

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）

（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

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。

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, Arai 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, 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. 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- $\beta$  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