

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

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に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 西 尾 和 人

平成 27 (2015) 年 3 月

様式第18

委託業務成果報告書への標記について

委託業務に係る成果報告書の表紙裏に、次の標記を行うものとする。

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、近畿大学 理事長 清水由洋が実施した平成26年度「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」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

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に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 西尾 和人

平成27 (2015) 年 3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
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に関する研究	1
西尾 和人	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. Liquid biopsyによるEGFR-TKI獲得耐性遺伝子変異モニタリング、 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	4
西尾 和人	
2. Liquid biopsyによるEGFR-TKI獲得耐性遺伝子変異モニタリングに 関わる検体集積	6
岡本 勇	
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 解明に関わる研究開発	7
西尾 誠人	
4. Liquid biopsyによるEGFR-TKI獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる 検体集積	9
池田 徳彦	
III. 学会等発表実績	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	15

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（総括）

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

業務責任者 西尾 和人 近畿大学医学部ゲノム生物学教室 教授

研究要旨

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究、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、Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発の計画書の倫理委員会の承認を得、各施設において検体の収集を開始し、一部の検体については測定に着手した。

岡本 勇（九州大学病院 ARO 次世代医療センター 特任准教授）

西尾 誠人（公益財団法人がん研究会有明病院 呼吸器内科部長）

池田 徳彦（東京医科大学呼吸器外科 教授）

A. 研究目的

臨床で用いられる分子標的薬の感受性・抵抗性に関わる分子特性が明らかになるにつれ、適切な治療薬の選択を可能にするバイオマーカー診断技術の確立が喫緊の重要課題となっている。本研究の目的は、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である。

B. 研究方法

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、探索的臨床研究の計画立案し、倫理委員会の承認を得て実施する。血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究に関わる研究開発および Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管を行う。測定の為のアッセイ系の確立、cut-off 値の決定を行う。

ALK 阻害剤耐性機序の研究には、耐性化症例の腫瘍片より初代継代培養細胞株を樹立する。同細胞を用いた次世代シーケンサー等によりゲノム解析を開始する。耐性症例での二次的変異解析のための研究計画の倫理委員会での承認を得て、検体の集積を開始する。

（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた研究計画の実施に際しては、各施設の倫理委員会の承認を得て開始した。

C. 研究結果

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、探索的臨床研究の計画立案し、倫理委員会の承認を得た。また、Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる多施設共同での探索的臨床研究を立案し、研究計画書を作成した。測定の為のアッセイ系の確立、cut-off 値の決定を行なった。腫瘍組織と血清のペア検体を用いた EGFR 二次的変異 T790M の測定のための研究計画の倫理委員会での承認を得て、東京医大で収集されたレトロスペクティブなペア検体の測定を開始した。

血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究に関わる研究開発および Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管を行った。

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：耐性化症例の初代継代培養細胞株でのゲノム解析に着手した。耐性症例での二次的変異解析のための研究計画を倫理委員会へ申請し承認を得た。耐性化症例の初代継代培養細胞株のゲノム解析を次世代シーケンサー等によるエクソーム解析等を開始した。耐性症例での二次的変異解析のための検体の集積を開始した。

D. 考察

Liquid biopsy のアッセイ系の確立の過程で、核酸抽出工程、測定の供する DNA コピー数等を含めた測定条

件が明らかとなり、今後の収集過程では、上記条件での収集を実施することが望ましいと考えられた。

Liquid biopsy 対象症例の選択には、組織型によりどの程度絞り込むかについて検討する必要があった。同一患者の組織および血漿ペアのレトロスペクティブサンプルが多数収集され、腫瘍・血中の遺伝子変異ステータスの一致率および2次的遺伝子変異以外の耐性機序の検出等、遺伝子解析結果が期待される。

多施設共同での探索的臨床研究の実施のため、検体採取、保管方法、測定機関への輸送手段などを議論し、スムーズな研究の実施が可能な研究計画が策定された。

E. 結論

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発、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、Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発のいずれにおいても倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管が開始され、順調に進んでいると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

1. Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, Yoneshige A, Ito A, Togashi Y, Develasco 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, in press.
2. 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.
3. 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.
4. 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. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. Cancer discovery, 4(6): 662-73, 2014.

2. 学会発表

1. 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/RO5424802) for ALK-rearranged NSCLC with or without prior crizotinib treatment in bioequivalence study. 2014 ASCO Annual Meeting. J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr 8103). 2014; General Poster Session, Lung Cancer - Non-Small Cell Metastatic.
2. 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). 2014 ASCO Annual Meeting J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr 8031). 2014; Poster Highlights Session, Lung Cancer - Non-small Cell Metastatic.
3. Kudo Y, Usuda J, Furumoto H, Maehara S, Ohtani K, Inoue T, Ishizumi T, Kato Y, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Expression of klotho enhances the apoptotic response of cancer cells to anticancer agents. AACR Annual Meeting 2014, San Diego, 2014.
4. Ohira T, Oikawa T, Otani K, Yoshida K, Kato Y, Maeda J, Hagiwara M, Nagase S, Kakihana M, Kajiwara N, Ikeda N. Histological diagnosis of lung cancer using small biopsy samples. 18th WCBIP/ WCBE World Congress, Kyoto, 2014.
5. Shimada Y, Yoshida K, Kato Y, Hagiwara M, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Surgical results of lung cancer with synchronous multiple ground-glass opacities and the management of the residual and new lesions. 28th EACTS Annual Meeting, Milan, Italy, 2014.

6. Kudo Y, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K, Osawa J, Maehara S, Maeda J, Matsybayashi 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. 2014 IASLC Asia Pacific Lung Cancer Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 2014.
7. 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、第 10 回日本臨床プロテオーム研究会、東京、2014.
8. 垣花昌俊, 吉田浩一, 三宅真司, 前田純一, 梶原直央, 筒井英光, 大平達夫, 長尾俊孝, 池田徳彦、呼吸器細胞診検体採取への LBC (Liquid-Base Cytology) の応用の検討、第 55 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 、横浜、2014.
9. 吉田浩一, 垣花昌俊, 前田純一, 梶原直央, 筒井英光, 大平達夫, 長尾俊孝, 池田徳彦、ALK 陽性肺癌の細胞診像、第 55 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 、横浜、2014.
10. 工藤勇人, 嶋田善久, 垣花昌俊, 大谷圭志, 加藤靖文, 佐治久, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦、肺腺癌切除後再発と EGFR 遺伝子変異の関係、第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会、福岡、2014.
11. 牧野洋二郎, 尹晶煥, 真村端子, 黒田雅彦, 池田徳彦、Distinct Phosphorylation Status of TGF- β Receptor-regulated Smads in NSCLCs with EGFR/Ras Mutation、第 55 回日本肺癌学会学術集会、京都 2014.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリング、
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

担当責任者 西尾和人 近畿大学医学部ゲノム生物学講座 教授

研究要旨

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究、
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、
Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開
発の計画書の倫理委員会の承認を得、測定のためのアッセイ系の確立、カットオフ
値の決定等を実施した。

A. 研究目的

本研究では、臨床施設（がん研有明病院、九州大学、東京医科大学）と連携し、liquid biopsy による遺伝子診断、すなわち liquid sequencing を実施する。第一の目標は、血漿・血清検体からの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の二次的耐性変異である *T790M* 検出による耐性モニタリングであり、検出系として digital PCR および次世代シーケンサーを用いる。第二の目標は、liquid biopsy による *ALK*, *RET*, *ROS1* 等の融合遺伝子の検出とチロシンキナーゼ阻害剤に対する新規耐性機序の解明である。代表者は、主に、同プロジェクトの総合推進を実施する。

B. 研究方法

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、探索的臨床研究の計画立案し、倫理委員会の承認を得る。血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究に関わる研究開発および Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管を行う。測定のためのアッセイ系の確立、cut-off 値の決定を行う。

（倫理面への配慮）

主たる研究機関として、近畿大学医学部において倫理委員会の承認を得た後、各施設の倫理委員会の承認を得る。

C. 研究結果

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、探索的臨床研究の計画立案し、倫理委員会の承認を得た。血中融合遺伝子の検出法の確立と liquid biopsy 検体を用いた feasibility 研究に関わる研究開発および Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺

伝子変異モニタリングに関わる研究開発については、倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管を行った。測定のためのアッセイ系の確立、cut-off 値の決定を行なった。腫瘍組織と血清のペア検体を用いた EGFR 二次的変異 *T790M* の測定のための研究計画の倫理委員会での承認を得て、東京医大で収集されたレトロスペクティブなペア検体の測定を開始した。

D. 考察

Liquid biopsy のアッセイ系の確立の過程で、採取する血漿サンプル中から 1000 コピー以上の核酸（DNA）が抽出されることが必要と知れた。そのためには血漿 2ml の採取を、核酸の吸着性が低く、EDTA 入り採血管を用いることが重要であると知れた。また、核酸抽出の過程が重要であることが明らかになった。今後の収集過程では、上記条件での収集を実施する。

E. 結論

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発、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、Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発のいずれにおいても倫理委員会承認のもと、臨床施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管が順調に開始された。測定のためのアッセイ系の確立、cut-off 値の決定も行われ、一部測定が開始されている。

F. 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 論文発表

1. Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, Yoneshige A, Ito A, Togashi Y, Develasco 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, in press.

2. 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.
3. 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.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる検体集積

担当責任者 岡本勇 九州大学病院 ARO 次世代医療センター 特任准教授

研究要旨

血漿・血清検体からの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の二次的耐性変異である T790M 検出による耐性モニタリングのための多施設共同での探索的臨床研究を立案した。

A. 研究目的

本研究では、測定施設（近畿大学）と連携し、liquid biopsy による遺伝子診断、すなわち liquid sequencing を実施し、feasibility と臨床的意義を検討する。血漿・血清検体からの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の二次的耐性変異である T790M 検出による耐性モニタリングを実施することが直接的な目的である。

B. 研究方法

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発を立案し、倫理委員会の承認を得る。検体の集積を開始する。対象は、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌で EGFR-TKI 治療後に、臨床的に耐性となった症例の血漿サンプルである。EGFR-TKI 検出系として digital PCR および次世代シーケンサーを用いる。liquid sequencing による探索的臨床研究の実施を担当する。

（倫理面への配慮）

臨床サンプルの収集に当たっては、文書による同意を得て実施するため、立案した研究計画書を倫理委員会での審査に申請中である。

C. 研究結果

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる多施設共同での探索的臨床研究を立案し、研究計画書を作成した。倫理委員会の承認を得るため、申請中である。

D. 考察

多施設共同での探索的臨床研究の実施のため、検体採取、保管方法、測定機関への輸送手段などを議論し、スムーズな研究の実施が可能な研究計画が策定された。

E. 結論

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる多施設共同での探索的臨

床研究の研究計画書が策定され、順調に進んでいると考えられる。

F. 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

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

担当責任者 西尾誠人 がん研有明病院呼吸器センター呼吸器内科 部長

研究要旨

liquid biopsy による ALK, RET, ROS1 等の融合遺伝子の検出とチロシンキナーゼ阻害剤に対する新規耐性機序の解明を目的として 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を開始した。耐性化症例の初代継代培養細胞株のゲノム解析に着手した。耐性症例での二次的変異解析のために EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌を対象にした EGFR-TKI 獲得耐性後の検体収集ならびに ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者の検体収集を倫理委員会承認の下、開始した。

A. 研究目的

本研究では、liquid biopsy による遺伝子診断、すなわち liquid sequencing を実施する。第 1 の目標は、liquid biopsy による ALK, RET, ROS1 等の融合遺伝子の検出とチロシンキナーゼ阻害剤に対する新規耐性機序の解明である。また、血漿・血清検体からの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の二次的耐性変異である T790M 検出による耐性モニタリングである。

B. 研究方法

ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者で ALK 阻害剤耐性化した症例の腫瘍片より初代継代培養細胞株を樹立する。同細胞を用い次世代シーケンサー等によりゲノム解析を開始する。耐性症例での二次的変異解析のための研究計画の倫理委員会での承認を得て、検体の集積を開始する。

（倫理面への配慮）

臨床サンプルの収集に当たっては、倫理委員会の承認を得、同意を文書で得て実施した。

C. 研究結果

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：耐性化症例の初代継代培養細胞株でのゲノム解析に着手した。耐性症例での二次的変異解析のための研究計画を倫理委員会へ申請し承認を得た。耐性化症例の初代継代培養細胞株のゲノム解析を次世代シーケンサー等によるエクソーム解析等を開始した。耐性症例での二次的変異解析のための検体の集積を開始した。

D. 考察

Liquid biopsy に供する採血について、EDTA 入り採血管を用いることが重要であると知れた。ま

た、抽出される核酸が 2ml 血漿から抽出することが適切と考えられた。今後の収集過程では、上記条件での収集を実施する。

E. 結論

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発、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、Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる研究開発のいずれにおいても倫理委員会承認のもと、測定施設と共同で、臨床サンプルの収集・保管が順調に開始された。測定の為のアッセイ系の確立、cut-off 値の決定も行われ、一部測定が開始されている。

F. 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 論文発表

1. 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. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer discovery*, 4(6): 662-73, 2014.

2. 学会発表

1. 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/RO5424802) for

ALK-rearranged NSCLC with or without prior crizotinib treatment in bioequivalence study. 2014 ASCO Annual Meeting. J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr 8103). 2014; General Poster Session, Lung Cancer - Non-Small Cell Metastatic.

2. 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). 2014 ASCO Annual Meeting J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr 8031). 2014; Poster Highlights Session, Lung Cancer - Non-small Cell Metastatic.

H. 知的財産等の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

Liquid biopsy による EGFR-TKI 獲得耐性遺伝子変異モニタリングに関わる検体集積

担当責任者 池田徳彦 東京医科大学呼吸器外科・甲状腺外科 主任教授

研究要旨

血漿・血清検体からの EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の二次的耐性変異である T790M 検出による耐性モニタリングの feasibility を見るため、臨床試験を立案、倫理委員会の承認を経て、臨床検体の収集を開始した。

A. 研究目的

分子標的薬治療経過中の患者のために適切な治療薬の選択を可能にする非侵襲的なバイオマーカー診断技術の確立を目指し、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する。

B. 研究方法

腫瘍組織と血清のペア検体を用いた EGFR 遺伝子変異を含む獲得耐性に関わる遺伝子異常を検討するための研究計画の倫理委員会での承認を得て、検体の集積を開始する。

（倫理面への配慮）

臨床サンプルの収集に当たっては、倫理委員会の承認を得、文書による同意を得て実施した。

C. 研究結果

腫瘍組織と血清のペア検体を用いた EGFR 遺伝子変異を含む獲得耐性に関わる遺伝子異常を検討するための研究計画を立案し、倫理委員会での承認を得て、検体の集積を開始した。約 200 例のレトロスペクティブな検体についても選択し、測定機関に送付した。同時に臨床情報の収集・整理を行った。

D. 考察

対象症例の選択には、組織型によりどの程度絞り込むかについて検討する必要がある。同一患者の組織および血漿ペアのレトロスペクティブサンプルが多数収集され、腫瘍・血中の遺伝子変異ステータスの一致率および 2 次的遺伝子変異以外の耐性機序の検出等、遺伝子解析結果が期待される。

E. 結論

倫理委員会承認のもと、臨床サンプルの収集・保管が順調に開始され、遺伝子解析も順調に進んでいる。

F. 研究発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

1. 論文発表

1. 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): 329-333, 2014.

2. 学会発表

1. Kudo Y, Usuda J, Furumoto H, Maehara S, Ohtani K, Inoue T, Ishizumi T, Kato Y, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Expression of klotho enhances the apoptotic response of cancer cells to anticancer agents. AACR Annual Meeting 2014, San Diego, 2014.
2. Ohira T, Oikawa T, Otani K, Yoshida K, Kato Y, Maeda J, Hagiwara M, Nagase S, Kakihana M, Kajiwara N, Ikeda N. Histological diagnosis of lung cancer using small biopsy samples. 18th WCBIP/ WCBE World Congress, Kyoto, 2014.
3. Shimada Y, Yoshida K, Kato Y, Hagiwara M, Kakihana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N. Surgical results of lung cancer with synchronous multiple ground-glass opacities and the management of the residual and new lesions. 28th EACTS Annual Meeting, Milan, Italy, 2014.
4. Kudo Y, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K, Osawa J, Maehara S, Maeda J, Matsubayashi 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. 2014 IASLC Asia Pacific Lung Cancer

Conference, Kuala Lumpur, Malaysia,
2014.

5. 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、第 10 回日本臨床プロテオーム研究会、東京、2014.
6. 垣花昌俊, 吉田浩一, 三宅真司, 前田純一, 梶原直央, 筒井英光, 大平達夫, 長尾俊孝, 池田徳彦、呼吸器細胞診検体採取への LBC (Liquid-Base Cytology) の応用の検討、第 55 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 、横浜、2014.
7. 吉田浩一, 垣花昌俊, 前田純一, 梶原直央, 筒井英光, 大平達夫, 長尾俊孝, 池田徳彦、ALK 陽性肺癌の細胞診像、第 55 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 、横浜、2014.
8. 工藤勇人, 嶋田善久, 垣花昌俊, 大谷圭志, 加藤靖文, 佐治久, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦、肺腺癌切除後再発と EGFR 遺伝子変異の関係、第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会、福岡、2014.
9. 牧野洋二郎, 尹晶煥, 真村端子, 黒田雅彦, 池田徳彦、Distinct Phosphorylation Status of TGF- β Receptor-regulated Smads in NSCLCs with EGFR/Ras Mutation、第 55 回日本肺癌学会学術集会、京都 2014.

H. 知的財産等の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」

近畿大学医学部、九州大学病院、公益財団法人がん研究会有明病院、東京医科大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Antitumor activity of alectinib (CH5424802/R05424802) for ALK-rearranged NSCLC with or without prior crizotinib treatment in bioequivalence study.	Nakagawa K, Seto T, Satouchi M, <u>Nishio M</u> , Hotta K, Murakami H, Ohe Y, Takeda K, Tatsuno M, Yoshikawa N, Tanaka T, Tamura T.	2014 ASCO Annual Meeting	2014	国外
Evolution of resistance in ALK-positive patients treated with ALK tyrosine kinase inhibitors (TKIs).	Justin F. Gainor LF, Katayama R, Awad MM, Lockerman EL, Schultz K, Mahmood S, <u>Nishio M</u> , Yanagitani N, Sequist LV, Mino-Kenudson M, Engelman JA, Shaw AT.	2014 ASCO Annual Meeting	2014	国外
Expression of klotho enhances the apoptotic response of cancer cells to anticancer agents.	Kudo Y, Usuda J, Furumoto H, Maehara S, Ohtani K, Inoue T, Ishizumi T, Kato Y, Kakahana M, Kajiwara N, Ohira T, <u>Ikeda N</u> .	AACR Annual Meeting 2014	2014	国外

Histological diagnosis of lung cancer using small biopsy samples.	Ohira T, Oikawa T, Otani K, Yoshida K, Kato Y, Maeda J, Hagiwara M, Nagase S, Kakahana M, Kajiwara N, Ikeda N.	18th WCBIP/ WCBE World Congress	2014	国内
Surgical results of lung cancer with synchronous multiple ground-glass opacities and the management of the residual and new lesions.	Shimada Y, Yoshida K, Kato Y, Hagiwara M, Kakahana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N.	28th EACTS Annual Meeting	2014	国外
Impact of EGFR mutation status on survival after recurrence in patients with completely resected lung adenocarcinoma.	Kudo Y, Shimada Y, Kato Y, Yoshida K, Osawa J, Maehara S, Maeda J, Matsybayashi J, Kakahana M, Kajiwara N, Ohira T, Ikeda N.	2014 IASLC Asia Pacific Lung Cancer Conference	2014	国外
肺癌治療成績向上のためのバイオマーカー研究	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	第10回日本臨床プロテ オーム研究会	2014	国内
呼吸器細胞診検体採取へのLBC (Liquid-Base Cytology) の応用の検討	垣花昌俊, 吉 田浩一, 三宅 真司, 前田純 一, 梶原直 央, 筒井英 光, 大平達 夫, 長尾俊 孝, 池田徳彦	第55回日本臨床細胞学 会総会	2014	国内

ALK陽性肺癌の細胞診像	吉田浩一, 垣花昌俊, 前田純一, 梶原直央, 筒井英光, 大平達夫, 長尾俊孝, 池田徳彦	第55回日本臨床細胞学会総会	2014	国内
肺腺癌切除後再発とEGFR遺伝子変異の関係	工藤勇人, 嶋田善久, 垣花昌俊, 大谷圭志, 加藤靖文, 佐治久, 梶原直央, 大平達夫, 池田徳彦	第67回日本胸部外科学会定期学術集会	2014	国内
Distinct Phosphorylation Status of TGF- β Receptor-regulated Smads in NSCLCs with EGFR/Ras Mutation	牧野洋二郎, 尹晶煥, 真村端子, 黒田雅彦, 池田徳彦	第55回日本肺癌学会学術集会	2014	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Extended RAS and BRAF mutation analysis using next-generation sequencing.	Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, Yoneshige A, Ito A, Togashi Y, Develasco MA, Terashima M, Fujita Y, Tomida S, Tamura T, Nakagawa K, Nishio K.	PLOS ONE, in press.	2015	国外
Development of On-Chip Multi-Imaging Flow Cytometry for Identification of Imaging Biomarkers of Clustered Circulating Tumor Cells.	Kim H, Terazono H, Nakamura Y, Sakai K, Hattori A, Odaka M, Girault MA, Arai T, Nishio K, Miyagi K, Yasuda K.	PLOS ONE, 9(8): e104372	2014	国外

Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer.	Kimura H, Ohira T, Uchida O, Matsubayashi J, Shimizu S, Nagao T, Ikeda N, Nishio K.	Lung Cancer, 83(3): 329-33	2014	国外
ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer.	Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys PY, Awad MM, Yanagitani N, Kim S, Pferdekamper 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.	Cancer discovery, 4(6): 662-73	2014	国外

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。



Development of On-Chip Multi-Imaging Flow Cytometry for Identification of Imaging Biomarkers of Clustered Circulating Tumor Cells

Hyonchol Kim¹, Hideyuki Terazono^{1,2}, Yoshiyasu Nakamura³, Kazuko Sakai⁴, Akihiro Hattori¹, Masao Odaka¹, Mathias Girault¹, Tokuzo Arai⁴, Kazuto Nishio⁴, Yohei Miyagi³, Kenji Yasuda^{1,2*}

1 Kanagawa Academy of Science and Technology, Takatsu, Kawasaki, Japan, **2** Department of Biomedical Information, Division of Biosystems, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda, Tokyo, Japan, **3** Molecular Pathology and Genetics Division, Kanagawa Cancer Center Research Institute, Asahi-ku, Yokohama, Japan, **4** Department of Genome Biology, School of Medicine, Kinki University, Osaka-Sayama, Osaka, Japan

Abstract

An on-chip multi-imaging flow cytometry system has been developed to obtain morphometric parameters of cell clusters such as cell number, perimeter, total cross-sectional area, number of nuclei and size of clusters as “imaging biomarkers”, with simultaneous acquisition and analysis of both bright-field (BF) and fluorescent (FL) images at 200 frames per second (fps); by using this system, we examined the effectiveness of using imaging biomarkers for the identification of clustered circulating tumor cells (CTCs). Sample blood of rats in which a prostate cancer cell line (MAT-LyLu) had been pre-implanted was applied to a microchannel on a disposable microchip after staining the nuclei using fluorescent dye for their visualization, and the acquired images were measured and compared with those of healthy rats. In terms of the results, clustered cells having (1) cell area larger than 200 μm^2 and (2) nucleus area larger than 90 μm^2 were specifically observed in cancer cell-implanted blood, but were not observed in healthy rats. In addition, (3) clusters having more than 3 nuclei were specific for cancer-implanted blood and (4) a ratio between the actual perimeter and the perimeter calculated from the obtained area, which reflects a shape distorted from ideal roundness, of less than 0.90 was specific for all clusters having more than 3 nuclei and was also specific for cancer-implanted blood. The collected clusters larger than 300 μm^2 were examined by quantitative gene copy number assay, and were identified as being CTCs. These results indicate the usefulness of the imaging biomarkers for characterizing clusters, and all of the four examined imaging biomarkers—cluster area, nuclei area, nuclei number, and ratio of perimeter—can identify clustered CTCs in blood with the same level of preciseness using multi-imaging cytometry.

Citation: Kim H, Terazono H, Nakamura Y, Sakai K, Hattori A, et al. (2014) Development of On-Chip Multi-Imaging Flow Cytometry for Identification of Imaging Biomarkers of Clustered Circulating Tumor Cells. PLoS ONE 9(8): e104372. doi:10.1371/journal.pone.0104372

Editor: Thomas Dittmar, Witten/Herdecke University, Germany

Received: January 30, 2014; **Accepted:** July 10, 2014; **Published:** August 20, 2014

Copyright: © 2014 Kim et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Kanagawa Prefector’s local basic science funding for the On-chip Cellomics Project at the Kanagawa Academy of Science and Technology. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: yasuda.bmi@tmd.ac.jp

Introduction

Finding irregular cells in blood is fundamental to achieving non-invasive health checks, such as cancer and immune diagnostics. For example, circulating tumor cells (CTCs) are expected to form additional seeds for subsequent growth of tumors [1–3], and quantitative detection of CTCs in the blood [4–8] has the potential to achieve minimally invasive cancer diagnosis in comparison with conventional biopsies. One major approach to finding irregular cells is the targeting of specific molecules, molecular biomarkers, on the cell surface [1,3,6,9,10]; however, its application has sometimes had the difficulty of false-negative detection because of the variety of molecular expression properties of targeted cells.

To overcome these difficulties, we developed another system for the recognition of target cells [11–13]. In this system, cell samples were applied to a microchannel fabricated on a small microchip, cellular images were taken with a high-speed CCD camera, and target cells were identified depending on their morphological

characteristics, such as cellular area and perimeter. These morphological parameters, referred to as “imaging biomarkers” hereafter, are other indexes to identify specific target cells. For example, a large cellular size was indicated for some tumor cells [14–17], and a larger nucleus than in healthy cells is known as one common property of the morphometric phenotype of cancer cells [18–24]; therefore, finding target cells using imaging biomarkers, especially using both cell size and nucleus conformation, is useful for the identification of tumor cells. In this study, a real-time cell sorting system to achieve simultaneous processing of imaging biomarkers for both optical image (i.e., total cell configuration) and fluorescent image (i.e., nucleus configuration) was developed, and it was applied to identify irregular cells, especially clustered cells, in a blood sample. According to previous reports on CTC detection, the possibility of the CTCs forming clusters was suggested [7]; however, clear evidence had not been identified and there have been no quantitative studies on the identification of clustered cells in the blood. Here, a quantitative approach for cluster detection was suggested using imaging biomarkers as detection indexes.

Materials and Methods

Fabrication of microchip

The microchip was fabricated by the following procedure. A mask blank, which was a glass substrate coated with both chromium for light interception and positive photo-resist (AZPI350) for the fabrication of patterns (CBL4006Du-AZP, Clean Surface Technology Co., Kanagawa, Japan), was set to a laser lithography system (DDB-3TH, Neoark, Co., Tokyo, Japan) and a laser (405 nm wavelength) was irradiated onto the mask blank in the same pattern as the microchannel used in this study. After the irradiation, the mask blank was immersed in a developer of the resist (NMD-3, Tokyo Ohka Kogyo Co., Kanagawa, Japan) to remove the resist on which the laser was irradiated; then, a chromium layer was bared at this position. Next, the mask blank was immersed in chromium etching solution (MPM-E350, DNP Fine Chemicals, Co., Kanagawa, Japan), after which the bared chromium layer was removed and a transparent pattern of the microchannel was formed on the substrate. Finally, the whole resist on the mask blank was removed by light irradiation onto the whole of the substrate and immersion of the substrate in the developer; then, a photo mask of the microchannel was fabricated.

On the other hand, a light-curing resin (SU-8 3025, Nippon Kayaku Co., Tokyo, Japan) was spin-coated using a spin coater (1H-DX2, Mikasa, Co., Tokyo, Japan) of 25 μm thickness on a clean Si substrate. The resin-coated substrate was pre-baked at 95°C for 15 min, set in a mask aligner with the fabricated photo mask (MA-20, Mikasa), and the light (365 nm wavelength) was irradiated through the mask to harden the resin with the pattern of the microchannel. The substrate was heated at 65°C for 1 min and 95°C for 5 min sequentially to promote hardening of the resin, and excess resin was removed by immersing the substrate in SU-8 developer (Nippon Kayaku). A mold of the microchannel was then fabricated using the resin on the Si substrate.

To fabricate the chip, poly(dimethylsiloxane) (PDMS; SYLGARD 184 silicon elastomer, Dow Corning Co., Midland, MI, USA) was dropped onto the fabricated mold in sol state, and heated at 90°C for 1 h to harden the PDMS. The PDMS on which the pattern of the microchannel was transferred was peeled off from the mold and stuck with cleaned cover glass. Finally, plastic columns for the application of solvents including sample blood were pasted on the PDMS with epoxy resin; then, the microchip to be used in this study was fabricated.

Preparation of sample blood

This study was carried out in strict accordance with the Act on Welfare and Management of Animals of the Ministry of the Environment, Japan. The protocol was approved by the animal experiment committee of the Kanagawa Cancer Center (permit number 21-02). MAT-LyLu is a rat prostate cancer cell line established from the original Dunning R3327 tumor maintained by *in vivo* passage of a prostate cancer that spontaneously occurred in a Copenhagen rat [25]. This cell line was a generous gift from the original founders through Hisao Ekimoto, Ph.D., at the Oncology Section, Laboratory of Biology, Nippon Kayaku Co., Ltd., and was maintained in our laboratory.

To obtain blood containing cancer cells, the MAT-LyLu was adjusted to 5×10^6 cells in 200 μL of cell culture medium (RPMI 1640, Life Technologies Co., Grand Island, NY, USA), and implanted into the dorsal subcutaneous tissue of a Copenhagen rat (male, 6 weeks old). At 2 weeks after implantation, blood of the rat was collected from the subclavian vein using a collection tube containing heparin. The blood was hemolyzed using commercial reagent (BD Pharm Lyse, without fixative, BD Biosciences, San

Jose, CA, USA) for 10 min, washed along with $200 \times g$ centrifugation for 5 min and re-suspended two times in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin, suspended in PBS containing 100 ng/mL Hoechst 33258, and then incubated for 10 min to stain cellular nuclei. The sample was washed again along with centrifugation 3 times, suspended in 5% glucose solution, and applied to the sample inlet on the chip.

Flow cytometry

The prepared sample blood was applied to the sample inlet on a fabricated microchip with a sample volume of 50 μL in an assay. The same buffer with the sample cell suspension (i.e., 5% glucose) was also used as a sheath buffer, and was applied to the sheath buffer inlet. Air pressure was applied onto both sample and sheath buffer inlets simultaneously using a syringe pump to introduce these liquids into the microchannels. Before starting the experiments, flow velocity was calibrated by taking images of calibration beads using a CCD camera (Ditect Co., Tokyo, Japan) as the shift of bead position in the microchannel within a few frames of the images, and typically, 1 kPa pressure achieved flow velocity of about 3 mm/sec at the position after the meeting of sample and sheath flows. Multi-imaging observations of sample blood were then performed through the multi-view unit with 3 mm/sec flow velocity and 200 fps acquisition rate.

Comparative genomic hybridization analysis

Rat genome comparative genomic hybridization (CGH) microarray 244A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to perform array CGH on genomic DNA obtained from the MAT-LyLu cell line according to the manufacturer's instructions. A DNA sample obtained from liver tissue of a healthy Copenhagen rat was used as a reference. Genomic DNAs were extracted using a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined with PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent (Life Technologies). Agilent Genomic Workbench (Agilent Technologies) was used to analyze chromosomal patterns using an ADM-2 algorithm setting a threshold of 5.0.

Copy number assay

The gene copy numbers for *csrp2* and *zdhhc17* were determined using TaqMan Copy Number Assays according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The gene-specific primers and TaqMan probes were used in the experiments had the following sequences. Rat *csrp2* primers were: sense, 5'-GGACTAAATGGATTGATGCCACTCT-3'; antisense, 5'-GTCCCTGCTTCAAAGAAGACTGTCT-3'; probe, 5'-FAM-AAGAGCAAGAAAGGAAACCC-MGB-NFQ-3'. Rat *zdhhc17* primers were: sense, 5'-GCCCTACTGCATGATACA-3'; antisense, 5'-GGGCTGTTTTGCACATGAAATTCAA-3'; probe, 5'-FAM-CTGGACAGCATCTGCTAGTATAC-MGB-NFQ-3'. Rat *rpp40* primers were: sense, 5'-GTATGACACTGGCATGGAAGTCT-3'; antisense, 5'-CT-TGCAGGTCTCTGTGGAT-3'; probe, 5'-FAM-CCTGGCAATCAAAGTTAGGCTTAG-MGB-NFQ-3'. Genomic DNAs obtained from collected samples using the cell sorting system were extracted using a QIAamp DNA Micro kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentrations were determined with PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent. Rat *rpp40* was used as an internal control. Genomic DNAs obtained from MAT-LyLu cell line and healthy rat liver were used as positive and negative controls, respectively.