

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09055

研究課題名(和文) 分子バーコードNGSによるリキッドバイオプシー：胃癌免疫化学療法の病勢・効果予測

研究課題名(英文) Liquid biopsy using molecular barcode sequencing to predict tumor status and efficacy of immuno-chemotherapy for gastric cancer

研究代表者

黒川 幸典 (Kurokawa, Yukinori)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10470197

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)：TP53遺伝子変異の確認されている食道癌患者の血漿を用いて、分子バーコードを用いたNGS解析によってctDNAを検出可能であることを確認後、胃癌患者15例のFFPEおよび血漿検体よりDNA抽出を行い、分子バーコードNGS解析を行ったところ、同一症例におけるFFPEと血漿由来のDNAの間に共通で認めた遺伝子変異は、ARID1AとTP53の変異をそれぞれ別の1例に認めたのみであった。代わりに、胃癌患者8例の患者の血漿検体からDNAを抽出して、癌関連63遺伝子のメチル化情報をNGSで解析したところ、CpG領域の多くの部位において非癌部に比べて癌部でメチル化が亢進していることを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Circulating tumor DNA (ctDNA)は癌患者の血液中に微量に存在する腫瘍由来のDNAであり、体内腫瘍量のモニタリング法として臨床応用されつつあるが、検出感度が低いことが課題である。本研究では、分子バーコードを用いた次世代シーケンサー(NGS)を利用することでctDNAの検出感度を向上させ、臨床応用可能かどうかを検討することを目的としたが、胃癌患者における切除検体と血漿検体のDNAの間に共通で認めた遺伝子変異は想定より少なかった。今後は、epigeneticなDNAメチル化に着目することで高感度にctDNAを検出することが可能かどうかを検討予定である。

研究成果の概要(英文)：After we confirmed that molecular barcode sequencing could detect ctDNA in the plasma from esophageal cancer with somatic mutation of TP53, we analyzed ctDNA in the plasma from 15 gastric cancer patients using the same method. In result, mutations of ARID1A and TP53 were detected only one patient in each. Instead, we checked the methylation status of 63 cancer-related genes in the plasma from 8 gastric cancer patients and found that tumor had hyper methylations in most CpG sites of these genes.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：胃癌 次世代シーケンサー リキッドバイオプシー 分子バーコード 免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における胃癌の罹患率は全悪性腫瘍中 2 位といまだに高い値を推移しているが、前立腺癌に対する PSA のように特異的な腫瘍マーカーは存在しておらず、Stage IV の患者でさえ CEA, CA19-9 の検出感度は 50%以下である。また、胃癌の転移再発形式で最も多い腹膜播種は、造影 CT や MRI、PET-CT などの各種画像検査を用いても検出感度が低いため、病勢や治療効果を的確に判断することが困難である。そうした中、癌患者の末梢血中に微量に存在する腫瘍由来遊離 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) は、体内の腫瘍量と相関し、腫瘍由来の遺伝子変異を有するため、非侵襲的かつリアルタイムに測定可能なバイオマーカーとして世界中で注目されている (Diehl F, et al. Nat Med 2008)。

我々はこれまでに BEAMing 法や次世代シーケンサー (Next-generation sequencing: NGS) という手法を用いて胃癌や食道癌、GIST における ctDNA の研究を行ってきた (Hamakawa T, Kurokawa Y, et al. Br J Cancer 2015; Wada N, Kurokawa Y, et al. Oncology 2016)。しかし、BEAMing 法では特定部位の変異の検出には優れているが、胃癌のように様々な部位に変異を生じる疾患では汎用性に乏しいという問題点がある。一方、NGS を用いた方法では少数のプライマーセットで網羅的な遺伝子解析が可能となり多数の変異部位の検出が可能となるが、読み取りエラーや PCR エラーによる偽陽性が多いため検出感度が低いという問題点が分かってきた。

これらの問題点に対し、Kinde らは血漿から精製した DNA の対象遺伝子領域に分子バーコードを付加した上で PCR 増幅を行い、NGS で解析するという新しい手法を報告した (Kinde I, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。この分子バーコードを用いた NGS を用いることで読み取りエラーや PCR エラーを除去し、末梢血中に微量に存在する ctDNA を高感度かつ網羅的に解析することが可能となることから、今回この手法を用いて ctDNA 解析を行い、胃癌患者への臨床応用が可能かどうかを検討することにした。

## 2. 研究の目的

胃癌の再発形式としてもっとも多いのは腹膜播種であるが、通常の画像検査での腹膜播種検出感度は低いため、再発の診断に難渋することが多い。また、再発と診断して化学療法を行う場合においても、測定可能病変が存在しないためにその効果判定が非常に難しい。さらに、胃癌には特異的な腫瘍マーカーが存在せず、臨床の現場で現在用いられている血清腫瘍抗原 (CEA, CA19-9) などの腫瘍マーカーは感度が低いため、より実用的な効果判定マーカーの開発が切望されている。そうした中、ctDNA は体内腫瘍量のモニタリング法として理想的なマーカーと考えられ、そのツールとして NGS の臨床応用が試みられつつあるが、我々のこれまでの先行研究において検出感度が低いことが課題であった。そこで本研究では、化学療法を施行中の胃癌患者に対して、分子バーコードを用いた NGS を利用して経時的に ctDNA を測定し、通常の画像診断や血清腫瘍マーカーよりも鋭敏かつ正確に効果判定が可能かどうかを検討することを第一の目的とする。

また、Nivolumab は 2017 年 10 月に胃癌に対して保険承認となった免疫チェックポイント阻害薬であり、標準的な化学療法が不応・不耐となった場合に用いられている。Nivolumab が奏効した症例は長期間効果が持続することが多いものの、その奏効率は胃癌では約 10%と非常に低く、奏効症例を事前に予測するようなバイオマーカーの開発が胃癌に限らず様々

な癌種で盛んに試みられている。これまで、Nivolumab 治療の効果予測マーカー候補として BRCA2、ARID1A、KRAS、PIK3CA などの遺伝子変異が他癌種で報告されているが(Hugo, et al. Cell 2016; Kim S, et al. Nat Med 2018; Miao D, et al. Nat Genet 2018)、胃癌においてはほとんど報告がないのが現状である。そこで本研究では、胃癌に対して Nivolumab 治療開始前の血液サンプルから分子バーコードを用いた NGS で ctDNA を検出し、特定の遺伝子変異あるいは総変異量(tumor mutational burden: TMB)が Nivolumab 治療の効果を予測するバイオマーカーとなり得るかどうかを検討することを第二の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) 分子バーコードを用いた NGS の予備実験 (基盤研究 C 17K10586 からの引き継ぎ)

まず、すでに切除標本において TP53 遺伝子変異の確認されている進行再発食道癌患者の血漿を用いて、分子バーコード NGS によって ctDNA を検出可能かどうか検討する。シーケンスは Ion Torrent Proton sequencer を用いて行い、得られたデータは Torrent Suite を用いて変換した。同じバーコードでタグ付けされた read はグループ化し、エラーと考えられるものは除外した。COSMIC ver.78 によるフィルタリングを行い、これらにない variant は除外する。

#### 2) 化学療法開始前の胃癌患者末梢血を用いて ctDNA 解析を行う

次に、胃癌患者に対する化学療法(Nivolumab 治療を含む)前に採取した血漿を使って、分子バーコードを用いた NGS による ctDNA 解析を行い、検出された遺伝子変異の種類と variant allele frequency を調べる。なお、ctDNA 解析に用いる遺伝子パネルには、既存の論文やデータベース、当科における胃癌組織の NGS による解析結果から、胃癌に高頻度に変異が認められる 20 個の癌関連遺伝子を使用する。この中には先述の Nivolumab の効果予測マーカー候補となる BRCA2、ARID1A、KRAS、PIK3CA などは全て含まれている。

#### 3) ctDNA の VAF の変動と免疫化学療法の効果との相関を調べる

化学療法や Nivolumab 治療中は 2 ヶ月毎に血液サンプルを採取し、ctDNA の variant allele frequency (VAF) の変動と治療効果との相関を調べる。また、術前化学療法を行った胃癌患者に対しては、切除標本における組織学的効果や CT・内視鏡画像における臨床的效果との相関を調べ、臨床応用の可能性について検討する。

### 4. 研究成果

#### 1) 進行再発食道癌患者の血漿中の ctDNA

当科において外科的切除を行った食道癌患者の術後および再発後の血液より DNA を抽出し、分子バーコードを用いた NGS による TP53 遺伝子解析を行い、ctDNA の推移と腫瘍病勢との関連性について検討したところ、再発後血液に加え(VAF=4.75%)、術後の血液からも標的遺伝子変異が検出可能であった(VAF=0.20%)。既存の腫瘍マーカーである、SCC や抗 p53 抗体も同時点では有意な上昇は認めず、分子バーコードを用いた NGS による ctDNA 解析は、鋭敏かつ正確に化学療法や Nivolumab 治療の効果を判定できる可能性が示唆された。

#### 2) 進行再発胃癌患者の血漿中の ctDNA

当科において外科的切除を行った胃癌患者 15 症例に対して、FFPE および血漿検体より

DNA mini kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出を行い、分子バーコードを用いた NGS 解析に提出した。シーケンス解析においては、VAF が 1%以上であり、COSMIC データベースで報告のある変異を抽出し、生殖細胞系バリエーションの除外目的に ToMMo のデータベースで 5%以上の変異を認めたものを除外した。その結果、同一症例における FFPE と血漿由来の DNA の間に共通で認めた遺伝子変異は、ARID1A と TP53 の変異をそれぞれ別の 1 症例に認めたのみであり、想定より少ない数であった。胃癌のように特定の遺伝子変異頻度が低い癌腫に対して臨床応用を考える上では、分子バーコードを用いた NGS を用いても ctDNA の検出感度の改善はあまり期待できず、変異以外の情報を元に ctDNA を検出する必要があると考えられた。

### 3) 進行再発胃癌患者の血漿中の ctDNA

そこで、新しい ctDNA 検出法として epigenetic な遺伝子発現調節機構である DNA のメチル化に着目した。切除不能進行・再発胃癌に対して全身化学療法を施行した 8 例の患者の末梢血から cfDNA を抽出し、癌関連 63 遺伝子のメチル化情報を NGS で解析した (図 A)。メチル化率の高かった遺伝子の一部については、同一症例の胃癌切除標本の癌部と非癌部からそれぞれ DNA を抽出し、CpG 領域の転写開始部位 (TSS) からの距離別にメチル化率を調べたところ、CpG 領域のほとんどの部位において非癌部に比べて癌部でメチル化が亢進していることを確認できた (図 B)。今後は解析症例数を増やし、血中メチル化 ctDNA を検出することで胃癌の病勢や治療効果を高感度に判定できるかどうかを調べる予定である (基盤研究 C 23K08169 へ引き継ぎ)。

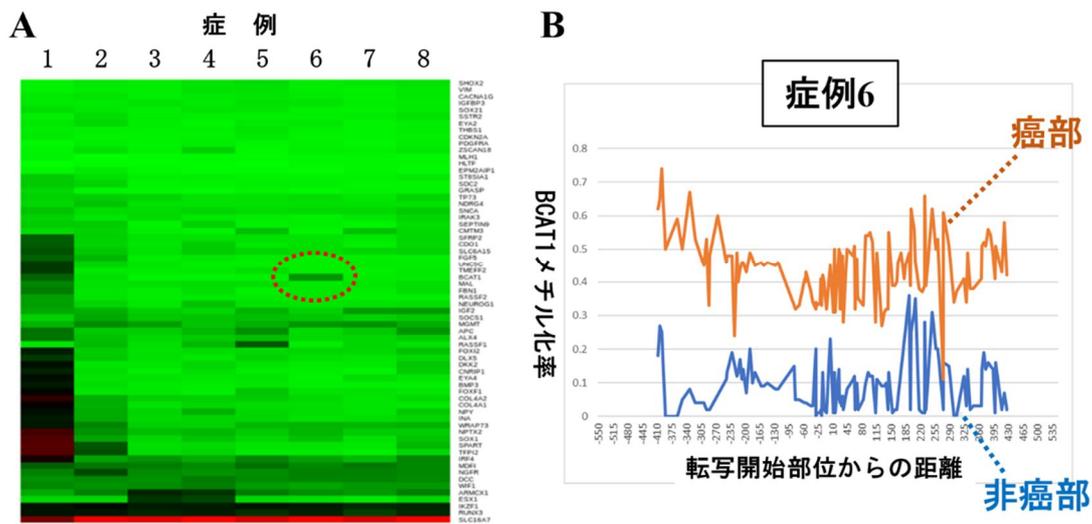


図 A : 胃癌 8 症例の血漿サンプルにおける 63 遺伝子のメチル化率を示した heat map  
 点線部で囲んでいるのが、症例 6 の血漿でメチル化率の高かった BCAT1 遺伝子  
 図 B : 症例 6 の切除標本の癌部と非癌部における BCAT1 遺伝子のメチル化率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒川幸典、萩隆臣、高橋剛、田中晃司、山下公太郎、西塔拓郎、山本和義、牧野知紀、江口英利、土岐祐一郎
2. 発表標題 食道扁平上皮癌患者における分子バーコードを用いた次世代シーケンサーによる腫瘍由来血中DNAの検出
3. 学会等名 日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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	小林 登  (Kobayashi Noboru)  (60835239)	大阪大学・医学部附属病院・医員    (14401)	削除：2021年6月4日

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
---------	---------