# 学位論文審査結果の報告書

氏　　名　　武川直樹

生年月日　　昭和　52年　4月　10日

本籍（国籍）　　兵庫県

学位の種類　　博　　士　（医　学）

学位記番号　　医　第　1228　号

学位授与の条件　　学位規程第５条該当
（博士の学位）

論文題目

HER2 genomic amplification in circulating tumor DNA from patients with cetuximab-resistant colorectal cancer.

（セツキシマブ耐性大腸癌患者における血漿でのHER2遺伝子増幅の検出）

審査委員

（主　査）　奥野清隆　㊞

（副主査）　岡田斉　㊞

（副主査）　光富徹哉　㊞

（副　査）　㊞

（副　査）　㊞

学位論文受理日　平成28年11月9日　　学位論文審査終了日　平成29年2月2日

# 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

KRAS 野生型大腸癌は抗 EGFR 抗体を用いた治療により予後の延長が期待されることが報告されている。しかし抗 EGFR 抗体を用いて治療をされた患者もやがて薬剤に抵抗性となる。抗 EGFR 抗体の耐性機序として KRAS、NRAS、BRAF、PIC3CA の変異や PTEN の欠失などが報告されており、また HER2 遺伝子増幅も耐性機序のひとつとして以前我々が報告した。技術の進歩によって血液中の DNA（Circulating tumor DNA）より遺伝子変異を検出できるという報告が様々の癌腫でなされており、大腸癌においても KRAS や BRAF の遺伝子変異の検出が可能との報告がある。今回の研究の目的は抗 EGFR 抗体に不応となった大腸癌患者の血漿を用いて HER2 遺伝子増幅を検出することである。

【方法】

抗 EGFR 抗体治療後に不応となった 18 人の患者の血漿サンプルより digital PCR 法を用いて reference である EFTUD2 と HER2 遺伝子コピー数の比を求め、それにより HER2 遺伝子増幅を検出する。

【結果】

今回の血漿サンプルを用いた研究において 18 人中 4 人（22%）に HER2 遺伝子増幅を認めた。そのうち一人は治療後の腫瘍組織でも HER2 遺伝子増幅を認め、これは治療前の検体では認められなかった。抗 EGFR 抗体治療の耐性機序として HER2 遺伝子増幅が出現し、これを血漿にて検出できたと考えた。

【考察】

過去のいくつかの臨床試験において HER2 を標的とした治療がなされ、良い結果を示している。血漿により HER2 陽性大腸癌患者を絞り込むことができれば、侵襲を伴う検査をすることなく抗 HER2 薬を含んだ最適な治療を提供することができる可能性がある。

【結論】

digital PCR を用いた血漿中の Circulating tumor DNA の解析は抗 EGFR 抗体に不応となった患者から HER2 遺伝子増幅を検出するのに有用であると考えられる。

| 博士論文の印刷公表 | 公表年月日 | 出版物の種類及び名称 |
|---|---|---|
| | 2016 年 1 月 19 日 公表 | 博士学位論文<br>Oncotarget<br>2016 Jan 19；7 (3)：3453-60<br>2016 年 1 月 19 日 掲載 |
| | HER2 genomic amplification in circulating tumor DNA from patients with cetuximab-resistant colorectal cancer | |
| | 全文 | |

# 論 文 審 査 結 果 の 要 旨

1）論文内容の要旨

【目的】

抗EGFR抗体はKRAS野生型進行大腸癌に対する標準治療として確立されている。しかし一定期間治療を行うと耐性を示すようになる。抗EGFR抗体の耐性機序としてKRAS、NRAS、BRAF、PIC3CAの変異やPTENの欠失などが報告されており、またHER2遺伝子増幅も耐性機序のひとつとして報告されている。技術の進歩によって血液中のcirculating tumor DNAより遺伝子異常を検出できるという報告が様々の癌腫でなされており、大腸癌においてもKRASやBRAFの遺伝子変異の検出が可能との報告がある。今回の研究の目的は大腸癌症例において抗EGFR抗体Cetuximab耐性獲得後のHER2遺伝子増幅を血中circulating tumor DNAを用いて検出可能か検討することである。

【対象および方法】

主な選択基準は大腸癌標準治療であるfluoropyrimidine、oxaliplatin、irinotecanによる治療を受けそれらに対して不応または不耐になった症例で、Cetuximabによる治療が実施され、耐性後に血液検体を得た症例である。主な除外基準はCetuximabによる治療効果を認めなかった症例、コントロールであるEFTUD2 遺伝子が100droplets以下であった症例、KRAS遺伝子変異型の症例である。抗EGFR抗体治療後に得た血漿からDNAを抽出後にdigital PCR法を用いてreferenceであるEFTUD2とHER2遺伝子コピー数の比を求め、それによりHER2遺伝子増幅を検出する。既報に基づきコピー数比1.25以上をHER2遺伝子増幅ありと定義した。

【結果】

18症例が解析の対象となった。年齢の中央値が61歳(51-80)、男性が13例、女性が5例であった。18症例のうち直腸原発が8例、S状結腸原発が7例と左側結腸の原発巣をもつ症例を多く認めた。治療レジメンとしては一般的に汎用されているirinotecanと併用しているものが11人と最多であった。治療の最良総合効果はPRが8例、SDが10例、無増悪生存期間の中央値は182.5日(70-554)であった。診断時の組織のIHC検査ではHER2の発現の亢進は認められなかったため、治療前にはHER2遺伝子増幅は認められなかったと判断した。HER2遺伝子とEFTUD2遺伝子のコピー数比からCetuximab耐性獲得後4症例がHER2遺伝子増幅ありと診断できた。そのうち一例は耐性獲得後の腫瘍組織でもHER2遺伝子増幅を認め、これは治療前の検体では認められなかった。

【考察】

既報ではKRAS遺伝子野生型大腸癌患者のうち診断時に5%前後HER2遺伝子増幅が認められると報告されている。一方抗EGFR抗体耐性後はその割合が12%前後と報告されており、割合が増加すると考えられている。本研究においても22%と高い割合でHER2遺伝子増幅ありと診断できた。限られた症例での検討ではあるが、診断時の割合を示した既報と頻度が異なった理由として獲得耐性の過程でHER2遺伝子増幅が出現した可能性が考えられた。現在HER2陽性大腸癌に対する抗HER2治療が開発されており効果を認めている。今回の結果から血中circulating tumor DNAを用いたHER2 statusの評価がこういった効果を認める治療の患者選択をする上で有用な方法になるのではないかと考える。また本研究ではcetuximab獲得耐性後1ポイントのみの評価であったが、血中circulating tumor DNAを用いて経時的にHER2 statusを評価する必要があると考える。本研究は限られた症例での検討であり、前向きに集めた検体でのvalidation studyが必要と考えられ、現在症例集積中である。

【結論】

digital PCR法を用いた血漿中のcirculating tumor DNAの解析は抗EGFR抗体に不応となった患者からHER2遺伝子増幅を検出するのに有用であると考える。

# 論 文 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は抗EGFR抗体治療が耐性となった症例のHER2遺伝子増幅を腫瘍組織ではなく、低侵襲な血液検査にて検出したことを報告した初めての研究である。現在HER2陽性大腸癌に対する治療が開発されており、すぐれた効果が報告されている。今回の研究で示した血液検査でのHER2遺伝子増幅の検出方法を用いれば、低侵襲で 高い治療効果が見込まれるHER2陽性大腸癌症例を選別できる可能性がある。よって本研究の結果は、今後の大腸癌患者の治療戦略を考える上で極めて重要な知見と考えられ、研究論文として価値のあるものと考える。

2）審査結果の要旨

本論文に対する最終試験は、平成29年1月5日午後5時から小講堂で実施された。

臨床で多忙である中で少しずつ研究成果を積み上げ、臨床的に有意義な研究を行った。プロトコール作成から臨床経過の追跡、薄切標本の作製、DNAの抽出などを自ら行い論文作成したものである。進行大腸癌に対しては他癌種と異なり、有効な治療が少ない。その中で有効な治療が見込めるHER2陽性大腸癌の診断に寄与すると考えられる本研究を行った著者に敬意を表したい。

最終試験では発表者が本研究を行うに至った背景、対象と方法、結果と考察を口頭にて発表した。それに対して私、奥野の司会進行により副主査である岡田、光冨両教授と共に学位審査を行った。

岡田教授からは次の質問があった。①cetuximab治療にて耐性を来した症例は、HER2遺伝子増幅が元々あったものが治療によりcetuximabに感受性のある腫瘍細胞が淘汰され選択的に増大したものか、治療の過程で遺伝子異常として出現したものか②cell free DNAによるHER2遺伝子増幅の検出は感度、特異度が未だ完全なものではないが、実臨床で応用されるようになるために、どのようにしてその精度を上げていくべきか③今回の研究の結果からcell free DNAを用いたHER2遺伝子増幅の検出が今後どのような形で臨床に応用されるべきか。などであった。また光冨教授からは以下の質問があった。①今回の研究でHER2遺伝子増幅ありと診断した症例の血中でのHER2コピー数比は症例毎で大きくことなるが、何故このような結果になったか（腫瘍組織にてconcordanceが得られている症例はHER2コピー数比が5以上であるが、他の症例はcut off値からわずかに高いのみ）、cut off値については再度検討が必要ではないか②HERACLES試験においてTrastuzumabとLapatinibの併用治療がなされているが、その基礎的背景は何か。などであった。また治療効果が高いとしたHER2陽性大腸癌に対するHERACLES試験の結果については、HER2陽性とする適格基準が他の癌腫より厳しく、そのためLate lineの治療にもかかわらずよい治療効果を認めたのではないかとの指摘があった。最後に私から日本におけるHER2陽性大腸癌に対して現在進行している試験と今後予定されている治療戦略について質問を行った。

これらの質問に対して発表者はこれまでの既知の報告などを踏まえ、具体的な例をあげながら適切に質問に答えた。また論文の内容、質疑応答から大腸癌に対する診断と治療、cell free DNAを用いての遺伝子異常の検出について優れたものをもつことが確認された。

したがって、主査・副主査が合議の上、提出された学位論文が確かに武川直樹氏の研究成果であること、同氏が腫瘍内科医としての技量をもつことを確認し、最終試験を合格とした。

3）最終試験の結果：
合格

4）学位授与の可否：
可

課博・論博

# 博士学位論文最終試験結果の報告書

平成 29 年 1 月 12 日

| | | |
|---|---|---|
| 審査委員 | 主査 | 奥野清隆 |
| | 副主査 | 岡田斉 |
| | 副主査 | 光富徹哉 |
| | 副査 | ㊞ |
| 学位申請者氏名 | | 武川直樹 |
| 論文題目 | | HER2 genomic amplification in circulating tumor DNA from patients with cetuximab-resistant colorectal cancer.<br>(セツキシマブ耐性大腸癌患者における血漿でのHER2遺伝子増幅の検出) |

要旨

武川直樹氏の博士学位論文に対する最終試験は、平成29年1月5日の午後5時から小講堂で実施された。

まず、発表者が本研究を行うに至った背景、対象と方法、結果と考察を口頭にて発表した。それに対して私、奥野の司会進行により副主査である岡田、光冨両教授と共に学位審査を行った。

岡田教授からは次の質問があった。①cetuximab治療にて耐性を来した症例は、HER2遺伝子増幅が元々あったものが治療によりcetuximabに感受性のある腫瘍細胞が淘汰され選択的に増大したものか、治療の過程で遺伝子異常として出現したものか②cell free DNAによるHER2遺伝子増幅の検出は感度、特異度が未だ完全なものではないが、実臨床で応用されるようになるために、どのようにしてその精度を上げていくべきか③今回の研究の結果からcell free DNAを用いたHER2遺伝子増幅の検出が今後どのような形で臨床に応用されるべきか。などであった。また光冨教授からは以下の質問があった。①今回の研究でHER2遺伝子増幅ありと診断した症例の血中でのHER2コピー数比は症例毎で大きくことなるが、何故このような結果になったか（腫瘍組織にてconcordanceが得られている症例はHER2コピー数比が5以上であるが、他の症例はcut off値からわずかに高いのみ）、cut off値については再度検討が必要ではないか②HERACLES試験においてTrastuzumabとLapatinibの併用治療がなされているが、その基礎的背景は何か。などであった。また治療効果が高いとしたHER2陽性大腸癌に対するHERACLES試験の結果については、HER2陽性とする適格基準が他の癌腫より厳しく、そのためLate lineの治療にもかかわらずよい治療効果を認めたのではないかとの指摘があった。最後に私から日本におけるHER2陽性大腸癌に対して現在進行している試験と今後予定されている治療戦略について質問を行った。

これらの質問に対して発表者はこれまでの既知の報告などを踏まえ、具体的な例をあげながら適切に質問に答えた。また論文の内容、質疑応答から大腸癌に対する診断と治療、cell free DNAを用いての遺伝子異常の検出について優れたものをもつことが確認された。

したがって、主査・副主査が合議の上、提出された学位論文が確かに武川直樹氏の研究成果であること、同氏が腫瘍内科医としての技量をもつことを確認し、最終試験を合格とした。