

## 公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金研究報告書

令和元年6月27日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名	所属施設					
	牧野 洋二郎 (助教)	施設名	東京医科大学 呼吸器・甲状腺外 科学分野	所在地	東京都新宿区西新宿 6-7-1	電話	03-3342-6111
研究課題	分子標的薬/免疫治療薬耐性機構解明へ向けたRadiogenomicsの実践と最適化医療への応用						
研究目的	<p>分子標的薬及び免疫阻害剤の登場によって肺癌治療成績は飛躍的に向上したが、これらの利用拡大に伴い初期/獲得耐性の出現が臨床上問題となっている。この薬物治療抵抗性癌の克服は次世代癌医療の開発における大きな課題である。一方で癌ゲノム解析データを活用して遺伝子変異パターン毎に患者を層別化し、治療方法を選択していく癌の最適化医療が実装化されつつある。本研究では肺癌薬剤耐性分子機構を解明し、耐性克服/予防のための先制医療から新しい最適化医療の基盤形成を目的として、以下に示す2つのアプローチの統合を目指す。</p> <p>第一はRadiogenomicsである。これは医用画像から得られる癌の画像的特徴に臨床情報とゲノム情報を融合し、最適化医療に応用する手法である。我々は三次元CT、PET/CTから得た特徴因子によって、肺癌切除後短期・長期成績の正確な予測を試みる研究を広く展開し、Radiogenomics基盤形成に努めてきた。第二は液状検体を用いた網羅的遺伝子解析をもとに最適化医療を行う、Clinical sequence (CS) である。これまで癌患者血液由来Exosome及びセルフリーDNAを用いたCSを実践し、浸潤転移・薬剤耐性等に関与するバイオマーカー探索研究を行ってきた。本研究ではこれらの研究成果を背景とし、薬剤初期/獲得耐性症例の包括的ゲノム及び画像情報との統合解析を行う。新規耐性機序解明・非侵襲性バイオマーカー探索と新たな最適化医療/創薬への応用にまで及ぶ次世代型研究である。</p>						
研究方法	<ol style="list-style-type: none"><li>肺癌症例抽出と医用画像特徴抽出プラットフォーム確立：<ul style="list-style-type: none"><li>免疫チェックポイント阻害剤 (IO) 及び分子標的治療薬投与例より薬剤耐性群、感受性群を抽出。</li><li>HRCT、3D CT、PET/CT等から画像特徴因子を抽出しRadiomicsライブラリーを作成。</li></ul></li><li>腫瘍標本を用いた網羅的ゲノム解析と特異的遺伝子抽出：<ul style="list-style-type: none"><li>上記症例の保存凍結切片/FFPE標本より核酸を抽出。遺伝子発現はRNA-seqで解析。これらを基に薬剤耐性Genomicsライブラリーと統合的Radiogenomicsライブラリーを作り、特異的関連因子を抽出。</li></ul></li><li>薬剤耐性関連遺伝子についての機能解析：<ul style="list-style-type: none"><li>In vitro; 各種Driver遺伝子陽性株を利用し、特異的遺伝子をCRIPR/CAS9システムを用いてKOさせる。浸潤・増殖能測定、薬剤感受性試験、遺伝子オンロジー解析を行い、耐性機序解明を目指す。</li><li>In vivo; 特異的遺伝子KO群、親株群細胞を皮下・尾静脈投与し、腫瘍形成・転移能を評価し、さらに各種IO及びDriver遺伝子阻害化合物を用いて薬剤感受性について比較検討する。</li></ul></li><li>検証群における遺伝子発現-画像-液状検体による薬剤耐性関連因子の検証：<ul style="list-style-type: none"><li>非侵襲性バイオマーカーによるCS体制確立と創薬への応用を目指し、液状検体を用いた検証を行う。</li></ul></li></ol>						

研 究 成 果	<p>免疫チェックポイント阻害剤 (Nivolumab、Pembrolizumab) 及び分子標的治療薬 (EGFR-TKI ; Gefitinib、Afatinib) 投与例から、薬剤自然耐性群、薬剤高感受性群 (無増悪生存期間2年以上)、早期獲得耐性群 (無増悪生存期間2ヵ月以下) の各20例を抽出した。各症例の腫瘍部分の画像的特徴因子として、胸部CT画像より腫瘍径、consolidation径を、3D-CTより腫瘍の体積、ヒストグラム、CT値平均、エントロピー、3D-CTでのCTR (consolidation tumor ratio) を測定した。またPET/CTを基に、SUVmax (Maximal value of standardized uptake value)、MTV (Metabolic tumor volume)、TLG (Total lesion glycolysis)、SUV平均値を計測した。今後、これらの画像的特徴因子を用いてRadiomicsライブラリーを作成する予定である。</p> <p>また、上記症例のうち分子標的治療薬投与例の5例で治療前、薬剤耐性獲得後、及び同一症例の正常肺組織のFFPE標本からDNA検体を抽出。株式会社理研ジェネシスに依頼し、Thermo Fisher Scientific社 Ion S5 XL systemを用いてターゲット領域DNAのシーケンス解析を行った。その後のバイオインフォマティクス解析にはTorrent Suite TM Softwareを使用し、産出されたリード配列の品質評価及びクリーニング、参照配列へのマッピング、変異の検索を行った。現在、変異の検出結果を解析中である。</p>	
	今 後 の 予 定	<p>Radiomicsに関しては今後はAI (Deep Learning) の使用も考えている。画像的特徴因子をAIで判別し、Genomicsライブラリーと統合する手法も考慮している。</p> <p>Genomicsに関しては現段階では症例数が少なく、ライブラリーを作成できる状態ではないため、今後はなるべく症例数を増やして薬剤耐性関連因子を抽出する予定である。また今回はFFPE標本によるDNA抽出を行ったが、DNAの品質に問題がある検体も多かったため、今後は保存凍結切片や生検体を用いる方向でシーケンスを行いたいと考えている。RadiomicsライブラリーとGenomicsライブラリーが作成できた段階で液状検体 (血清/血漿) 由来エクソソーム中の特異的遺伝子発現解析を行っていく予定。</p>

様式第3号

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金収支決算報告書

令和元年 6月 27日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名 東京医科大学 呼吸器・甲状腺外科学分野

氏名 牧野 洋二郎 ⑩

収 支 決 算 書

(単位 円)

交付を受けた助成金額		金		2,000,000円			
費	目	明	細	単	価 及 金 額	計	額
支 出 内 訳	設備、備品費	備品費 (PC)		279,000円		279,000円	
	消耗品費	委託解析費 実験消耗品費 未染標本作製 代 参考図書費		1,404,000円 297,143円 2,600円 17,257円		1,721,000円	
	計						
過 △ 不足額				0円			
備 考							

## 支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠
設備、備品費	279,000円	備品購入代(PC) 279,000円
消 耗 品 費	1,404,000円	委託解析代 1,404,000円
	297,143円	実験消耗品① 166,644円
		実験消耗品② 75,679円
		実験消耗品③ 54,820円
	2,600円	未染標本作成代 2,600円
	17,257円	参考図書① 4,234円
		参考図書② 13,023円