

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08966

研究課題名(和文) ctDNAを用いた新規大腸癌サーベイランス法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the new postoperative surveillance using ctDNA test for colorectal cancer patients

研究代表者

大塚 幸喜(Otsuka, Koki)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：50316387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原発巣変異解析後、症例特異的変異から少数変異を選定しdigital PCRを用いて大腸癌術後サーベイランスにおける血中循環腫瘍DNA(circulating tumor DNA: ctDNA)モニタリングを行った。52例中10例の再発例では画像再発診断に191日先行してctDNA上昇が見られた。CT検査を1年ごとに削減したモデルでは382回のCT検査のうち218回は再発診断に不要と考えられた。ctDNA検査は再発診断の遅延なく、CT検査数を削減できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌は近年増加傾向にある。術後サーベイランスはCT画像検査やCEAを主とした腫瘍マーカーにより行われている。CT検査の侵襲やコスト、CEA検査の再発診断精度の低さもあり、サーベイランス間隔に関しては1990年代より議論されているが、CT削減は再発発見遅延が危惧される。本研究では、画像診断より6か月早いctDNA上昇が見られることから、低侵襲なctDNA検査により再発発見遅延なくCT削減ができることを示した。本研究結果は患者負担や医療費を削減するサーベイランスにつながる可能性があり社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：This study investigated whether a digital PCR (dPCR)-based circulating tumor DNA (ctDNA) monitoring provides an alternate interval for computed tomography scanning (CTS) during postoperative surveillance of colorectal cancer (CRC). Elevated ctDNA levels were observed in nine of 10 clinical-relapse patients (11 of 13 events) with an average lead time from a ctDNA-positive time-point to the clinical relapse of 191.9 days. Given periodic CTS surveillance with ctDNA, 218 of 382 (57.1%) CTSs were presumed to be unnecessary for the clinical relapse detection and a ctDNA assay would still provide a lead time of 307 days. Our findings suggest that the ctDNA assay can extend CTS intervals for relapse diagnosis during CRC postoperative surveillance.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 術後サーベイランス 再発 CT検査 Circulating tumor DNA

1. 研究開始当初の背景

大腸癌根治切除後のサーベイランスは、再発を早期に発見し治療することで予後を改善することが目的であり、Stage III の進行大腸癌治療切除後では 30.8% に再発を認め、このうち 98% 以上が 5 年以内に再発が出現していることから本邦でのサーベイランス期間は 5 年間とされている。欧米では検査間隔をより短くした intensive なサーベイランスが良好な予後に寄与するという報告とこれを否定する報告がされてきた。これらの報告は本邦におけるサーベイランス方法と比較すると概して less intensive であり、現在本邦では CT と腫瘍マーカー (CEA, CA19-9) を用いた 3~6 か月ごとの intensive なサーベイランスが行われている。しかし、2012 年代の報告では 6 か月ごと (intensive) あるいは 12 か月と 36 か月のみ (less intensive) の CT および CEA による Stage II/III 大腸癌治療切除後のサーベイランスの比較試験で、両群で 5 年生存率、無再発生存率に差がないことが示され (Jorgenson PW, JAMA 2018)、同様に Stage I-III 大腸癌でもサーベイランスの間隔による生存率、再発発見率に差がないとの報告がされている (Synder RA, JAMA 2018)。これらは大腸癌術後サーベイランスを less intensive とすることにより患者の経済的・時間的負担を軽減すると同時に医療者側の負担も軽減することが期待されるものである一方、現行のサーベイランスで用いられる CT および腫瘍マーカー検査による再発発見のタイミングでは、再発治療の効果が乏しいことも示している。

近年、腫瘍細胞より遊離し血液中を循環する血漿中遊離 DNA (Circulating tumor DNA: ctDNA) が新規バイオマーカーとして期待されている。腫瘍細胞のみでなく正常細胞にも由来し代謝状態により発現が大きく変動する腫瘍マーカーと異なり、ctDNA の由来は癌細胞に限られ、原発巣と同じ DNA 変異を有することから症例特異的な優れたバイオマーカーとなりうる。ctDNA 解析手法は次世代シーケンサー (NGS) を用いた広範囲の遺伝子異常解析法と digital PCR (dPCR) に代表される標的変異を絞った解析法に大別され、前者はスクリーニング検査に、後者はモニタリングに優れた検査である。われわれは癌患者の症例特異的変異を対象として digital PCR (dPCR) を用いた ctDNA モニタリングシステムの開発を進めきた (文献 1 - 5)。

2. 研究の目的

さまざまな悪性腫瘍で ctDNA 解析の有望性に関する報告が多数されているが、いまだルーチンな検査にはなっていない。大腸癌術後サーベイランスにおいて、dPCR を用いた ctDNA 検査が無再発および再発を正確に評価可能であり、臨床的有用性・妥当性をもった診断モダリティとなりうるかが、本研究の学術的「問い」である。

3. 研究の方法

根治手術が施行された大腸癌 52 症例を対象とした。NGS による遺伝子パネル解析で大腸癌原発巣の変異スクリーニングを行い、症例あたり 1~5 個の症例特異的変異を選定し変異検出用 Probe/primer を作成した。術後サーベイランス期間中に採取された血液検査で dPCR を用いた ctDNA 定量解析を行った。サーベイランス期間中に行われた CT 検査回数をカウントし、全 CT 検査回数に対する再発診断につながった CT 検査の割合を検討した。CT 検査間隔を延長した推定モデルで、再発例における実際に施行されたサーベイランスよりどの程度再発発見遅延 (delay time) が生じるか計測した。また、再発診断に先行する ctDNA 上昇の期間 (leading time) も計測した。ctDNA モニタリングを施行した際の CT 削減の可能性について検討した。

4. 研究成果

1) 大腸癌術後サーベイランスと ctDNA モニタリング

観察期間中央値は 1,503 (322-1,951) 日、867 timepoint で ctDNA 定量解析をおこなった。52 症例中 10 例で再発が認められた。無再発症例、再発症例の ctDNA 推移を図 1, 図 2 に例示した。無再発例では術後 ctDNA 陰性化し、以後持続した。再発例では画像診断で再発が診断されるより早く ctDNA の上昇が見られている。

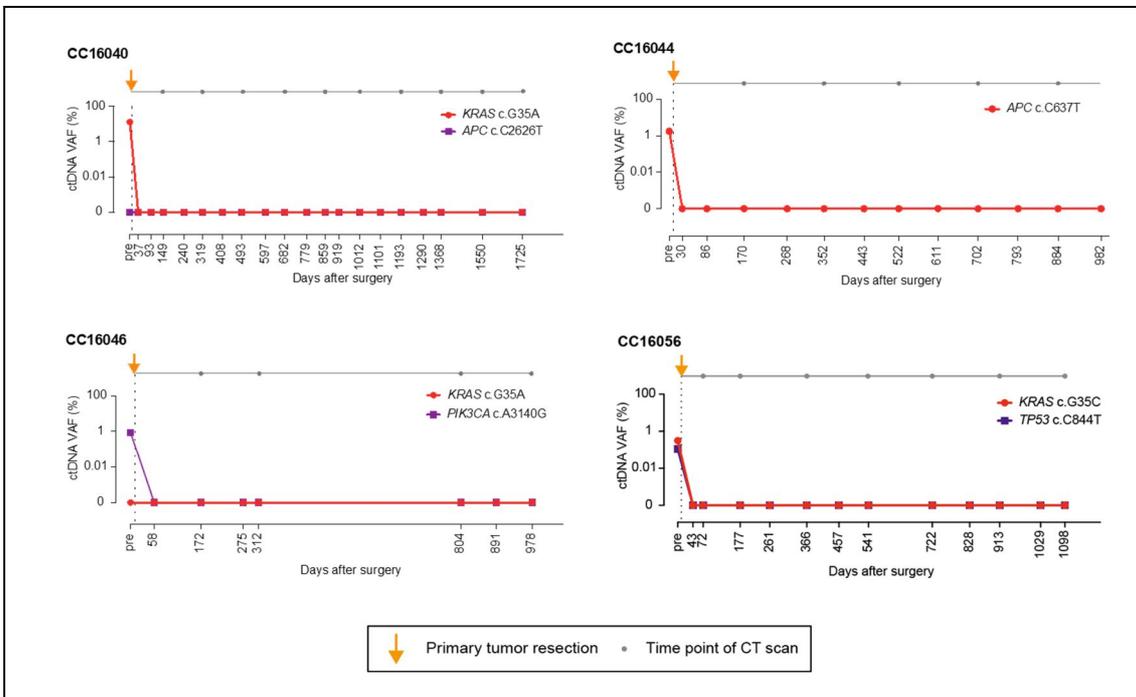


図 1 . 術後無再発症例の ctDNA モニタリング
少数の症例特異的の変異で ctDNA を追跡した。無再発症例では術直後の timepoint で ctDNA が陰性化し以後持続した。

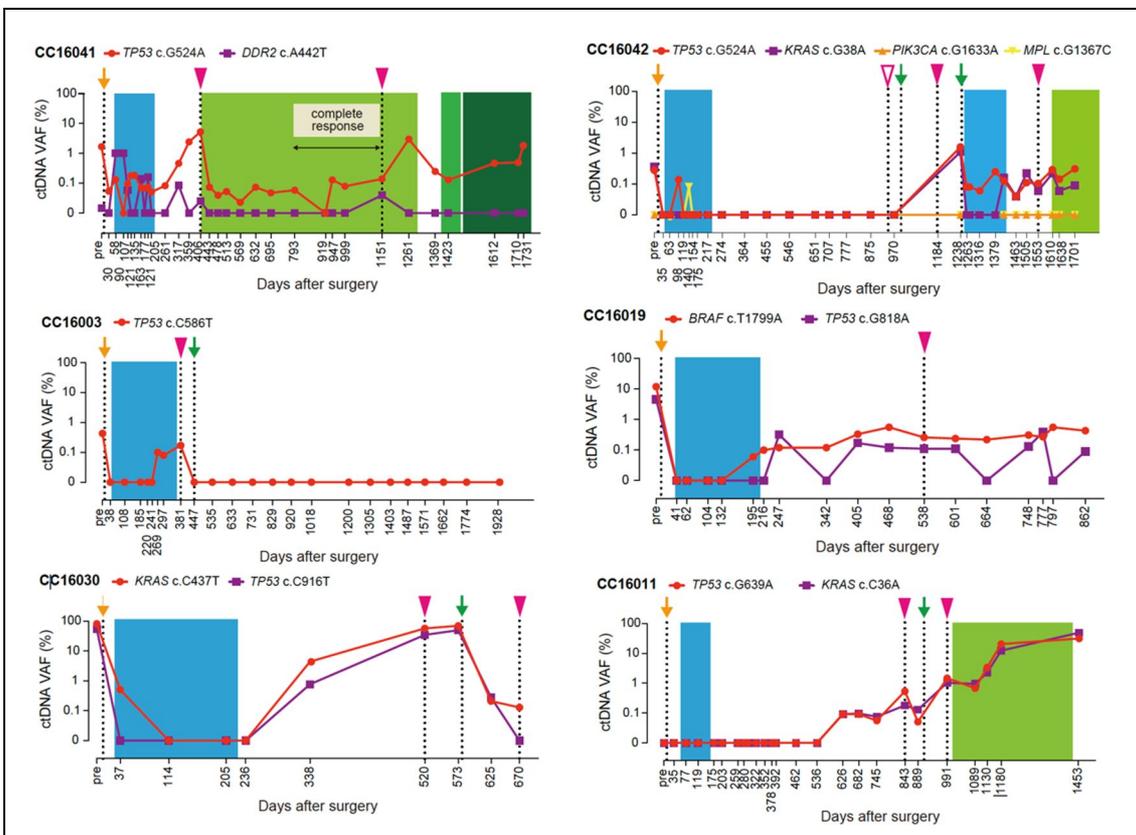


図 2 . 術後再発症例の ctDNA モニタリング
再発症例では期間中に ctDNA 上昇が見られた。術後補助化学療法が施行されている症例を例示しているが、術後化学療法中陽性持続、化学療法中あるいは終了後に陽性化など症例ごとに変動パターンは様々であった。(矢頭: 画像診断による再発診断、矢印: 原発巣、転移巣切除)

52 例の ctDNA モニタリング結果を図 3 に示した。再発例では無再発例に比し有意に ctDNA 陽性 timepoint が多かった[4.0% (27/674) vs. 59.1% (114/193), $P < 0.0001$, Fisher's exact test]。再発例では、再発画像診断に先行して ctDNA 陽性化が見られた。平均 leading time は 197.1(0-376)日であった。

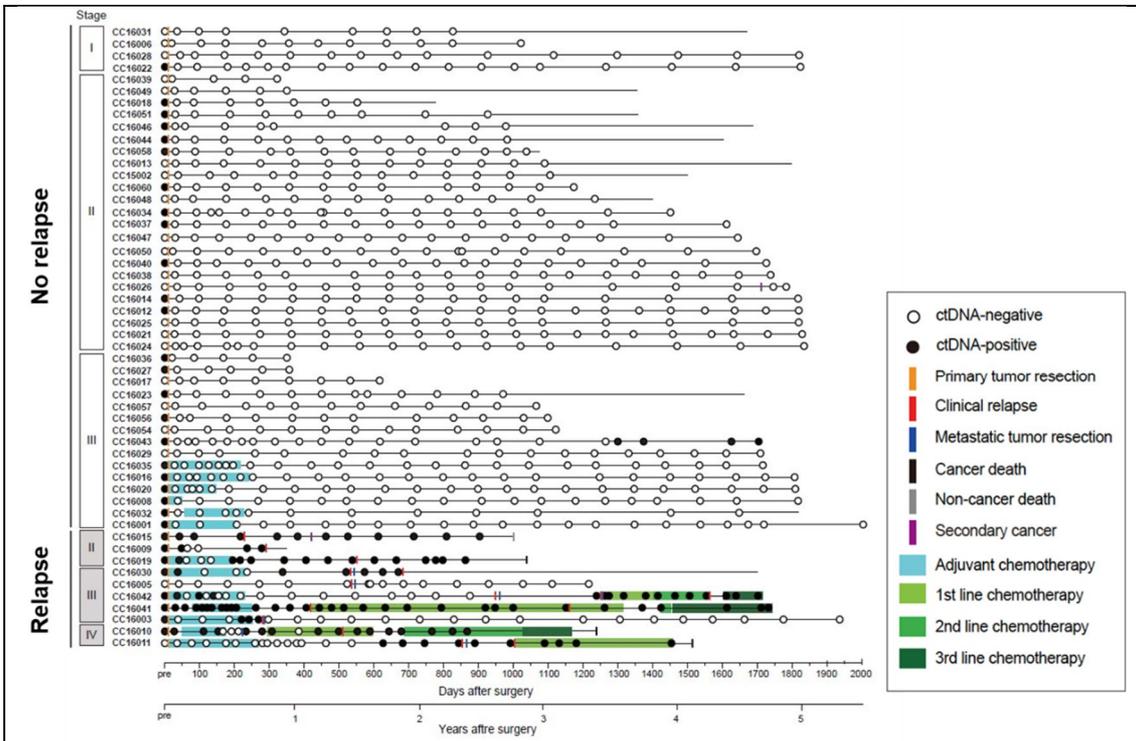


図3 . 全症例の術後サーベイランス期間における ctDNA モニタリング結果
ctDNA 陰性を○、陽性を●で示している。

2) 術後サーベイランスにおける CT 検査と ctDNA 検査

52 症例における全 CT 検査回数は 382 回で、症例当たり平均 3.3 回/年施行されていた。再発陽性診断となった CT 検査が 13 回 (3.4%) であった。CT 検査を年 1 回と仮定した CT 削減モデルでは CT 検査回数は 164 回となり、再発陽性診断 CT 検査割合は 7.9%と有意に上昇した ($P=0.03$)。一方、ctDNA 検査は期間中 815 回行われた (画像再発診断後の ctDNA 解析ポイントは除外)、ctDNA 陽性となった検査割合は 110/815 (13.5%)と再発陽性診断となった CT 検査割合より有意に高かった ($P < 0.0001$, Fisher's exact test) (図3)

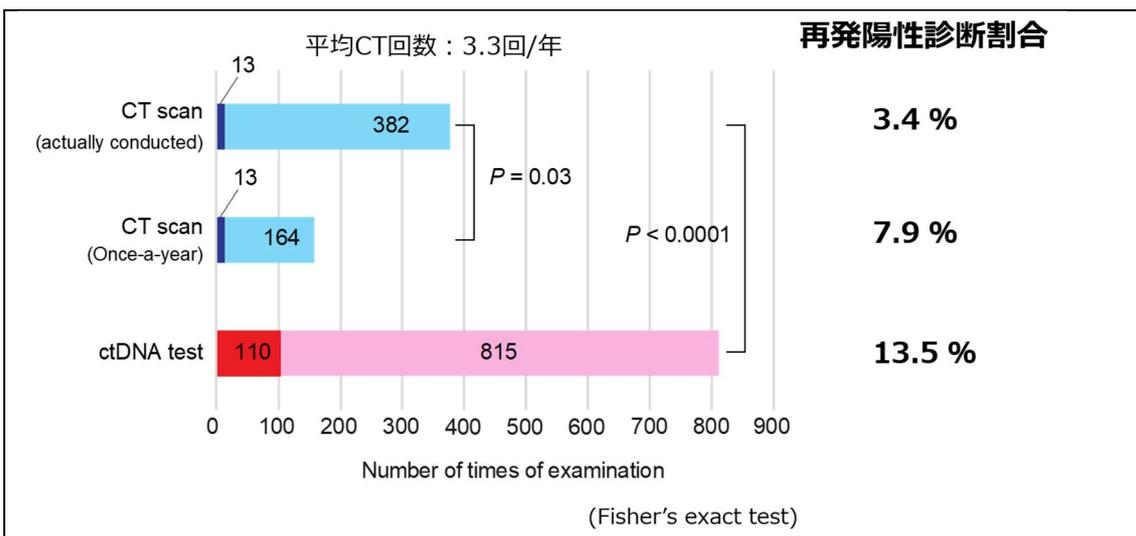


図4 . 術後サーベイランスにおける CT 検査と ctDNA 検査

実際に施行された CT 検査数および再発診断陽性割合、1 年ごとの CT 検査とする削減モデルにおける再発診断陽性割合、全 ctDNA 検査に対する ctDNA 陽性検査割合を示している。

3) CT 削減による再発発見遅延と ctDNA 陽性の leading time

再発例 10 例における、CT 検査の全 timepoint、再発診断 timepoint、1 年ごとに CT 削減した場合の timepoint、ctDNA 初回陽性 timepoint を図5に示した。CT 検査間隔を 1 年に延長した場合の再発発見までの平均 Delay time は 140.9 (0-279)日であった。再発画像診断より ctDNA 陽性化が先行する期間 leading time は平均 197.1 (0-376)日であった。CT 検査間隔によらず再発画

像診断に先行する ctDNA 陽性化が確認された。

以上より、ctDNA モニタリング検査を用いた大腸癌術後サーベイランスでは、再発発見遅延を懸念することなく CT 検査の削減が可能であり、かつ再発早期発見が可能であると考えられた。

文献

1. Iwaya T, Endo F, Takahashi F, Tokino T, Sasaki Y, Nishizuka SS. Frequent Tumor Burden Monitoring of Esophageal Squamous Cell Carcinoma With Circulating Tumor DNA Using Individually Designed Digital Polymerase Chain Reaction. *Gastroenterology*. 2021;160(1):463-465.e4.
2. Iwaya T, Nishizuka SS. Reply. *Gastroenterology*. 2021;161(1):367-368.
3. Yaegashi M, Iwaya T, Sasaki N, Fujita M, Ju Z, Siwak D, Hachiya T, Sato K, Endo F, Kimura T, Otsuka K, Sugimoto R, Sugai T, Liotta L, Lu Y, Mills GB, Nakagawa H, Nishizuka SS. Frequent post-operative monitoring of colorectal cancer using individualised ctDNA validated by multiregional molecular profiling. *Br J Cancer*. 2021;124(9):1556-1565.
4. Sasaki N, Iwaya T, Chiba T, Fujita M, Ju Z, Endo F, Yaegashi M, Hachiya T, Sugimoto R, Sugai T, Siwak DR, Liotta LA, Lu Y, Mills GB, Nakagawa H, Nishizuka SS. Analysis of mutational and proteomic heterogeneity of gastric cancer suggests an effective pipeline to monitor post-treatment tumor burden using circulating tumor DNA. *PLoS One*. 2020 Oct 7;15(10):e0239966.
5. Fujisawa R, Iwaya T, Endo F, Idogawa M, Sasaki N, Hiraki H, Tange S, Hirano T, Koizumi Y, Abe M, Takahashi T, Yaegashi M, Akiyama Y, Masuda M, Sasaki A, Takahashi F, Sasaki Y, Tokino T, Nishizuka SS. Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer. *Carcinogenesis*. 2021;42(10):1239-1249.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yaegashi Mizunori, Iwaya Takeshi, Sasaki Noriyuki, Fujita Masashi, Ju Zhenlin, Siwak Doris, Hachiya Tsuyoshi, Sato Kei, Endo Fumitaka, Kimura Toshimoto, Otsuka Koki, Sugimoto Ryo, Sugai Tamotsu, Liotta Lance, Lu Yiling, Mills Gordon B., Nakagawa Hidewaki, Nishizuka Satoshi S.	4. 巻 124
2. 論文標題 Frequent post-operative monitoring of colorectal cancer using individualised ctDNA validated by multiregional molecular profiling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1556 ~ 1565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-021-01266-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋智子、岩谷岳、八重樫瑞典、木村聡元、高清水清治、有吉 佑、藤澤良介、小泉優香、遠藤史隆、大塚幸喜、佐々木章
2. 発表標題 Circulating Tumor DNAを用いた大腸癌術後サーベイランスにおけるCT検査削減の可能性に関する研究
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚幸喜
2. 発表標題 技術認定審査のポイントと最近の傾向 -腹腔鏡下S状結腸切除-
3. 学会等名 第26回日本内視鏡外科学会教育セミナー（教育講演）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚幸喜
2. 発表標題 縫合不全ゼロを目指した腹腔鏡下低位前方切除術
3. 学会等名 第75回手術手技研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 大塚幸喜	4. 発行年 2021年
2. 出版社 秀潤社	5. 総ページ数 6
3. 書名 手術力が必ず向上する 内視鏡外科 消化器再建術のすべてIV-1結腸 体腔外吻合（FEEA吻合）	

1. 著者名 大塚幸喜	4. 発行年 2021年
2. 出版社 外科	5. 総ページ数 7
3. 書名 双孔式結腸ストーマ 造設法の定型化	

1. 著者名 大塚幸喜	4. 発行年 2021年
2. 出版社 外科	5. 総ページ数 6
3. 書名 S 状結腸下行結腸接合部（SDJ）近傍の S 状結腸癌に対する手術手技	

1. 著者名 大塚幸喜	4. 発行年 2021年
2. 出版社 臨床外科	5. 総ページ数 7
3. 書名 【Step ごとに要点解説 標準術式アトラス最新版】大腸 直腸癌 腹腔鏡下低位前方切除術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西塚 哲 (Nishizuka Satoshi) (50453311)	岩手医科大学・医歯薬総合研究所・特任教授 (31201)	
研究分担者	岩谷 岳 (Iwaya Takeshi) (70405801)	岩手医科大学・医学部・特任教授 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関