤田 史郎、横田 総一郎、灘波 良信、今村 文生、西野 和美、立原 素子、森田 智視、根来 俊一. EGFR-TKI 増悪後 EGFR 変異陽性 non-Sq-NSCLC に対する CBDCA+PTX+BEV 併用の第 2 相試験(阪神がん研究グループ 0109)、2013 年 11 月、東京
- 9) 第 54 回日本肺癌学会総会 服部 剛弘、里内 美弥子、杉村 春佳、内堀 健、浦田 佳子、島田 天美子、根来 俊一、辻野 佳世子、副島 俊典、竹中 大祐、足立 秀治. 非小細胞肺癌における CDDP/S-1 併用化学放射線療法の検討、2013 年 11 月、東京
- 10) 第 54 回日本肺癌学会総会 浦田 佳子、里内 美弥子、杉村 春佳、内堀 健、島田 天美子、服部 剛弘、根来 俊一. クリゾチニブ加療後増悪時の継続投与に関する検討、2013 年 11 月、東京
- 11) 第 54 回日本肺癌学会総会 内堀 健、里内 美弥子、杉村 春佳、浦田 佳子、島田 天美子、服部 剛弘、根来 俊一、辻野 佳世子、副島 俊典、竹中 大祐、足立 秀治. 高齢者局所進行非小細胞肺癌における化学放射線治療(weekly CBDCA+weekly PTX+RT)についての検討、2013 年 11 月、東京
- 12) 第 54 回日本肺癌学会総会 里内 美弥子. 小細胞肺癌の治療戦略 Up-to-Date-初回治療から再発治療まで-、2013 年 11 月、東京
- 13) 第 94 回日本呼吸器内視鏡学会近畿支部会 杉村 春佳、里内 美弥子、内堀 健、山本 正嗣、浦田 佳子、島田 天美子、服部 剛弘、高瀬 直人、根来 俊一. 気管支鏡下に診断した悪性黒色腫肺転移、気管支転移の 3 症例、2013 年 11 月、大阪
- 14) 第 82 回呼吸器学会近畿地方会 杉村 春佳、里内 美弥子、内堀 健、山本 正嗣、浦田 佳子、島田 天美子、服部 剛弘、根来 俊一、西尾 渉. サルコイドーシス、サルコイド様反応を伴った

原発性肺癌の 5 症例の検討、2013 年 12 月、大阪府豊中市

- 15) 第 99 回日本肺癌学会関西支部会 山本 正嗣、里内 美弥子、杉村 春佳、内堀 健、浦田 佳子、服部 剛弘、島田 天美子、根来 俊一、梶本 和義、佐久間 淑子. 細胞診で小細胞肺癌と思われた成人 T 細胞リンパ腫の一例、2014 年 2 月、兵庫県姫路市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし。

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

BIM遺伝子多型に起因するEGFR変異肺がんのEGFRチロシンキナーゼ阻害薬耐性を  
ポリノスタット併用で克服する研究（H25-創薬一般-005）

研究分担者 安藤 昌彦 名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

研究要旨

本研究は、BIM 遺伝子多型を有する上皮成長因子受容体(EGFR)変異肺がんの臨床的特徴を明らかにするとともに、BIM 遺伝子多型に起因する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)耐性克服を目指した医師主導治験でゲフィチニブ+ポリノスタット併用療法の安全性を検証することを目標としている。本年度は、医師主導治験における組み入れ候補をスクリーニングするとともに EGFR-TKI・殺細胞性抗がん剤による治療結果と BIM 遺伝子多型の関連を探索的に検討するための多施設共同前向き試験の事務局として、症例登録・BIM 遺伝子多型測定結果ならびに臨床データ入力用 Web システムを開発した。現在、金沢大学をはじめとする 4 施設で運用を開始しており、目標とする 400 症例に到達するまで症例集積を行う。

A. 研究目的

EGFR変異肺癌は、東アジア人に多く肺癌の約25%を占め、わが国では年間約2万人が発症していると推定され、EGFR-TKI（ゲフィチニブ、エルロチニブ）が一旦著効することが多いが、著効例でも必ず再発する（獲得耐性）ことや最初から奏効しない（初期耐性）症例が存在することが大きな問題となっている。2012年に共同研究者の間野らは、BIM遺伝子多型が東アジア人に特異的にみられEGFR変異肺癌のEGFR-TKI耐性の原因の一つであることを報告した(Nat Med, 2012)。BIM遺伝子多型は日本人を含む東アジア人の12~13%に存在するため、BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺癌は、わが国で年間約2500人（2万x12.5%：肺癌の3%）存在すると推定される希少疾患群である。この症例群は PCRによるBIM遺伝子検査と保険収載されたEGFR変異測定とで正確に個別化でき、しかもキードラッグであるEGFR-TKIに耐性を示すため、個別化に基づいた新たな治療法の確立が必要である。

矢野らは、皮膚T細胞性リンパ腫に認可されたポリノスタットをEGFR-TKIに併用することでEGFR変異肺癌細胞のEGFR-TKI

耐性を解除しうることを世界で初めて発見した(Cancer Res, 2013)。本研究は矢野らが独自に発見した基礎研究成果を臨床に橋渡しし、昨今の日本創薬に置ける『死の谷』を克服する意味においても非常に重要な位置づけ

となる臨床研究である。

本研究の目的は、BIM遺伝子多型に起因した耐性症例の臨床的特徴を明らかにすること、およびEGFR-TKIに耐性となったBIM遺伝子多型陽性のEGFR変異肺癌を対象にゲフィチニブ+ポリノスタット併用の第1相試験（医師主導治験）により安全性プロファイルを明らかにし、最大耐容量を決定することである。

BIM 遺伝子多型の情報は保険診療下では得られないことから、医師主導治験の組み入れ候補となる症例を見つけるためのスクリーニング研究を実施する必要があることから、疫学研究の形で「BIM 遺伝子多型を有する EGFR 変異肺がんの臨床的特徴を明らかにする前向き研究（PEOPLE-J）」を立ち上げた。ここではその内容について報告する。

B. 研究方法

PEOPLE-J の対象患者は、EGFR-TKI（ゲフィチニブ又はエルロチニブ）治療を受けた既往がある、現在受けている、あるいは今後受ける予定の EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞がん患者（扁平上皮がんを除く）である。

目標症例数は 400 例とした。BIM 遺伝子多型の頻度が約 12.9%と考えられることから、PEOPLE-J において BIM 遺伝子多型陽性 EGFR 遺伝子変異肺癌が 50 例程度同定され、医師主導治験の組み入れ候補となる。

対象患者が適格規準を全て満たすことを確認し、

個人情報分担管理者が施設内匿名化コードを割り付け、Web システムにて症例登録を行う。登録の際、施設内匿名化コード、担当医名、性別、登録時年齢、適格条件・除外条件、文書同意取得日の入力が必要である。

症例登録完了時に Web システム上で登録番号が発行され、事務局から各施設の個人情報分担管理者ならびに研究責任者へ症例登録完了のメールが送付される。

症例登録後、各施設において患者から末梢血を採取し、中央測定機関へ送付する。中央測定機関において BIM 遺伝子多型の有無を PCR フラグメント解析法で測定する。測定結果は、個人情報分担管理者ならびに研究事務局へ郵送される検査報告書により通知される。

臨床データについては、ベースライン情報（組織型、診断方法（組織診または細胞診）、診断日、喫煙経験有無、EGFR 遺伝子変異内容、化学療法既往（EGFR-TKI・殺細胞性抗がん剤それぞれについて、「未実施・初回レジメン治療実施中・初回レジメン治療終了後」）、手術療法・放射線療法の既往、合併症の有無）を Web 入力する。事務局は施設に対し定期的に、初めて実施した EGFR-TKI 治療・殺細胞性抗がん剤治療それぞれについて、下記項目を Web 入力するようメールにてリマインドを行う。

治療開始日、治療開始時の臨床病期（IIIB、IV、術後再発）、治療開始時の PS、治療内容（EGFR-TKI では種類・用量、殺細胞性抗がん剤ではレジメン）、病変の種類（測定可能 or 評価可能）、測定可能病変の治療前（原則として治療開始前 28 日以内）画像情報（部位・長径・画像の種類・実施日）、測定可能病変の最良効果（最大縮小）時の画像情報（長径・画像の種類・実施日）、有害事象最悪グレード（白血球、ヘモグロビン、血小板、肝障害、皮膚障害、PS、疲労、食欲不振、下痢）、最終投与日、治療終了理由、増悪有無、増悪確認日（倫理面への配慮）

患者の人権の保護のため、本医師主導治験に関係するすべての研究者は、ヘルシンキ宣言、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）、疫学研究に関する倫理指針（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）およびその改正、関連通知を遵守して本研究を実施する。実施にあたり、あらかじめ

当該研究機関の長の承認、届出、確認等を研究開始前に手続きする。

## C. 研究結果

PEOPLE-J は、2013 年 12 月に金沢大学ヒトゲノム・遺伝子研究倫理審査委員会で承認されたのを始め、名古屋大学、東北大学、先端医療センター病院の計 4 施設において実施承認が得られている。現在のところ 4 例が金沢大学から症例登録されており、今後は医師主導治験の準備状況を見ながら、400 例集積まで施設登録・症例登録とも推進していく予定である。

BIM 遺伝子多型の有無と治療結果の関連について疫学研究として探索的に検討する点については、以下の通り解析計画を立案した。

- ・無増悪生存期間（PFS）及び全生存期間については、Kaplan-Meier 法にて BIM 遺伝子多型の有無別に生存曲線を描き、log-rank 検定を用いて群間比較を行う。性別、年齢、臨床病期、PS、喫煙経験有無、治療ライン（1st or 2nd 以降）、治療内容を共変量とする Cox 比例ハザードモデルを用い、BIM 遺伝子多型を有する場合のハザード比を推定する。

- ・腫瘍の最大縮小率：BIM 遺伝子多型の有無別に、標的病変の治療前長径を分母、最良効果（最大縮小）時長径を分子とする最大縮小率ならびに 95% 信頼区間を算出するとともに、t 検定を用いて群間比較を行う。性別、年齢、臨床病期、PS、喫煙経験有無、治療ライン（1st or 2nd 以降）、治療内容を共変量とする共分散分析を用い、調整した最大縮小率の群間比較を行う。

- ・有害事象：各々の有害事象について、BIM 遺伝子多型の有無別に最悪グレードを記述し、グレード 3 以上の有害事象の発生割合ならびに 95% 信頼区間（二項分布に基づく）を算出するとともに、Fisher's exact test を用いて群間比較を行う。性別、年齢、臨床病期、PS、喫煙経験有無、治療ライン（1st or 2nd 以降）、治療内容を共変量とする多変量ロジスティック分析を用い、有害事象発生について BIM 遺伝子多型を有する場合の調整オッズ比を算出する。

## D. 考察

これまでのところ、EGFR-TKI 治療による無増悪生存期間が BIM 遺伝子多型の有無により異なるか否かははっきりしていない。PEOPLE-J では、同一



対象集団において EGFR-TKI 治療のみでなく殺細胞性抗がん剤による初回治療についても PFS 等の有効性評価を行うことから、BIM 遺伝子多型の有無が EGFR-TKI 治療結果にのみ影響を及ぼすのか、あるいは殺細胞性抗がん剤治療結果に対しても影響するのかまで検討できるところが利点であると考えられる。

## E. 結論

BIM 遺伝子多型に起因する EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) 耐性克服を目指した医師主導治験を実施するために必要な疫学研究を立ち上げた。そこでは医師主導治験の被験者リクルートを目的として組み入れ候補スクリーニングを行うとともに、EGFR-TKI・殺細胞性抗がん剤による治療結果と BIM 遺伝子多型の関連を探索的に検討する。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kanazu M, Maruyama K, Ando M, Asami K, Ishii M, Uehira K, Minomo S, Matsuda Y, Kawaguchi T, Atagi S, Ogawa Y, Kusunoki Y, Takada M, and Kubo A. Early pharmacodynamic assessment using 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography on molecular targeted therapy and cytotoxic chemotherapy for clinical outcome prediction. **Clin Lung Cancer**, 2014; in press.
- 2) Satouchi M, Kotani Y, Shibata T, Ando M, Nakagawa K, Yamamoto N, Ichinose Y, Ohe Y, Nishio M, Hida T, Takeda K, Kimura T, Minato K, Akira Y, Atagi S, Fukuda H, Tamura T, and Saijo N. A phase III study comparing amrubicin and cisplatin with irinotecan and cisplatin for the treatment of extensive-disease small cell lung cancer (ED-SCLC): JCOG0509. **J Clin Oncol**, 2014; in press.
- 3) Fukata S, kawabata Y, Fujisiro K, Katagawa Y, Kuroiwa K, Akiyama H, Terabe Y, Ando M, Kawamura T, Hattori H. Haloperidol prophylaxis is not effective for preventing postoperative delirium in elderly patients: A randomized, open-label prospective trial. **Surg Today**, 2014; in press.
- 4) Kawaguchi T, Ando M, Asami K, Okano Y, Fukuda M, Nakagawa H, Iyata H, Kozuki T, Endo T, Tamura A, Kamimura M, Sakamoto K, Yoshimi M, Soejima Y, Tomizawa Y, Isa S, Takada M, Saka H, Kubo A. Randomized phase III trial of erlotinib versus docetaxel as second- or third-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer: Docetaxel and Erlotinib Lung cancer Trial (DELTA). **J Clin Oncol**, 2014; in press.
- 5) Tsujino K, Kurata T, Kawaguchi T, Kubo A, Takada M, Ando M. Role of consolidation chemotherapy after concurrent chemo-radiotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. **J Thorac Oncol**, 2014; in press.
- 6) Hasegawa Y, Ando M, Kubo A, Isa S, Yamamoto S, Tsujino K, Kurata T, Ou SH, Takada M, Kawaguchi T. Human papilloma virus in non-small cell lung cancer in never smokers : A systematic review of the literature. **Lung Cancer**, 2014; in press.
- 7) Yokoyama Y, Ebata T, Igami T, Sugawara G, Ando M, Nagino M. A predictive power of prothrombin time and serum total bilirubin for postoperative mortality after major hepatectomy with extrahepatic bile duct resection. **Surgery**, 2014; in press.
- 8) Kawaguchi T, Ando M, Ito N, Isa S, Tamiya A, Shimizu S, Saka H, Kubo A, Koh Y, Matsura A. Rationale and design of JME study: Japan molecular epidemiology for lung cancer study. **Clin Lung Cancer**, 2013; 14:596-600.
- 9) Tsujino K, Kurata T, Yamamoto S, Kawaguchi T, Kubo A, Isa S, Hasegawa Y, Ou SH, Takada M, Ando M. Is consolidation chemotherapy after concurrent chemo-radiotherapy beneficial for patients with locally advanced non-small cell lung cancer? A pooled analysis of the literature. **J Thorac Oncol**, 2013; 8:1181-9.
- 10) Yoshioka H, Okamoto I, Morita S, Ando M, Takeda K, Seto T, Yamamoto N, Hideo Saka, Asami K, Hirashima T, Kudoh S, Satouchi M, Ikeda N, Iwamoto Y, Sawa T, Nakanishi Y, and Nakagawa K. Efficacy and safety analysis by histology of S-1 in combination with carboplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer: Updated results of a West Japan Oncology Group LETS study. **Ann Oncol**, 2013; 24:1326-31.
- 11) Oki M, Saka H, Kitagawa C, Kogure Y, Murata N, Adachi T, Ando M. Rapid On-Site Cytologic evaluation during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for diagnosing lung cancer: A randomized study. **Respiration**, 2013; 85:486-92.
- 12) Kogure Y, Ando M, Saka H, Chiba Y, Yamamoto N, Asami K, Hirashima T, Seto T, Nagase S, Otsuka K, Yanagihara K, Takeda K, Okamoto I, Aoki T, Takayama K, Yamasaki M, Kudoh S, Katakami N, Miyazaki M, Nakagawa K. Histology and smoking

status predict survival of patients with advanced non-small-cell lung cancer: Results of West Japan Oncology Group (WJOG) Study 3906L. **J Thorac Oncol**, 2013; 8:753-8.

- 13) Nakamura K, Katai H, Mizusawa J, Yoshikawa T, Ando M, Terashima M, Itoh S, Takagi M, Takagane A, Ninomiya M, Fukushima N, Sasako M. A phase III study of laparoscopy assisted versus open distal gastrectomy with nodal dissection for clinical stage IA/IB gastric cancer (JCOG0912). *Jpn J Clin Oncol*, 2013; 43:324-7.

2. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

| 発表者氏名                                                                                                                                                                                | 論文タイトル名                                                                                                                                                                           | 発表誌名                     | 巻号  | ページ     | 出版年  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----|---------|------|
| Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Ebi H, Sano T, Nanjo S, Ishikawa D, Sato M, Hasegawa Y, Sekido Y, Yano S.                                                                          | EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented by in combination with HDAC inhibition.                                                                           | Cancer Res               | 73  | 2428-34 | 2013 |
| Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T & Mano H., Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T & Mano H. | Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling.                                                                                       | Cancer Sci               | 104 | 1002-8  | 2013 |
| Tominaga-Sato S, Imanishi D, Imaizumi Y, Iwanaga M, Itonaga H, Yoshida S, Hata T, Moriuchi R, Kiyoi H, Nimer S, Mano H, Naoe T, Tomonaga M, Miyazaki Y.                              | Mutations in the nucleolar phosphoprotein, nucleophosmin, promote the expression of the oncogenic transcription factor MEF/ELF4 in leukemia cells and potentiates transformation. | J Biol Chem              | 288 | 9457-67 | 2013 |
| Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL, Mano H.               | Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers.                                                                                                         | Proc Natl Acad Sci U S A | 110 | 3029-34 | 2013 |
| Suzuki HI, Matsuyama H, Noguchi M, Yao T, Komatsu N, Mano H, Sugimoto K, Miyazono K.                                                                                                 | Computational dissection of distinct microRNA activity signatures associated with peripheral T cell lymphoma subtypes.                                                            | Leukemia                 | 27  | 2107-11 | 2013 |
| Yasuda T, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Ando M, Yamaguchi H, Soda M, Kawazu M, Sai E, Yamashita Y, Murata M, Kiyoi H, Naoe T, Mano H.                                                | Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation.                                                         | Leukemia                 | 28  | 426-28  | 2014 |

|                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                    |                           |        |        |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------|--------|------|
| Daito H, Suzuki M, Shiikara J, Kilgore PE, Ohtomo H, Morimoto K, et al.                                                                  | Impact of the Tohoku earthquake and tsunami on pneumonia hospitalisations and mortality among adults in northern Miyagi, Japan: a multicentre observational study. | Thorax                    | 68(6)  | 544-50 | 2013 |
| Hagiwara K, Kobayashi K.                                                                                                                 | Importance of the cytological samples for the epidermal growth factor receptor gene mutation test for non-small cell lung cancer.                                  | Cancer Sci                | 104(3) | 291-7  | 2013 |
| Kobayashi K, Hagiwara K.                                                                                                                 | Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC).                                           | Target Oncol              | 8(1)   | 27-33  | 2013 |
| Watanabe S, Minegishi Y, Yoshizawa H, Maemondo M, Inoue A, Sugawara S, et al.                                                            | Effectiveness of gefitinib against non-small-cell lung cancer with the uncommon EGFR mutations G719X and L861Q.                                                    | J Thorac Oncol            | 9(2)   | 189-94 | 2014 |
| Shindo Y, Ito R, Hasegawa Y et al.                                                                                                       | Risk factors for drug-resistant pathogens in community-acquired and healthcare-associated pneumonia.                                                               | Am J Respir Crit Care Med | 188(8) | 985-95 | 2013 |
| Yoshida K, Sato M, Hase T, Elshazley M, Yamashita R, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Nakamura S, Kondo M, Girard L, Minna JD, Hasegawa Y. | TIMELESS is overexpressed in lung cancer and its expression correlates with poor patient survival.                                                                 | Cancer Sci                | 104(2) | 171-7  | 2013 |
| Aoyama D, Hashimoto N, Sakamoto K, Kohnoh T, Kusunose M, Kimura M, Ogata R, Imaizumi K, Kawabe T, Hasegawa Y.                            | Involvement of TGFβ-induced phosphorylation of the PTEN C-terminus on TGFβ-induced acquisition of malignant phenotypes in lung cancer cells.                       | PLoS One                  | 8(11)  | e81133 | 2013 |

|                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                  |                            |        |         |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------|---------|------|
| Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa K, Mitsudomi T, Osada H, Hata Y, Sekido Y.                                                                                  | RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer.                                                                                              | Lung Cancer                | 83(1)  | 23-9    | 2013 |
| Okamoto W, Yoshino T, Takahashi T, Okamoto I, Ueda S, Tsuya A, Boku N, Nishio K, Fukuoka M, Yamamoto N, Nakagawa K.                                                                                                               | A phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of nimotuzumab in Japanese patients with advanced solid tumors.                                                             | Cancer Chemother Pharmacol | 72(5)  | 1063-71 | 2013 |
| Ono A, Takahashi T, Oishi T, Sugino T, Akamatsu H, Shukuya T, Taira T, Kenmotsu H, Naito T, Murakami H, Nakajima T, Endo M, Yamamoto N.                                                                                           | Acute lung injury with alveolar hemorrhage as adverse drug reaction related to crizotinib.                                                                                       | J Clin Oncol               | 31(26) | e417-9  | 2013 |
| Hosokawa M, Kenmotsu H, Koh Y, Yoshino T, Yoshikawa T, Naito T, Takahashi T, Murakami H, Nakamura Y, Tsuya A, Shukuya T, Ono A, Akamatsu H, Watanabe R, Ono S, Mori K, Kanbara H, Yamaguchi K, Tanaka T, Matsunaga T, Yamamoto N. | Size-based isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients using a microcavity array system.                                                                        | PLoS One                   | 8(6)   | e67466  | 2013 |
| Tokito T, Shukuya T, Akamatsu H, Taira T, Ono A, Kenmotsu H, Naito T, Murakami H, Takahashi T, Endo M, Yamamoto N.                                                                                                                | Efficacy of bevacizumab-containing chemotherapy for non-squamous non-small cell lung cancer with bone metastases.                                                                | Cancer Chemother Pharmacol | 71(6)  | 1493-8  | 2013 |
| Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, et al.                                                                                                                                                                | Efficacy and safety of the selective ALK inhibitor CH5424802/RO5424802 in patients with ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer: a phase I/II study (AF-001JP study). | Lancet Oncol               | 14     | 590-8   | 2013 |

|                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                       |                     |     |         |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----|---------|------|
| Sugawara S, Maemondo M, Tachihara M, Inoue A, et al.                                                                                                                                                                 | Randomized phase II trial of uracil/tegafur and cisplatin versus vinorelbine and cisplatin with concurrent thoracic radiotherapy for locally advanced unresectable stage III non-small-cell Lung cancer : NJLCG 0601. | Lung Cancer         | 81  | 91-6    | 2013 |
| Lee CK, Brown C, Gralla RJ, Hirsh V, Thongprasert S, Tsai CM, Tan EH, Ho JC, Chu da T, Zaatar A, Osorio Sanchez JA, Vu VV, Au JS, Inoue A, et al.                                                                    | Impact of epidermal growth factor receptor inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis.                                                                         | J Natl Cancer I     | 105 | 595-605 | 2013 |
| Sato S, Hanibuchi M, Kuramoto T, Yamamori N, Goto H, Ogawa H, Mitsuhashi A, Van TT, Kakiuchi S, Akiyama S, Nishioka Y, Sone S.                                                                                       | Macrophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment.                                                                                     | Clin Exp Metastasis | 30  | 333-44  | 2013 |
| Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Aono Y, Uehara H, Yano S, Ledford JG, Sone S, Nishioka Y.                                                          | Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages.                                                                                               | Am J Pathol         | 182 | 1843-53 | 2013 |
| Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. | A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody.                                                                                                                                   | J Immunol           | 190 | 6239-49 | 2013 |
| Huang J, Tabata S, Kakiuchi S, Van TT, Goto H, Hanibuchi M, Nishioka Y.                                                                                                                                              | Identification of pregnancy-associated plasma protein A as a migration-promoting gene in malignant pleural mesothelioma cells: a potential therapeutic target.                                                        | Oncotarget          | 4   | 1172-84 | 2013 |

|                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                          |              |         |          |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------|----------|------|
| Katakami N, Atagi S, Goto K, Hida T, Horai T, Inoue A, Ichinose Y, Kobayashi K, Takeda K, Kiura K, Nishio K, Seki Y, Ebisawa R, Shahidi M, Yamamoto N.                                 | LUX-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both.                                                  | J Clin Oncol | 31      | 3335-41  | 2013 |
| Urata Y, Okamoto I, Takeda M., Hattori Y, Okuno K, Shimada T, Kurata T, Kaneda H, Miyazaki M, Terashima M, Tanaka K, Morita S, Nakagawa K, Negoro S, Satouchi M.                       | Phase 2 study of S-1 and carboplatin plus bevacizumab followed by maintenance S-1 and bevacizumab for chemotherapy-naïve patients with advanced nonsquamous non-small cell lung cancer.                                  | Cancer       | 119(12) | 2275-81  | 2013 |
| Satouchi M., Okamoto I, Sakai H, Yamamoto N, Ichinose Y, Ohmatsu H, Nogami N, Takeda K, Mitsudomi T, Kasahara K, Negoro S.                                                             | Efficacy and safety of weekly nab-paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer.                                                                                                      | Lung Cancer  | 81(1)   | 97-101   | 2013 |
| Yoshioka H, Okamoto I, Morita S, Ando M, Takeda K, Seto T, Yamamoto N, Saka H, Atagi S, Hirashima T, Kudoh S, Satouchi M, Ikeda N, Iwamoto Y, Sawa T, Nakanishi Y, Nakagawa K.         | Efficacy and safety analysis according to histology for S-1 in combination with carboplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: updated results of the West Japan Oncology. | Ann Oncol    | 24(5)   | 1326-31  | 2013 |
| Satouchi M, Kotani Y, Shibata T, Ando M, Nakagawa K, Yamamoto M, Ichinose Y, Ohe Y, Nishio M, Hida T, Takeda K, Kimura T, Minato K, Yokoyama A, Atagi S, Fukuda, H, Tamura T, Saijo N. | Phase III study comparing amrubicin plus cisplatin with irinotecan plus cisplatin in the treatment of extensive-disease small-cell lung cancer: JCOG 0509.                                                               | J Clin Oncol |         | In press | 2014 |

|                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                              |                |    |         |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----|---------|------|
| Tsujino K, Kurata T, Yamamoto S, Kawaguchi T, Kubo A, Isa S, Hasegawa Y, Ou SH, Takada M, Ando M.                                                                                                                | Is consolidation chemotherapy after concurrent chemo-radiotherapy beneficial for patients with locally advanced non-small cell lung cancer? A pooled analysis of the literature.                                             | J Thorac Oncol | 8  | 1181-9  | 2013 |
| Yoshioka H, Okamoto I, Morita S, Ando M, Takeda K, Seto T, Yamamoto N, HideoSaka, Asami K, Hirashima T, Kudoh S, Satouchi M, Ikeda N, Iwamoto Y, Sawa T, Nakanishi Y, Nakagawa K.                                | Efficacy and safety analysis by histology of S-1 in combination with carboplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer: Updated results of a West Japan Oncology Group LETS study. | Ann Oncol      | 24 | 1326-31 | 2013 |
| Kogure Y, Ando M, Saka H, Chiba Y, Yamamoto N, Asami K, Hirashima T, Seto T, Nagase S, Otsuka K, Yanagihara K, Takeda K, Okamoto I, Aoki T, Takayama K, Yamasaki M, Kudoh S, Katakami N, Miyazaki M, Nakagawa K. | Histology and smoking status predict survival of patients with advanced non-small-cell lung cancer: Results of West Japan Oncology Group (WJOG) Study 3906L.                                                                 | J Thorac Oncol | 8  | 753-8   | 2013 |



## Priority Report

EGFR-TKI Resistance Due to *BIM* Polymorphism Can Be Circumvented in Combination with HDAC InhibitionTakayuki Nakagawa<sup>1,4</sup>, Shinji Takeuchi<sup>1</sup>, Tadaaki Yamada<sup>1</sup>, Hiromichi Ebi<sup>1</sup>, Takako Sano<sup>1</sup>, Shigeki Nanjo<sup>1</sup>, Daisuke Ishikawa<sup>1</sup>, Mitsuo Sato<sup>2</sup>, Yoshinori Hasegawa<sup>2</sup>, Yoshitaka Sekido<sup>3</sup>, and Seiji Yano<sup>1</sup>

## Abstract

**BIM** (*BCL2L11*) is a BH3-only proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. BIM upregulation is required for apoptosis induction by EGF receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI) in *EGFR*-mutant forms of non-small cell lung cancer (NSCLC). Notably, a *BIM* deletion polymorphism occurs naturally in 12.9% of East Asian individuals, impairing the generation of the proapoptotic isoform required for the EGFR-TKIs gefitinib and erlotinib and therefore conferring an inherent drug-resistant phenotype. Indeed, patients with NSCLC, who harbored this host *BIM* polymorphism, exhibited significantly inferior responses to EGFR-TKI treatment than individuals lacking this polymorphism. In an attempt to correct this response defect in the resistant group, we investigated whether the histone deacetylase (HDAC) inhibitor vorinostat could circumvent EGFR-TKI resistance in *EGFR*-mutant NSCLC cell lines that also harbored the *BIM* polymorphism. Consistent with our clinical observations, we found that such cells were much less sensitive to gefitinib-induced apoptosis than *EGFR*-mutant cells, which did not harbor the polymorphism. Notably, vorinostat increased expression in a dose-dependent manner of the proapoptotic BH3 domain-containing isoform of BIM, which was sufficient to restore gefitinib death sensitivity in the *EGFR* mutant, EGFR-TKI-resistant cells. In xenograft models, while gefitinib induced marked regression via apoptosis of tumors without the *BIM* polymorphism, its combination with vorinostat was needed to induce marked regression of tumors with the *BIM* polymorphism in the same manner. Together, our results show how HDAC inhibition can epigenetically restore BIM function and death sensitivity of EGFR-TKI in cases of *EGFR*-mutant NSCLC where resistance to EGFR-TKI is associated with a common *BIM* polymorphism. *Cancer Res*; 73(8); 2428–34. ©2013 AACR.

## Introduction

The EGF receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKI), gefitinib and erlotinib, have shown marked therapeutic effects against non-small cell lung cancer (NSCLC) with *EGFR*-activating mutations, such as exon 19 deletions and L858R point mutations (1). About 20% to 30% of patients, however, show intrinsic resistance to EGFR-TKIs despite having tumors harboring these *EGFR* mutations. In addition, patients who respond initially later develop acquired resistance to EGFR-TKIs after varying periods of time (2). Among the molecular mechanisms associated with acquired resistance to EGFR-

TKIs are (i) gatekeeper mutations in *EGFR* (i.e., a T790M second mutation), (ii) activation of bypass signaling caused by *Met* amplification or hepatocyte growth factor overexpression, (iii) transformation to small-cell lung cancer, and (iv) epithelial-to-mesenchymal transition (3, 4). Several therapeutic strategies, including new generation EGFR-TKIs and the combination of an EGFR-TKI and a Met-TKI, have been evaluated clinically in patients with *EGFR*-mutant NSCLC who acquired resistance to EGFR-TKIs (2). The mechanisms of intrinsic resistance, however, remain poorly understood.

Recently, a *BIM* deletion polymorphism was reported to be a novel mechanism of intrinsic resistance to EGFR-TKIs (5). BIM, also called *BCL2L11*, is a proapoptotic protein and a member of the Bcl-2 family. Gene products (such as BIM<sub>EL</sub>, BIM<sub>L</sub>, and BIM<sub>S</sub>) with a BH3 domain, which is essential for apoptosis induction, antagonize antiapoptotic proteins (such as Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, and Mcl-1) and activate proapoptotic proteins (such as BAX and BAK), thereby inducing apoptosis (6, 7). Activation of BAX and BAK induce cytochrome *c* release into the cytoplasm and result in activation of the caspase cascade (8). BIM is pivotal in apoptosis induced by EGFR-TKIs in *EGFR*-mutant NSCLC cells (9). The expression and degradation of BIM is regulated mainly by the MEK-ERK pathway (10). The *BIM* deletion polymorphism is relatively common in East Asian populations (12.9%), with 0.5% of individuals being

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Division of Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, Ishikawa; <sup>2</sup>Department of Respiratory Medicine, Nagoya University; <sup>3</sup>Division of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Aichi; and <sup>4</sup>Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., Ibaraki, Japan

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

**Corresponding Author:** Seiji Yano, Division of Medical Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, 13-1 Takara-machi, Kanazawa, Ishikawa 9200934, Japan. Phone: 81-76-265-2780; Fax: 81-76-234-4524; E-mail: syano@staff.kanazawa-u.ac.jp

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3479

©2013 American Association for Cancer Research.

homozygous for this deletion. During the transcription of *BIM*, either exon 3 or exon 4, the latter of which encodes the BH3 domain, is spliced out due to the presence of a stop codon and a polyadenylation signal within exon 3 (11). The *BIM* deletion polymorphism involves the deletion of a 2903 bp fragment in intron 2 and results in the preferential splicing of exon 3 over exon 4, generating a *BIM* isoform that lacks the BH3 domain (5). A retrospective analysis in patients with *EGFR*-mutant NSCLC showed that progression-free survival (PFS) following EGFR-TKI treatment was significantly shorter in patients with the *BIM* polymorphism (6.6 months) than with wild-type *BIM* (11.9 months; ref.5). Another study in patients with *EGFR*-mutant NSCLC treated with EGFR-TKIs also reported that PFS was significantly shorter in patients with *BIM*-low (4.3 months) than *BIM*-high (11.3 months) expressing tumors (12), suggesting that reduced expression of *BIM* with a BH3 domain is associated with an unfavorable response to EGFR-TKIs. To date, however, no therapeutic strategy has yet been developed for patients with *EGFR*-mutant NSCLC with low *BIM* expression.

Histone deacetylase (HDAC) is an enzyme that regulates chromatin remodeling and is crucial in the epigenetic regulation of various genes (13). Many compounds targeting HDAC have been developed, including vorinostat, an HDAC inhibitor approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with cutaneous T-cell lymphoma (14). In mantle cell lymphoma (MCL) cell lines and in cells from patients with MCL, vorinostat induced histone hyperacetylation on promoter regions and consequent transcriptional activation of proapoptotic BH3-only genes, including *BIM* (15). Using *in vitro* and *in vivo* models, we assessed whether the combination of vorinostat and gefitinib restored the expression of *BIM* protein with a BH3 domain in *EGFR*-mutant NSCLC cells with the *BIM* polymorphism and overcame EGFR-TKI resistance associated with this polymorphism.

## Materials and Methods

### Cell lines and reagents

The NSCLC cell lines, PC-9, HCC827, and HCC2279, all of which have *EGFR* mutations, were obtained from Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., the American Type Culture Collection (ATCC), and Dr. John Minna (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX), respectively. PC-3 cells, established from a Japanese female patient with NSCLC and with an exon 19 deletion in *EGFR*, and differing from the prostate cancer cell line PC-3 (ATCC CRL1435), were purchased from Human Science Research Resource Bank (JCRB0077: [http://cellbank.nbio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?DB\\_NUM=1&ID=252](http://cellbank.nbio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?DB_NUM=1&ID=252) = 1&ID = 252). PC-3 and the other 3 cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and RPMI-1640 medium, respectively, each supplemented with 10% FBS and antibiotics. All cells were passaged for less than 3 months before renewal from frozen, early-passage stocks. Cells were regularly screened for mycoplasma using a MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza). The cell lines were authenticated at the laboratory of the National Institute of Biomedical Innovation (Osaka, Japan)

by short tandem repeat analysis. Vorinostat and gefitinib were obtained from Selleck Chemicals and AstraZeneca, respectively.

### Genotype and expression analysis of *BIM*

Genomic DNA was extracted from cells using DNeasy Blood and Tissue Kits (Qiagen), according to the manufacturer's protocol. Total RNA was extracted from cells using RNeasy PLUS Mini kits (Qiagen). PCR methods were used to detect the *BIM* deletion polymorphism in the samples and the level of expression of *BIM* isoforms (5).

### Cell apoptosis

Cells ( $3 \times 10^3$ ) were seeded into each well of 96-well, white-walled plates, incubated overnight, and treated with the indicated compounds or vehicle [dimethyl sulfoxide (DMSO)] for 48 hours. Cellular apoptosis was analyzed with Caspase-Glo 3/7 assay kits (Promega), which measure caspase-3/7 activity, and PE-Annexin V Apoptosis Detection Kits (BD Biosciences, in accordance with the manufacturers' directions.

Apoptotic cells in tumor xenografts were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) staining, using the DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Promega), according to the manufacturer's protocol.

### RNA interference

Duplexed Stealth RNAi (Invitrogen) against *BIM* and Stealth RNAi-negative control low GC Duplex #3 (Invitrogen) were used for RNA interference (RNAi) assays as described (4). The siRNA target sequences were 5'-CAUGAGUUGUGACAAAUCAAACACAA-3' and 5'-UUGUGUUGAUUUGUCACAACUCAUG-3' for *BIM* #1, and 5'-UGAGUGUGACCGAGAAGGUAGACAA-3' and 5'-UUGUCUACCUUCUCGGUCACACUCA-3' for *BIM* #2.

### Western blot analysis

Western blotting was conducted with antibodies against phospho-EGFR (Tyr1068), Akt, phospho-Akt (Ser473), cleaved PARP, cleaved caspase-3, histone H3, acetylated histone H3 (Lys27), *BIM*, and  $\beta$ -actin (Cell Signaling Technology); and against phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), Erk1/2, and EGFR (R&D Systems). Blots were subsequently incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies specific to mouse or rabbit immunoglobulin G, with signals detected by enhanced chemiluminescence (Pierce Biotechnology).

### Subcutaneous xenograft models

Male BALB/cAJcl-nu/nu mice, ages 5 to 6 weeks, were obtained from CLEA Japan Inc and injected subcutaneously into their flanks with cultured tumor cells ( $5 \times 10^6$  cells/0.1 mL/mouse). When tumor volumes reached 100 to 200 mm<sup>3</sup>, the mice were randomized and treated once daily with gefitinib and/or vorinostat. Each tumor was measured in 2 dimensions, and the volume was calculated using the formula: tumor volume (mm<sup>3</sup>) =  $1/2 \times \text{length (mm)} \times \text{width (mm)}^2$ . All animal experiments complied with the Guidelines for the Institute for Experimental Animals, Kanazawa University Advanced Science Research Center (approval No. AP-081088).

### Statistical analysis

Between group differences were analyzed by one-way ANOVA. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism Ver. 4.01 (GraphPad Software, Inc.), with  $P < 0.05$  considered statistically significant.

### Results

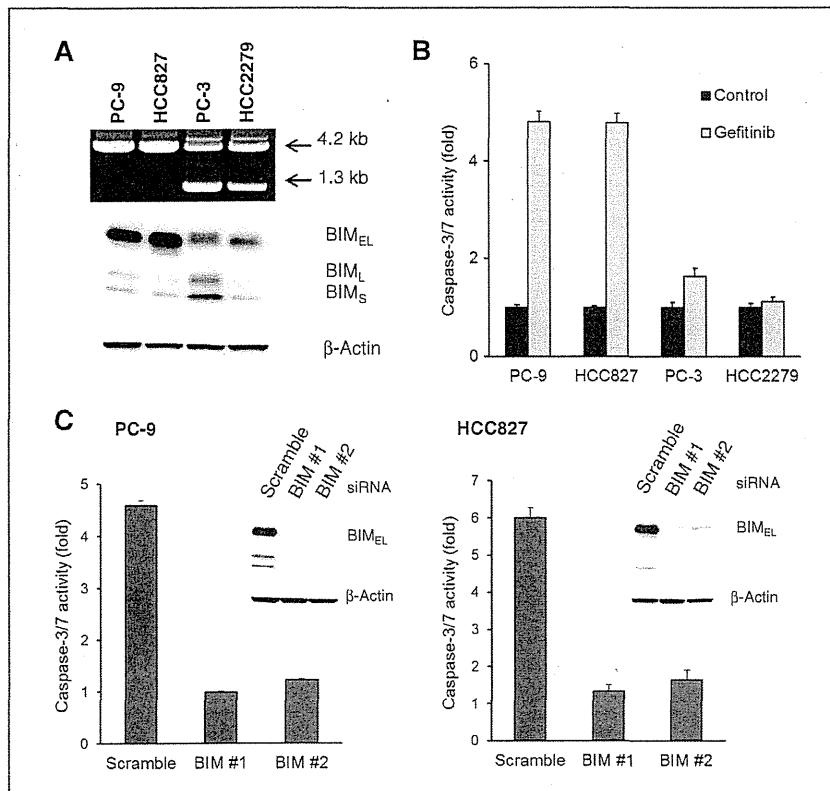
#### **EGFR-mutant NSCLC cell lines harboring the *BIM* deletion polymorphism have low susceptibility to gefitinib-induced apoptosis**

We first examined the *BIM* deletion polymorphism in *EGFR*-mutant NSCLC cell lines by PCR. PC-9 and HCC827 had wild-type alleles, with a PCR product 4.2 kb in size. Consistent with a previous report (5), HCC2279 cells were heterozygous for the *BIM* deletion polymorphism, with PCR products 4.2 kb (wild-type) and 1.3 kb (2.9 kb deletion polymorphism) in size. Among the 7 additional cell lines with *EGFR* mutations (Supplementary Table S1), PC-3 was heterozygous for the *BIM* deletion polymorphism (Fig. 1A). Western blot analyses reveal that the expression of the proapoptotic BIM protein was markedly lower in PC-3 and HCC2279 than in PC-9 and HCC827 cells. Analysis of *BIM* isoform transcripts showed that cells with the *BIM* polymorphism expressed more exon 3- than exon 4-containing transcripts (Supplementary Fig. S1A and S1B). Treatment with gefitinib enhanced BIM expression, caspase-

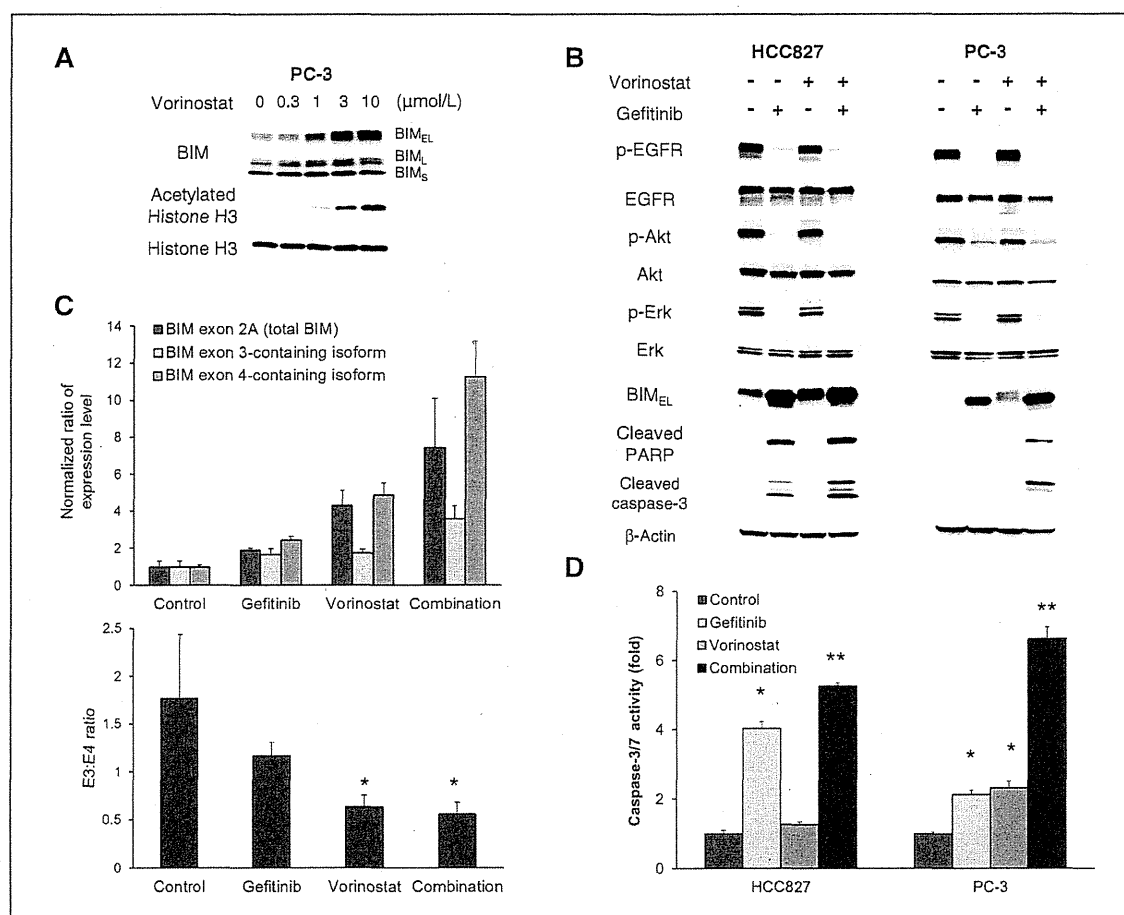
3/7 activities, and apoptosis in PC-9 and HCC827 cells much more than in PC-3 and HCC2279 cells (Fig. 1B; Supplementary Fig. S1C, S1D, and S2). Moreover, gefitinib did not increase caspase-3/7 activity in PC-9 and HCC827 cells treated with *BIM* siRNA (Fig. 1C), indicating the crucial role of BIM in apoptosis induction in *EGFR*-mutant NSCLC cells treated with *EGFR*-TKI. These observations clearly showed that *EGFR*-mutant NSCLC cells with the *BIM* deletion polymorphism are much less sensitive to gefitinib, as shown by induction of apoptosis, than cells with wild-type *BIM*.

#### **Vorinostat upregulates BIM and efficiently induces apoptosis when combined with gefitinib**

Because HDAC inhibition modulates the expression of various genes, including proapoptotic molecules (13), we hypothesized that the HDAC inhibitor, vorinostat, may sensitize *EGFR*-mutant NSCLC cells with the *BIM* polymorphism to gefitinib. In *EGFR*-mutated NSCLC cell lines, including PC-3 and HCC2279 cells, vorinostat dose dependently increased the expression of acetylated histone H3 and BIM with the BH3 domain (Fig. 2A, Supplementary Fig. S3A). We further explored whether the addition of vorinostat to gefitinib induced apoptosis in *EGFR*-mutant NSCLC cells with the *BIM* polymorphism (Fig. 2B and D). In HCC827 and PC-9 cells, which contain only wild-type *BIM*, gefitinib inhibited downstream signaling,



**Figure 1.** *EGFR*-mutated NSCLC cell lines harboring the *BIM* deletion polymorphism show low susceptibility to gefitinib-induced apoptosis. A, top, PCR products from the 4 *EGFR*-mutated NSCLC cell lines generated by primers flanking the deletion. PCR products 4.2 kb and 1.3 kb in size correspond to the alleles without and with the deletion, respectively, with the presence of both products indicating heterozygosity for the deletion polymorphism. Bottom, the levels of expression of the proteins BIM<sub>EL</sub>, BIM<sub>L</sub>, and BIM<sub>S</sub> in each cell line. B, cell lines were treated with gefitinib (1  $\mu$ M/L) or DMSO control for 48 hours, and the activity of caspase-3/7 was measured using Caspase-Glo3/7 assay kits. Each bar represents the mean  $\pm$  SD. C, PC-9 (left) and HCC827 (right) cells were transfected with *BIM* or control siRNA for 24 hours before gefitinib (1  $\mu$ M/L) treatment for 48 hours, and the activity of caspase-3/7 was measured as in B. Each bar indicates the mean  $\pm$  SD. Lysates were collected and proteins were analyzed by Western blotting.



**Figure 2.** Upregulation of BIM by vorinostat enhances induction of apoptosis in *EGFR*-mutated NSCLC cell line with the *BIM* polymorphism. **A**, PC-3 cells were incubated with serial dilutions of vorinostat for 24 hours. The cell lysates were harvested and the indicated proteins were analyzed by Western blotting. **B**, HCC827 cells (left) and PC-3 cells (right) were incubated with gefitinib (1  $\mu\text{mol/L}$ ) and/or vorinostat (3  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 hours. The cell lysates were harvested and the indicated proteins were determined by Western blotting. **C**, PC-3 cells were treated with gefitinib (1  $\mu\text{mol/L}$ ) and/or vorinostat (3  $\mu\text{mol/L}$ ) for 12 hours. The amounts of the various transcripts containing exon 2A, 3, or 4 are expressed as normalized ratios relative to actin (top). Ratio of exon 3-containing transcripts to exon 4-containing transcripts in PC-3 cells after treatment with each compound. \*,  $P < 0.05$  versus control. Bar indicates the mean  $\pm$  SD. **D**, apoptosis was analyzed by measurement of caspase-3/7 activity. \*,  $P < 0.05$  gefitinib or vorinostat versus control; \*\*,  $P < 0.05$  combination versus control and single agents. Bars represent the mean  $\pm$  SD.

including the phosphorylation of EGFR, Erk, and Akt, resulting in apoptosis, as shown by the expression of cleaved PARP and cleaved caspase-3. The further addition of vorinostat augmented BIM expression and caspase-3/7 activity. In PC-3 and HCC2279 cells, which contain the *BIM* polymorphism, however, treatment with gefitinib alone induced minimal apoptosis, although the phosphorylation of EGFR, Erk, and Akt was inhibited, whereas the combination of vorinostat and gefitinib markedly increased the expression of BIM, as well as of cleaved PARP and cleaved caspase-3 (Fig. 2B and Supplementary Fig. S3B). This combination also augmented caspase-3/7 activity compared with that of gefitinib or vorinostat alone (Fig. 2D and Supplementary Fig. S3C), but this activation of caspase-3/7 was inhibited by knockdown of *BIM* (Supplementary Fig. S4A and

S4B). Conversely, overexpression of  $BIM_{EL}$  itself stimulated caspase-3/7 activities in cells with the *BIM* polymorphism, with these activities further enhanced by gefitinib treatment (Supplementary Fig. S4C and S4D). These results indicate that BIM mediates the activation of caspase-3/7 induced by gefitinib and vorinostat. Analysis of *BIM* transcripts revealed that vorinostat alone induced *BIM* mRNA, which was enhanced by the inclusion of gefitinib. Moreover, vorinostat treatment preferentially induced transcripts containing exon 4 over those containing exon 3 (Fig. 2C). These results indicate that the combination of vorinostat and gefitinib inhibits HDAC and increases the expression of BIM protein with the BH3 domain, thereby sensitizing *EGFR*-mutant NSCLC cells with the *BIM* polymorphism to apoptosis *in vitro*.