

# EGFR変異陽性肺癌における 血中腫瘍DNAの動態病理

株式会社DNAチップ研究所

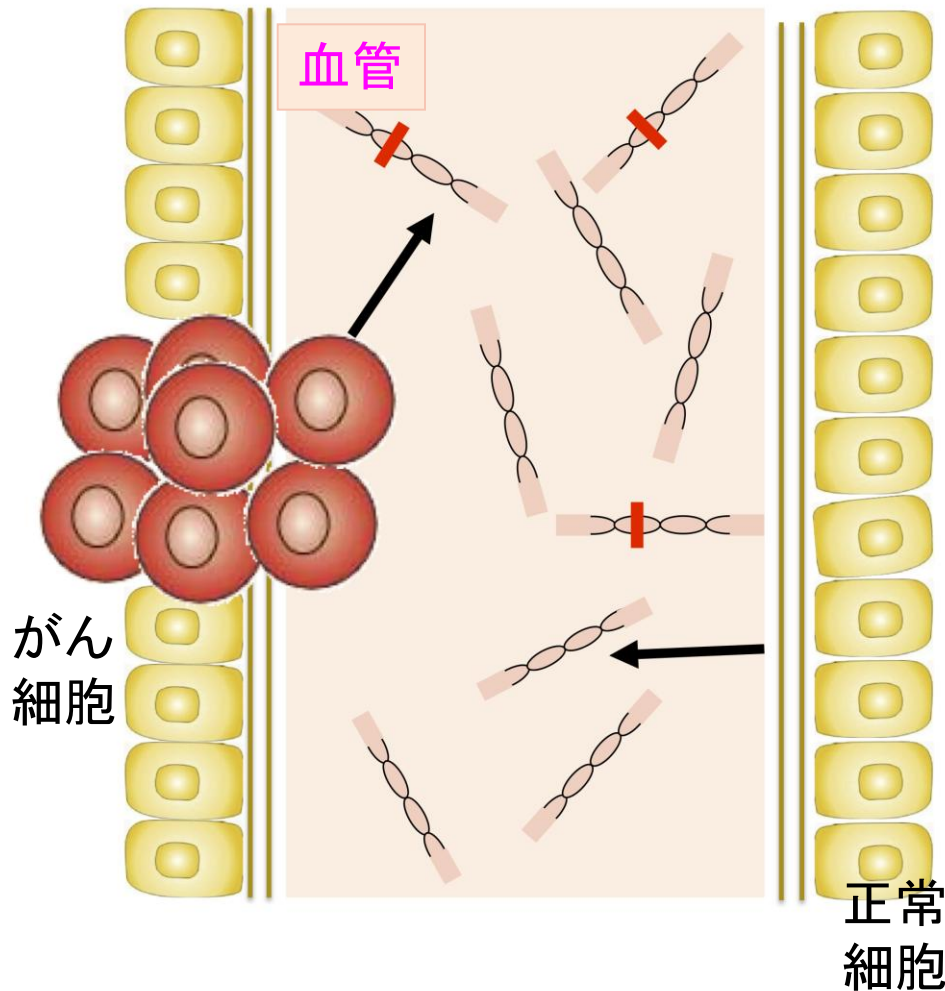
加藤菊也

- 技術紹介
  - Deep sequencing
- 臨床試験
  - 診断精度の決定
  - 血中腫瘍DNA動態観察
- 第3世代EGFR-TKIコンパニオン診断の可能性
  - AURA phase I 付随研究 (Dana Farber, AstraZeneca, NTU)
- 製品紹介
  - DIVA-EGFR

# 言葉の定義

- Cell-free DNA (cfDNA) (血中遊離DNA)
  - 血液中に溶解している細胞から放出されたDNA
- Circulating tumor DNA (ctDNA) (血中腫瘍DNA)
  - cfDNAの中で腫瘍細胞から放出されたもの
- Liquid biopsy
  - 末梢血で腫瘍の構成要素(細胞、DNA等)を検出する技術
  - 最近の総説ではctDNA

# cfDNAの生化学的特性



細胞死により放出

～170塩基対

～3000ゲノム /ml

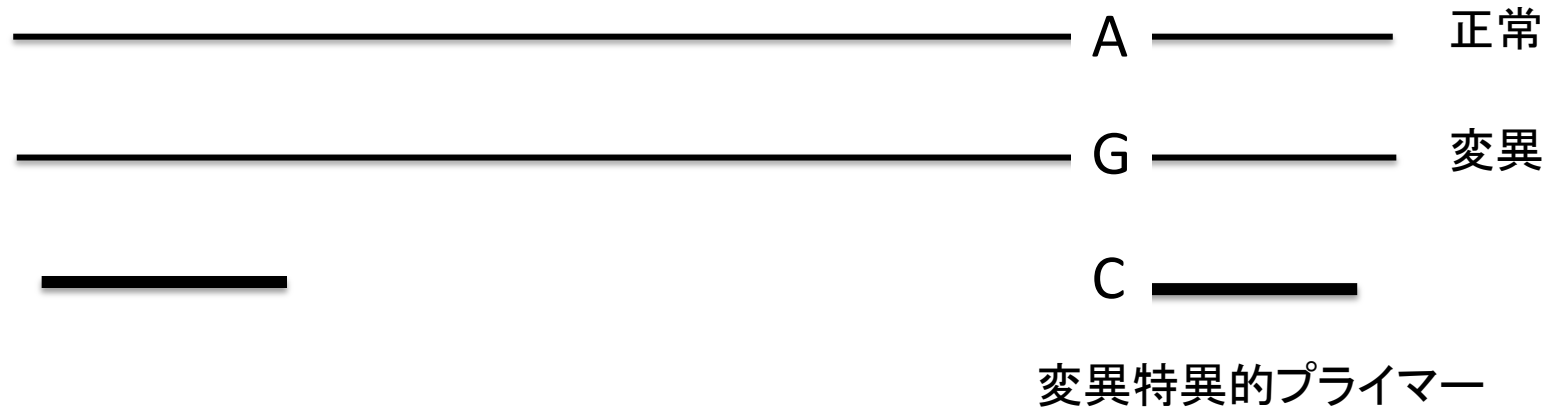
(CTC 1～10個 /ml)

半減期 16.5分(分娩)

144分(外科切除)

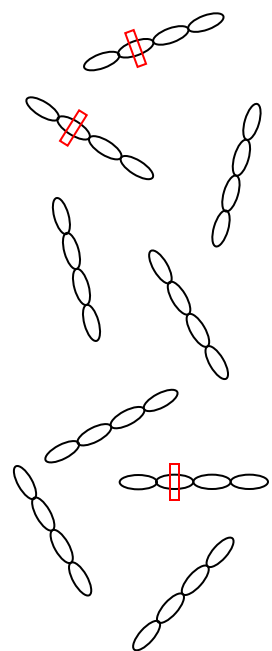
腫瘍特異的遺伝子異常(癌関連  
遺伝子変異等)でctDNAを検出

# 変異特異的PCR

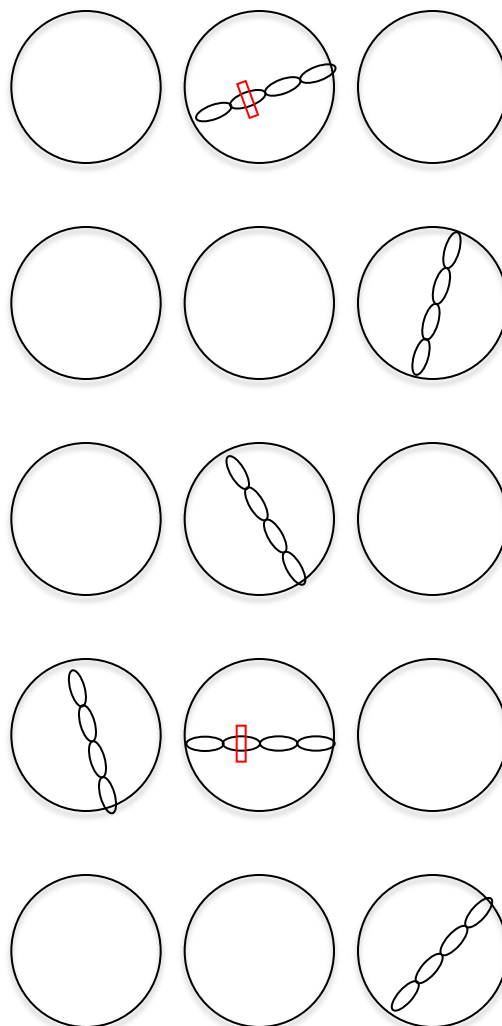


- 部位依存性が高い
  - 個々の遺伝子について別個の最適化が必要
  - 最適化しても変異検出性能は部位によって異なる
  - ➡ 多数の変異部位への対応が難しい
- 定量検出は難しい

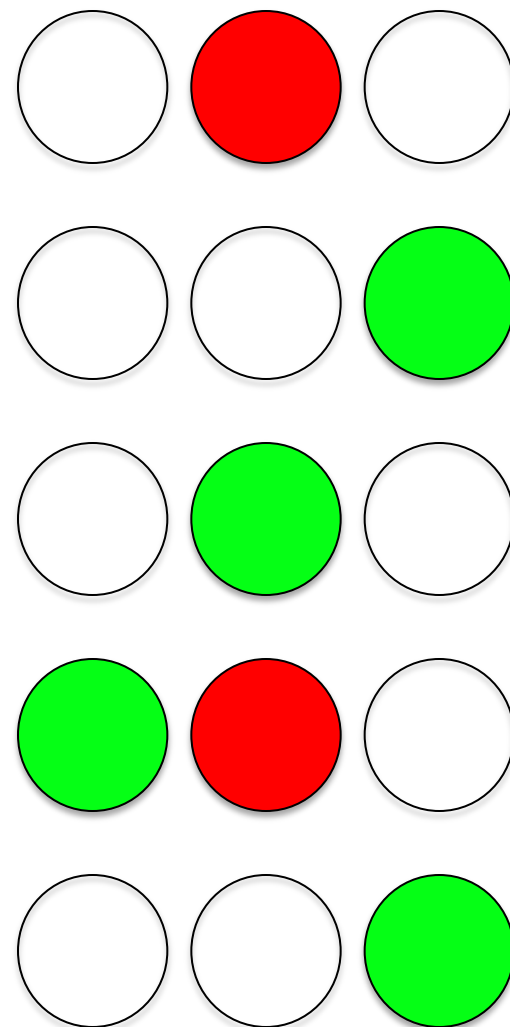
# デジタルPCR



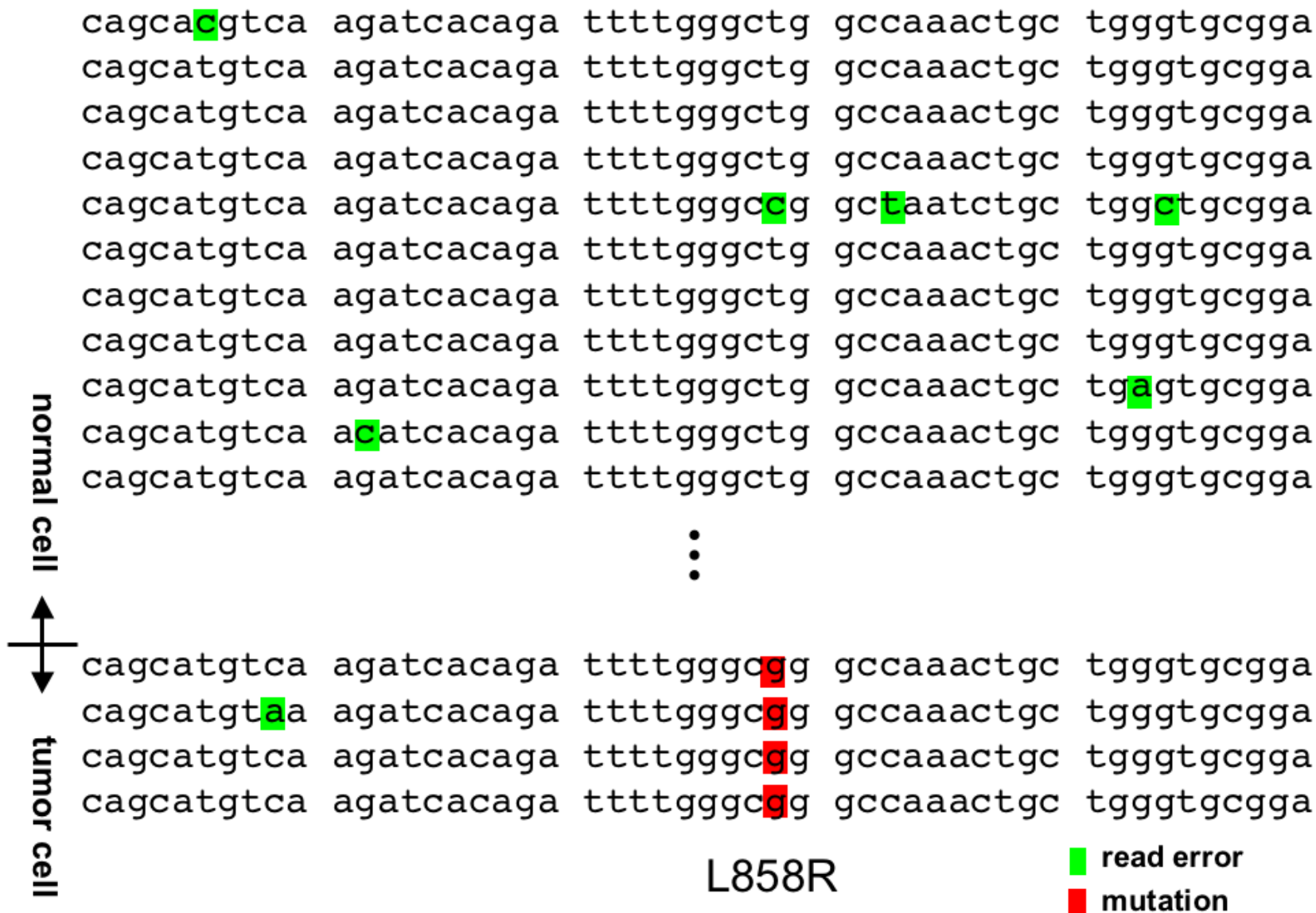
限外希釈



増幅  
蛍光標識



# Deep sequencing



PM (plasma mutation) score 10万リードあたりの変異リード数

## 診断精度(感度特異度)の決定 ～ 多施設前向き検証試験 (UMIN-CTR 番号:UMIN000006762)

- 臨床試験実施内容: 生検材料と血液を同時採取。生検検体の結果(PNA-LNA Clamp)を絶対標準として感度特異度を算出。
  - 目標症例数算定根拠 – 全体感度の95%信頼区間を20%以内にする症例数として算出。
- 目標症例数: 320症例。321症例収集し288例を解析へ。脱落例は血液あるいは生検検体の不採取による。
- 参加施設: 大阪府立成人病センター、大阪市立総合医療センター、大阪大学医学部附属病院。
- 患者登録期間: 2011年11月-2014年4月。
- EGFR変異測定期間: 2012年9月-2014年7月。
- STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy) (2003 version) の前向き試験基準をすべて満たしている。



## 前向き試験の結果 ～ 検出システムの性能

感度	Exon 19 del	50.9%	(37.9 – 63.9)
	L858R	51.9%	(38.7 – 64.9)
特異度	Exon 19 del	98.0%	(88.5 – 100)
	L858R	94.1%	(83.5 – 98.6)
	T790M	99.0%	(94.2 – 100)

全体感度	全症例	54.4%	(44.8 – 63.7)
	I – IIIA	22.2%	(11.5 – 38.3)
	IIIB – IV	72.7%	(60.9 – 82.1)

感度： 血液検体陽性症例 / 生検検体陽性症例

特異度： 血液検体陰性症例 / 生検検体陰性症例

全体感度： 変異の種類を問わない

括弧内： 95%信頼区間

# 活性化変異診断精度 ～ 他の研究との比較

	研究種別	測定方法	EGFR変異 陽性症例数 ( ):全症例数	ステージ	感度 ( ): IIIB-IV	特異度
Uchida et al. (2015)	前向き	Deep sequencing	105 (288)	I-IV	54.4 (72.7)	94.1, 98.0
Douillard et al.(2014)	後ろ向き	Qiagen Therascreen	118 (859)	進行癌	65.7	99.8
ENSURE 付随研究 (FDA 2016)	前向き 後ろ向き?	Rosche Cobas v. 2	214 (601)	IIIB-IV	76.7	98.2
ACCESS study (ELCC 2015)	前向き	施設によって 異なる	189 (1152)	IIIA-IV	46.0	97.4
Qiu et al. (2015)	メタ解析	研究によって 異なる	3110	研究によっ て異なる	62.0	95.7

# リキッド・バイオプシー承認状況

コンパニオン診断薬	対象変異	対象薬剤	承認	承認日
Qiagen Therascreen	exon 19 del, L858R	ゲフィチニブ	CE-IVD	2015/1/12
Rosche Cobas v.2	exon 19 del, L858R	エルロチニブ	FDA	2016/6/1
Rosche Cobas v.2	T790M	オシメルチニブ	FDA	2016/9/29

注:

Qiagen Therascreen 通常生検 → 血液 (exon 19 del, L858R)

Rosche Cobas v.2 血液 → 通常生検 (exon 19 del, L858R)

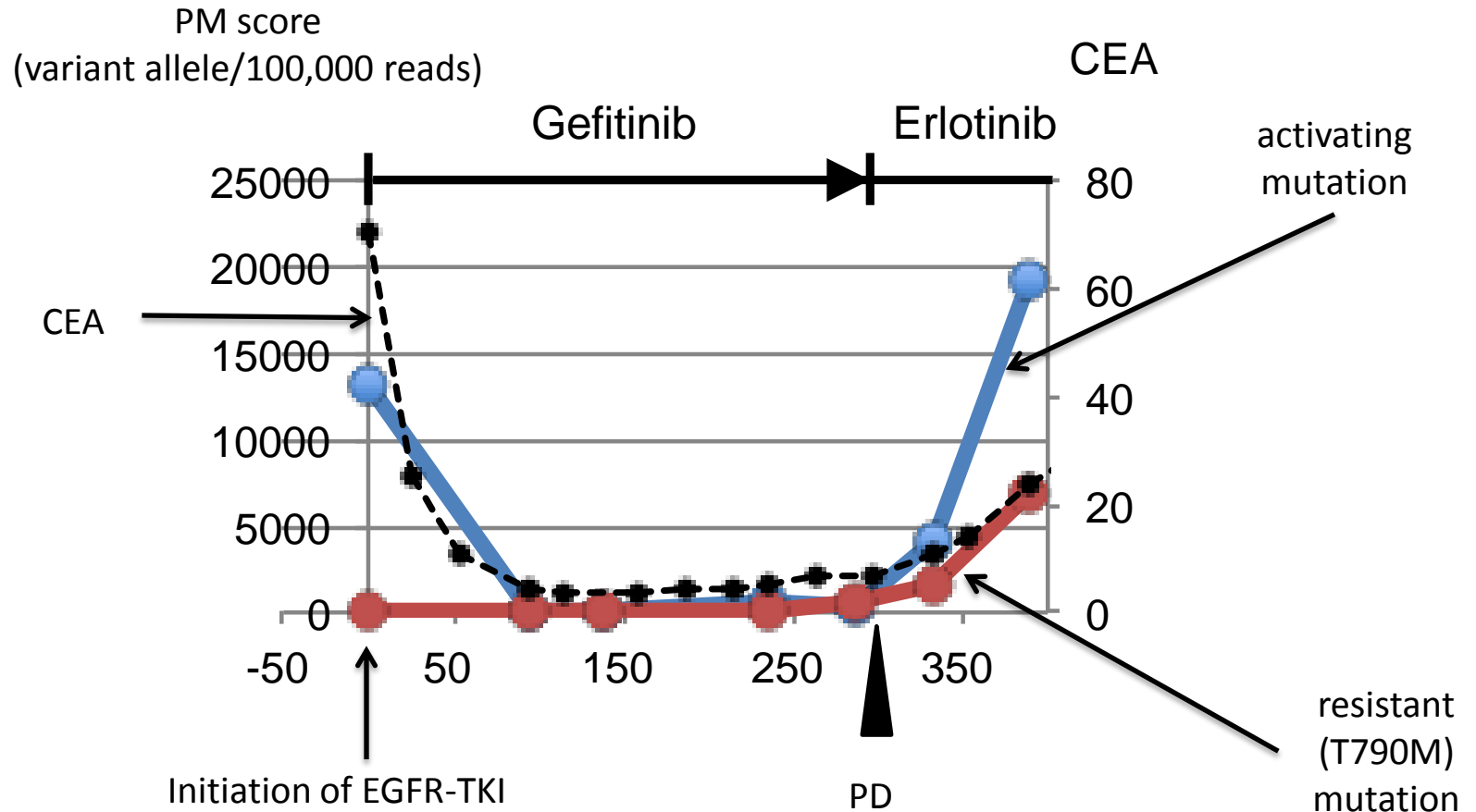
通常生検 → 血液 (T790M)

# 時系列解析

- 長期動態 ～ 獲得耐性
  - 後ろ向き保存検体
    - 患者数57名、解析対象10例、血液検体数190
    - 2010年10月～2013年8月
  - 前向き探索研究
    - 患者数52名、解析対象29例、血液検体数559
    - 患者登録2011年11月～2014年3月、検体採取は2014年6月30日で終了
- 短期動態 ～ EGFR-TKI治療開始直後
  - 解析対象患者数21名、血液検体数165
  - 患者登録2013年8月～2014年4月、検体採取は2014年8月まで

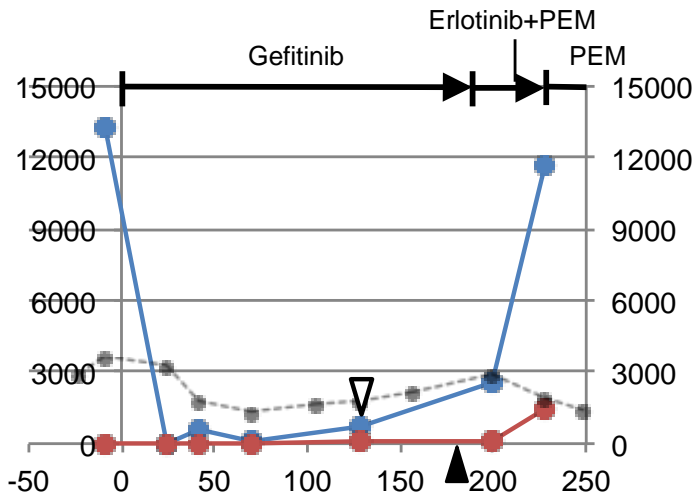
参加施設： 大阪府立成人病センター

# ctDNA動態の例 (patient 1r)

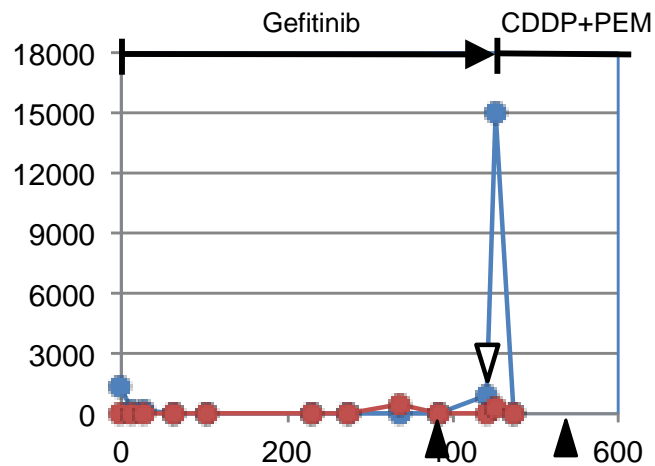


# その他の例

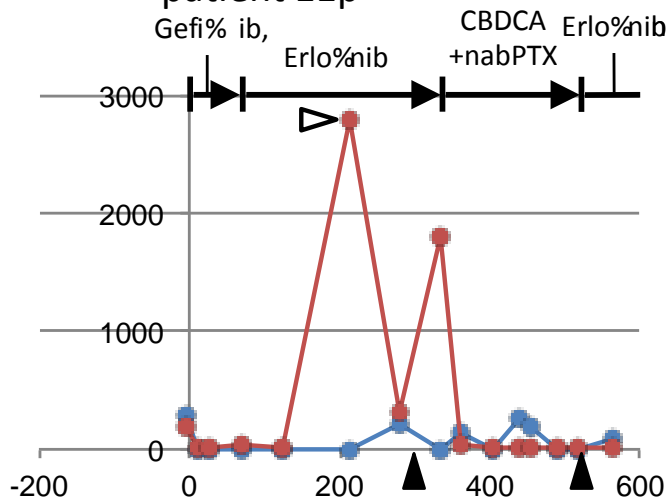
patient 4p



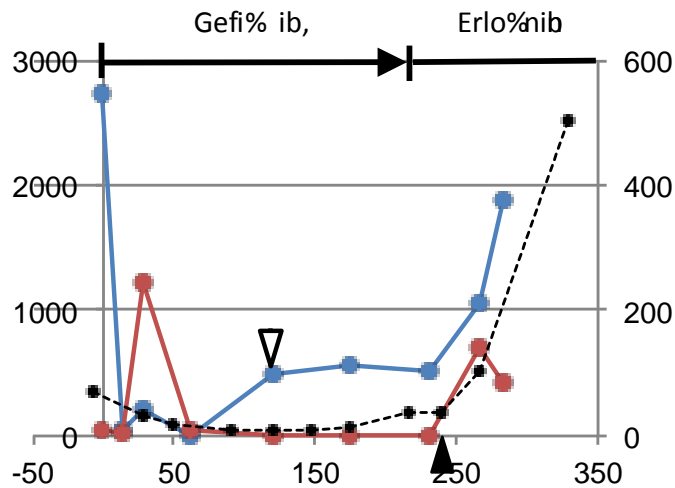
patient 5p



patient 11p

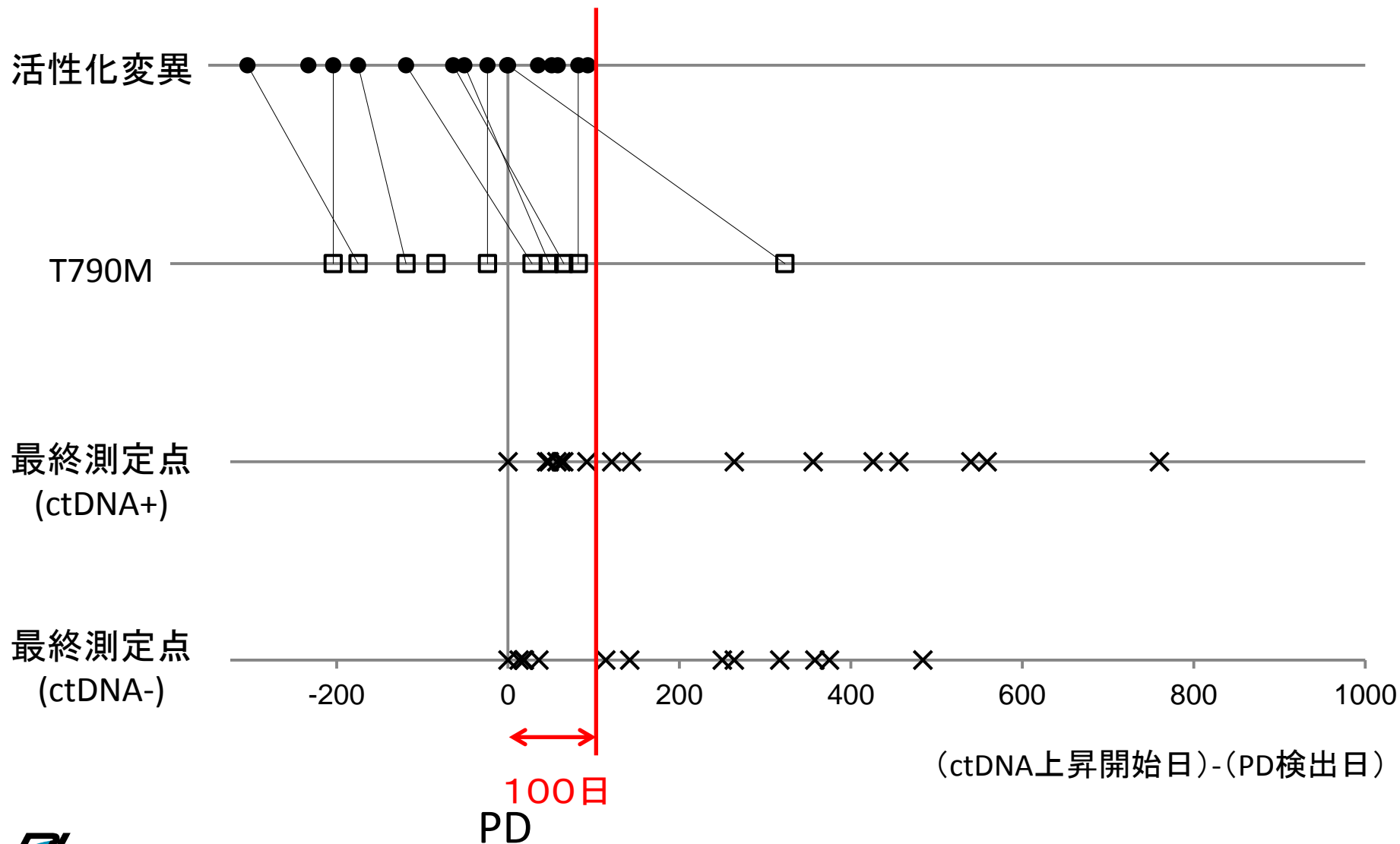


Patient 13p



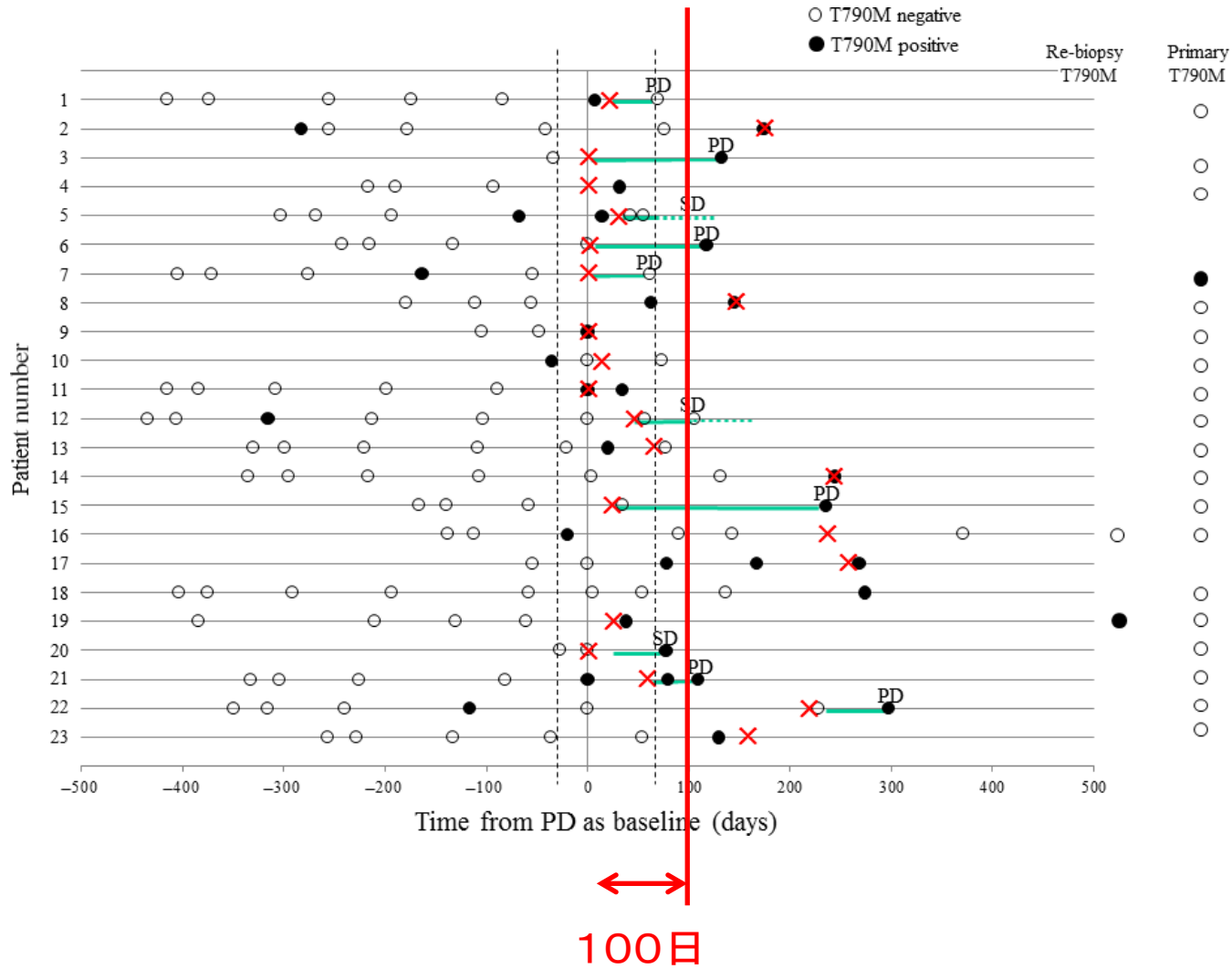


# PD検出点とctDNA上昇開始点との関係





# Monitoring *EGFR* T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study

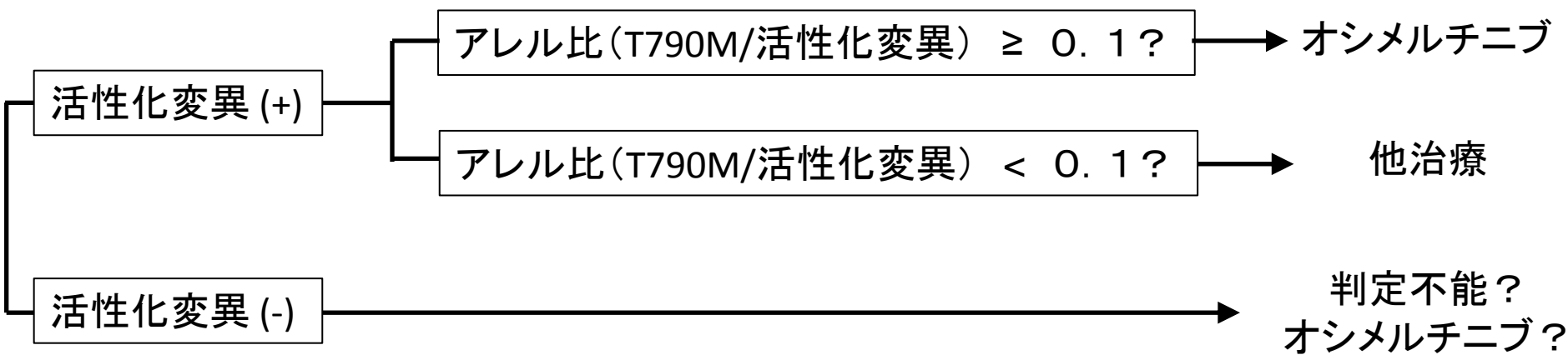
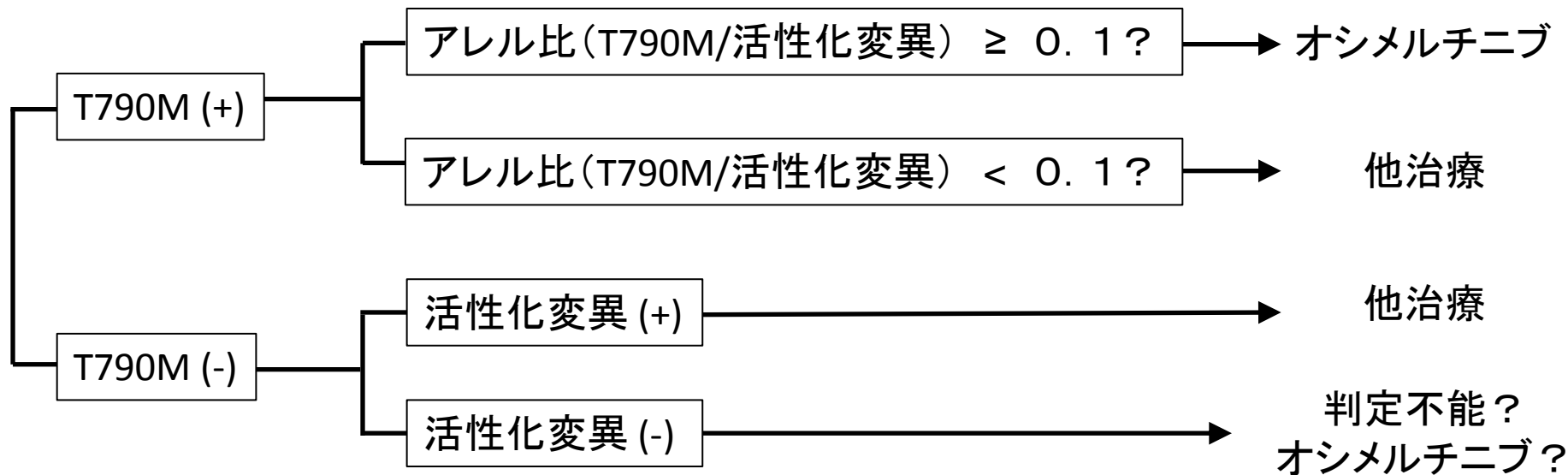


Sueoka-Aragane, N. et al. Cancer Sci 2016, 107, 162

# 獲得耐性症例のctDNA出現率

	ctDNA 検出症例	全症例	検出率	95%信頼区間
活性化変異/T790M	16	29	55.2%	(37.5 – 71.6)
活性化変異	15	29	51.7%	(34.4 – 68.6)
T790M	10	29	34.5%	(19.9 – 52.4)
T790M (Sueoka-Aragane et al.)	23	58	39.7%	(28.1 – 52.5)

# 血漿検体のみによる診断の可能性 (by KK based on AURA I)



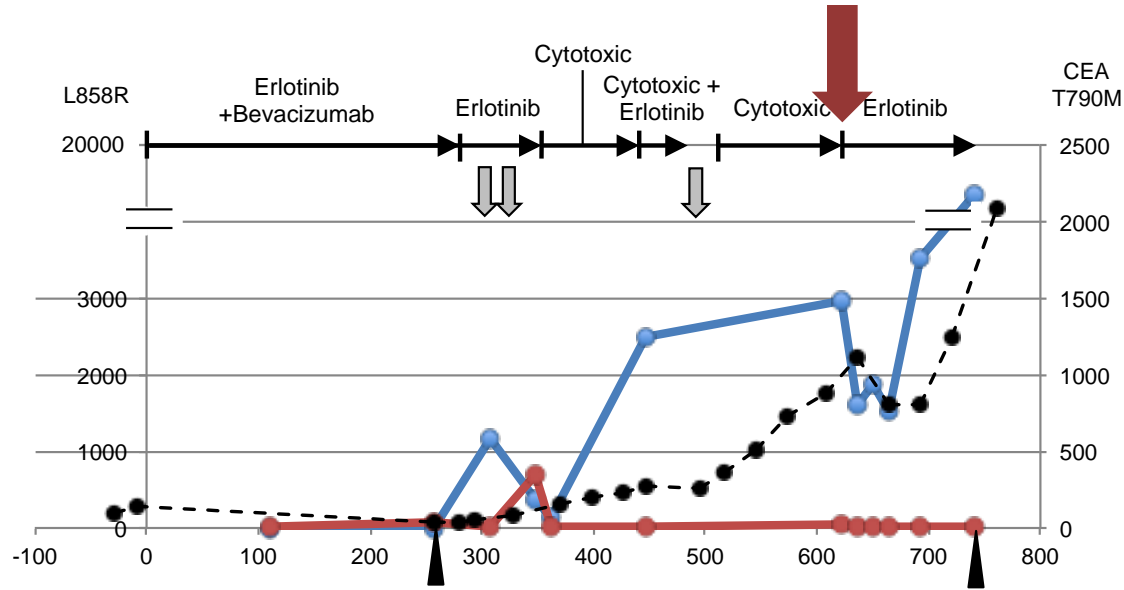
注: T790M(+)活性化変異(-)症例については別途評価必要. ? : 臨床試験による評価必要.

Indication of use for the cobas® EGFR Mutation Test v2  
(from FDA home page)

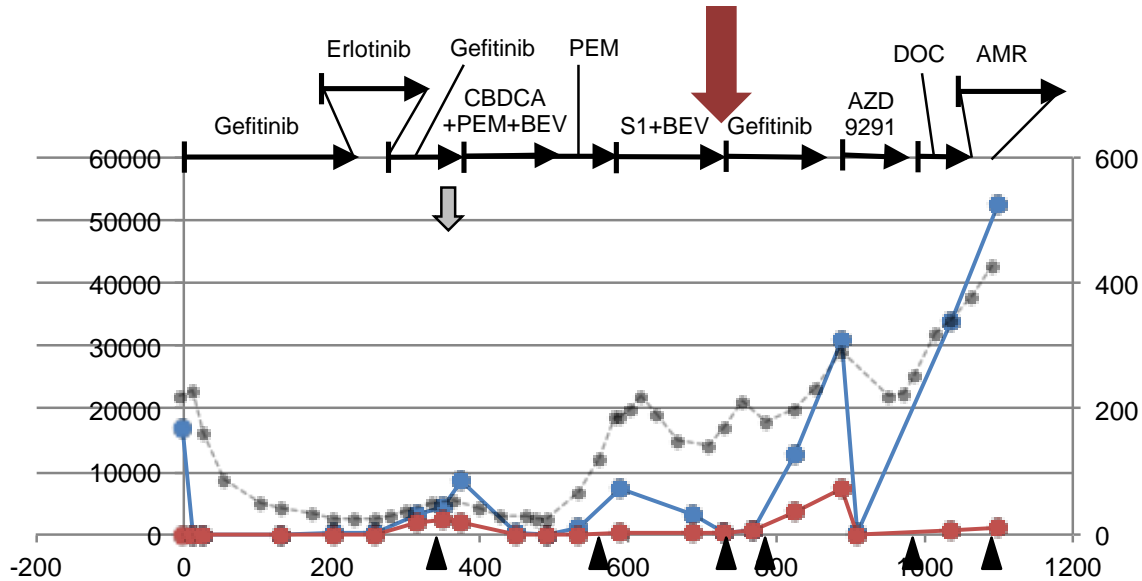
The efficacy of TAGRISSO™ (osimertinib) has not been established in the EGFR T790M plasma-positive, tissue-negative or unknown population and clinical data for T790M plasma-positive patients are limited; therefore testing using plasma specimens is most appropriate for consideration in patients from whom a tumor biopsy cannot be obtained.

# EGFR-TKI Rechallenge

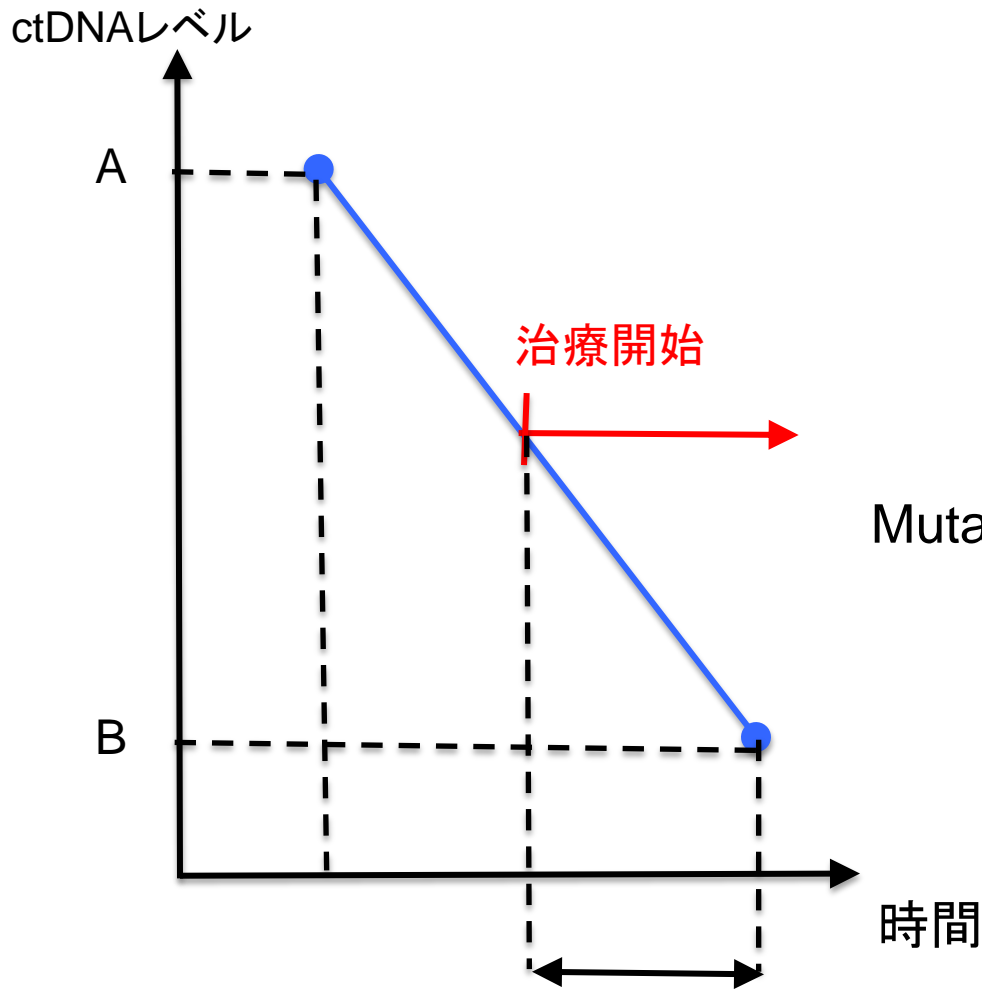
patient 5r



patient 9p



# ctDNA動態の数値指標化



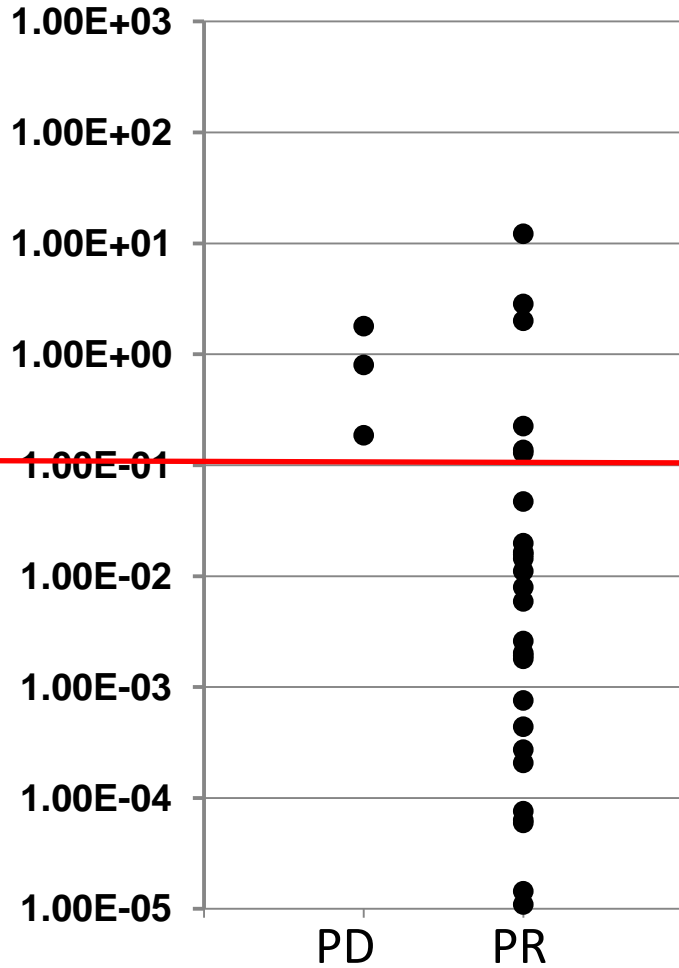
$$\text{MART} = \frac{B}{A}$$

Mutation Allele Ratio in Therapy (MART)

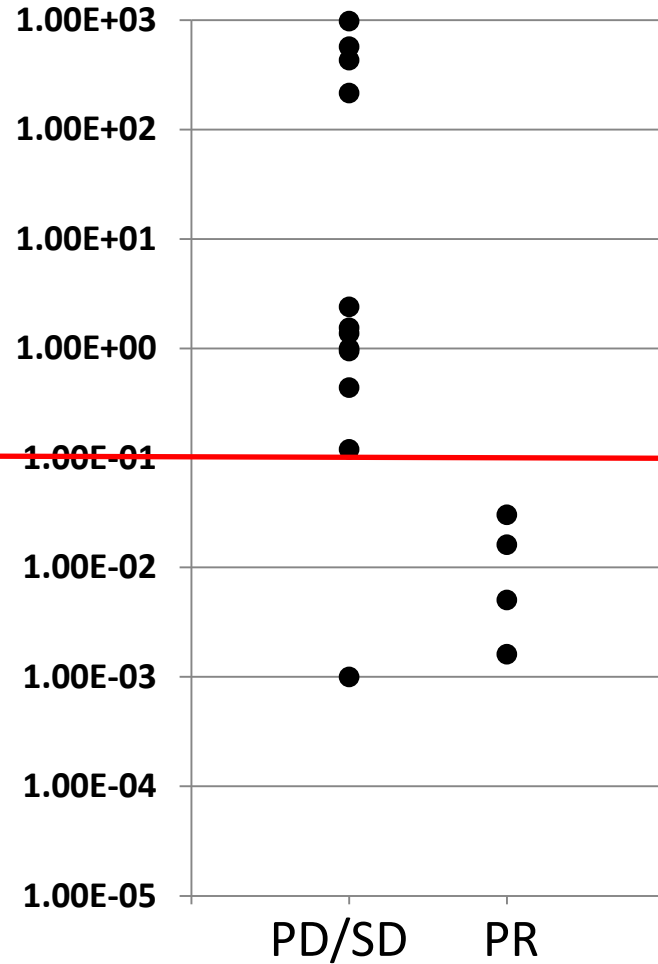
EGFR-TKI初回投与 14日  
PD後諸治療 7~98日 (中央値36日)

# 薬物療法の効果判定 ~ RECIST vs MART

## EGFR-TKI初回投与

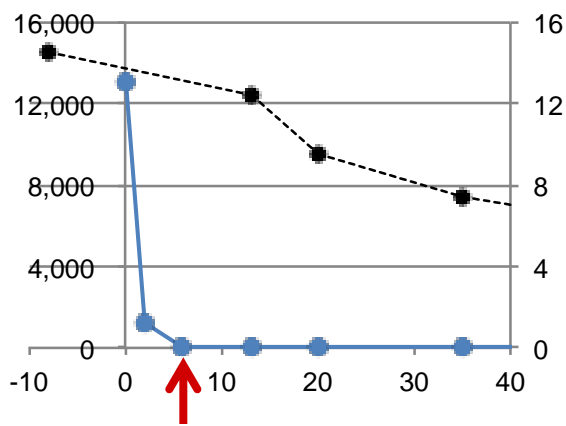


## PD後諸治療

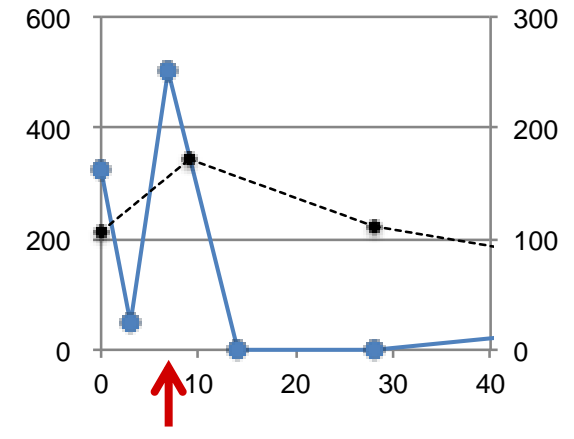
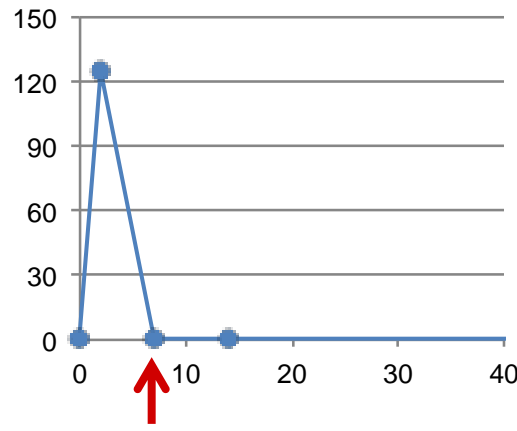
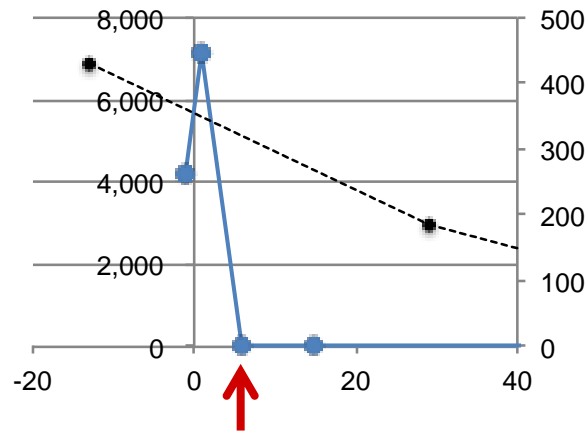
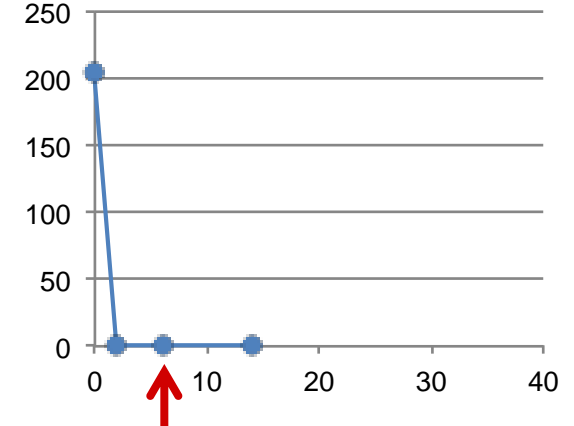
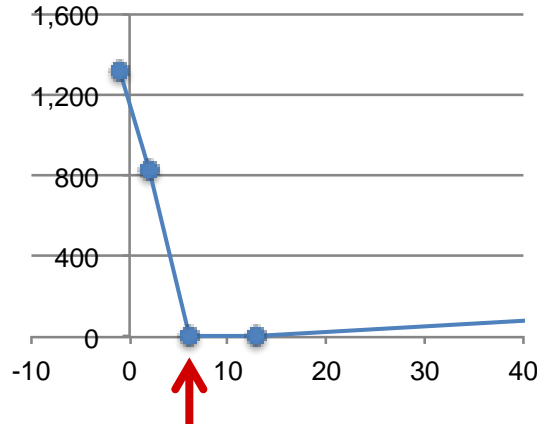


予測精度 (PD/SD vs PR)  
94.7% (95%CI, 73.5-100)

# 短期動態 ~ EGFR-TKI開始直後のctDNA動態



1 week



EGFR-TKIによる細胞破壊のため新たに放出されるctDNAがある



# ctDNA動態のデータはすべて公開

- 長期動態 後ろ向き研究
  - Uchida, J., Imamura, F., Kukita, Y., Kumagai, T., Nishino, K., Inoue, T., Kimura, M., Oba, S. and Kato, K. Dynamics of circulating tumor DNA represented by the activating and resistant mutations in epidermal growth factor receptor–tyrosine kinase inhibitor treatment. *Cancer Science*. 107 (2016) 353-358.
- 長期動態 前向き探索研究
  - Kato, K., Uchida, J., Kukita, Y., Kumagai, T., Nishino, K., Inoue, T., Kimura, M., Oba, S. and Imamura, F. Numerical indices based on circulating tumor DNA for the evaluation of therapeutic response and disease progression in lung cancer patients. *Scientific Reports*. 6 (2016) 29093.
- 短期動態 前向き探索研究
  - Kato, K., Uchida, J., Kukita, Y., Kumagai, T., Nishino, K., Inoue, T., Kimura, M. and Imamura, F. Transient appearance of circulating tumor DNA associated with de novo treatment. *Scientific Reports*. 6 (2016) 38639.

# まとめ

- 診断方法
  - 感度 65 – 75%、特異度 95 – 100% (活性化変異)
  - 次世代シーケンシングのメリット
    - ctDNAを定量できる
    - 多数の遺伝子変異部位に拡張可能
      - Exon 19 del BEAMing, ddPCR (2016 version) 4タイプ、deep sequencing 8タイプ
      - (ALK fusion, RET fusion, ALK resistant, MET準備中)
- 長期動態
  - EGFR-TKI投与開始後ctDNAは急速に消失
  - 再出現
    - 活性化変異が早期に出現する傾向、ctDNA量も多い
    - PD後100日を越えて出現する例は殆ど無い
    - PD症例中のT790M出現率 30 – 40%
    - 新規治療が奏功する場合ctDNAが消失するので注意が必要
  - ctDNAの増減は薬剤奏功性と相関

# コンパニオン診断への応用

- 第一世代EGFR-TKI（ゲフィチニブ、エルロチニブ）
  - 特異度が高い → 血液検体陽性 ≈ 生検検体陽性
  - 血漿検体第一選択というスキームが成り立つ
- 第三世代EGFR-TKI（オシメルチニブ）
  - 測定のタイミング
    - 画像診断によるPDよりも最大100日出現が遅れる可能性がある
    - 他治療の介入によりctDNA消失の可能性はある
  - 血漿T790M陽性陰性群ともにオシメルチニブ奏功例非奏功例が混在
  - 臨床試験による検証が必要
    - 相対アレル比（T790M/活性化変異）とオシメルチニブ奏功性との関連性
    - ctDNA陰性（活性化変異陰性）例のオシメルチニブ奏功性
    - （PD後のctDNA陽性率の時系列解析）

成人病センター研究所

加藤菊也

久木田洋児

佐々木志穂

京都大学情報学研究科

大羽成征

成人病センター呼吸器内科

今村文生

内田純二

熊谷融

西野和美

奥山貴子

大阪市立総合医療センター

田中晃司

駄賀晴子

大阪大学医学部附属病院

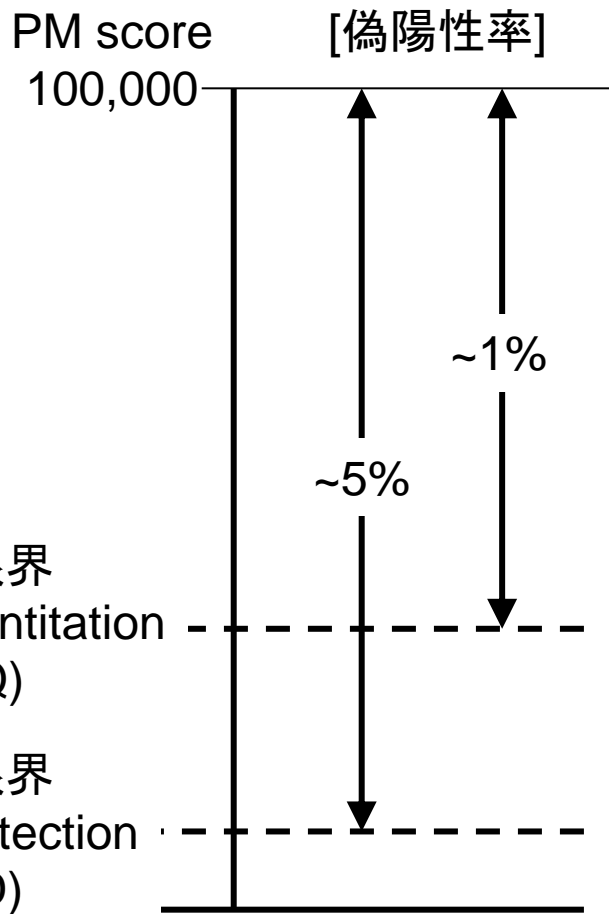
長友泉

# DIVA-EGFR

## (Digital Identification of Variant Alleles for EGFR)

- Deep sequencingによるEGFR変異検出の製品版
  - 現時点では研究用検査
- 最も検証された血中腫瘍DNA定量検出システム
  - 288症例の多施設前向き試験で検証
- 対象疾患
  - (IIIB及びIV期)非小細胞性肺癌
- 対象EGFR変異
  - エクソン19欠失、L858R、T790M
  - L861Q
  - RAF (relative allele frequency) T790M / activating mutation
  - C797Sも追加可能
- 検査結果報告
  - 2週間
  - 指定せず

# 判定基準



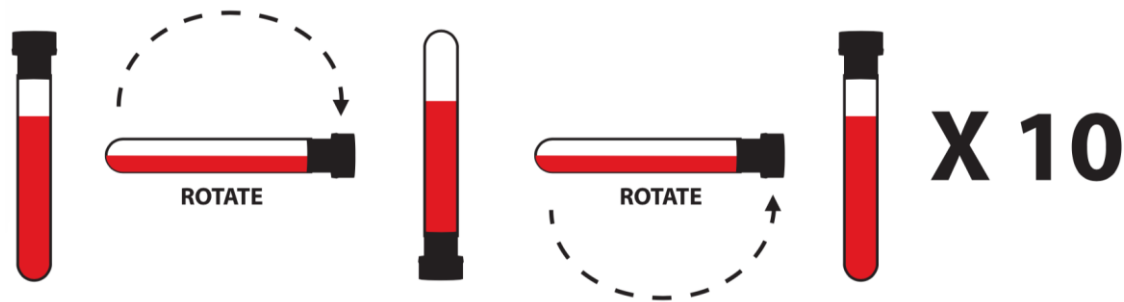
	活性化変異	T790M
$\geq \text{LOQ}$	+	+
$< \text{LOQ} \geq \text{LOD}$	±	-
$< \text{LOD}$	-	-

+: 陽性  
 ±: 陽性、通常生検試料での確認が望ましい  
 -: 陰性

[偽陽性率]: 肺生検検体の結果を真とした場合の偽陽性率

# 専用採血管キット使用上の注意

- 専用採血管（ Streck tube）
  - 細胞安定剤入り、4 – 37 °Cで安定
  - 丁寧な撹拌が必要



- EDTA採血管の後・血糖採血管の前に使用
- 検体の輸送
  - 宅急便(ゆうパック指定)常温輸送
  - 3重梱包
  - 発送確認のため依頼書をファックスで送信のこと