

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09064

研究課題名（和文）消化器癌における症例特異的変異を用いたctDNAモニタリングの臨床的意義の検討

研究課題名（英文）Analysis of clinical validity of ctDNA monitoring for gastrointestinal cancer

研究代表者

岩谷 岳（Iwaya, Takeshi）

岩手医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：70405801

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：血中循環腫瘍DNA（circulating tumor DNA: ctDNA）モニタリングのがん診療における臨床的意義を検討した。食道癌、胃癌、大腸癌の原発巣の遺伝子パネル検査で検出された症例特異的変異のうち症例ごとに少数を選定し、digital PCR（dPCR）でctDNAモニタリングを行った。食道癌の91%、大腸癌の85%、胃癌の33%の症例で、早期再発予測、無再発確証、正確な治療効果判定におけるctDNA検査の臨床的妥当性を示した。本検査システムは、治療効果判定、効果予測、治療後のサーベイランスなど癌患者の日常診療における方針決定の診断ツールとして役立つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん遺伝子パネル検査が保険適応となり広く施行されるようになったが、検査結果からの治療到達率は低い。また高度進行癌症例が対象であり、遺伝子異常に対応する推奨治療が見つかってもわずかな期間の延命にしかつながない場合が多い。多くのがんで術後補助療法の有効性が示されているように、癌細胞量が微量であれば治療により治癒する可能性が上昇する。ctDNAは体内の腫瘍細胞量を反映するが、再発画像診断に約6か月先行して陽性化する。われわれが開発したctDNA検査システムは安価にくり返し検査が可能あり、個別化高感度腫瘍マーカーとして早期治療介入を可能とし、患者予後を改善すると期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether frequent tumor burden monitoring of circulating tumor DNA (ctDNA) provided clinically useful information for gastrointestinal cancer patients. Individual tumor-specific mutations detected by a panel sequencing of primary tumors were quantified as ctDNA using digital PCR (dPCR). The clinical validities of ctDNA monitoring in terms of early relapse prediction, treatment efficacy evaluation, and relapse-free corroboration have been confirmed in 91%, 85%, 33% in esophageal, colorectal, and gastric cancer patients, respectively. Multiregional sequence in gastric and colorectal cancer revealed that genetic heterogeneity in primary tumor had little effect in ctDNA monitoring by dPCR using clonal mutations. In daily practice, our personalized affordable dPCR method may be helpful in various insights for cancer patients.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：消化器癌 circulating tumor DNA 遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子パネル検査が薬事承認および保険収載を受け、「がんゲノム医療」が国民皆保険のもとで施行可能となった。日常臨床では変異状況に応じた臓器横断的な薬物療法によりこれまで治療手段のなかった症例に劇的な効果が得られた報告も多数されているが、今後膨大な臨床情報とゲノム情報の統合により、疾患の原因解明による新たな診断、防、創薬の創出が期待される。しかし、実際に遺伝子パネル検査から治療薬投与に行われた症例は 10-15%程との報告も多く、高額な検査にもかかわらずほとんどの症例で有用な情報は得られていない。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る。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り、目的に応じた ctDNA 解析法の使い分けが重要と考えられる。われわれは、原発巣組織の NGS による変異スクリーニングを行い、検出された症例特異的変異に対しそれぞれ変異検出 Probe を作成し、dPCR により少数変異を標的として ctDNA をモニタリングするシステムを構築している。本研究では、症例特異的変異の dPCR-ctDNA モニタリングのルーチン検査としての臨床的意義を明らかにし、がんゲノム医療における介入方法について検討した。

2. 研究の目的

本研究では消化管癌(食道癌、大腸癌、胃癌)を対象とし、先行研究で確立したシステムにしたがい、原発巣で検出された疾患特異的変異に対し dPCR probe/primer を作成し、治療経過中および follow up 期間中の ctDNA モニタリングを行い、臨床的妥当性の評価を行った。

3. 研究の方法

食道癌、大腸癌、胃癌患者の原発巣組織における NGS を用いた遺伝子パネル検査を行った。検出された症例特異的変異より 1~5 個を選定し変異検出用の dPCR primer/probe をデザイン・合成した。診療経過中に経時的に採取した血液検体の ctDNA 定量モニタリング解析を行い、画像診断および既存の腫瘍マーカーによる診療経過中の病勢評価について比較検討した。

4. 研究成果

1) 食道癌の ctDNA モニタリング検査の妥当性

食道癌 36 例では、食道扁平上皮癌で変異頻度の高い 31 遺伝子を対象とした SCC パネルを用いて原発巣変異スクリーニングを行った。221 変異(1腫瘍あたり 6.3 変異)が検出され、1 症例 1~3 個の症例特異的変異について dPCR による ctDNA 解析を行った。食道癌では、91%の症例で ctDNA モニタリング検査は「再発早期発見」、「無再発状態の確証」、「正確な治療効果判定」に妥当性を有することを明らかにした(図 1)(文献 1, 2)。

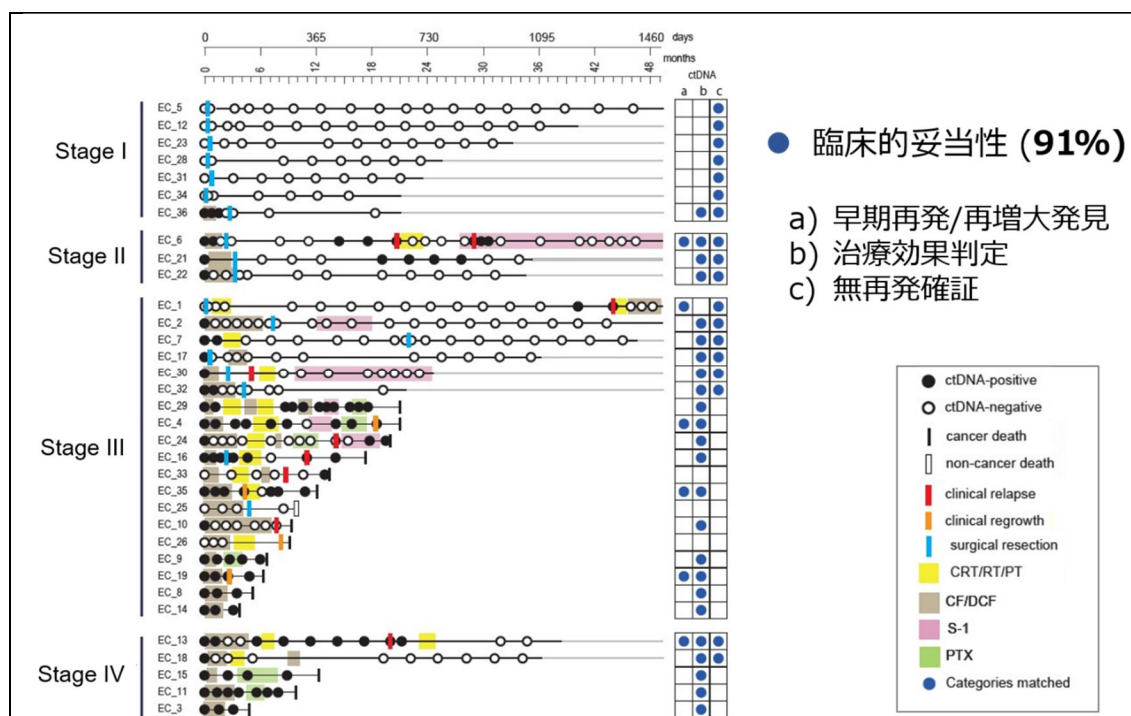


図 1 . 食道癌患者における ctDNA 検査の臨床的妥当性
進行癌では ctDNA 陽性率が高いが、治療奏効例では ctDNA 減少・陰性化が見られ、不応例では陽性が持続した。また、再発・再増大に先行して ctDNA 陽性化が見られた。ctDNA 陰性持続は無再発状態を画像

診断よりも強く示唆する所見であった。

2) 胃癌・大腸癌における原発巣遺伝的不均一性と ctDNA

胃癌 10 例、大腸癌 12 例 14 腫瘍では、原発巣 3 力所より組織を採取し、それぞれについて 151 遺伝子を標的とした汎がんパネル (ClearSeq SS パネル) を用いて変異解析を施行した。原発巣 3 部位で共通する変異 (Founder 変異) は非共通変異 (Non-founder 変異) に比し、変異アリル頻度 (Variant allele frequency: VAF) が有意に高値を示した。Founder 変異、Non-founder 変異を含め症例特異的変異を複数選択し、変異検出用 primer/probe を合成し血漿 DNA サンプルで dPCR を用いた ctDNA 定量解析を行った。いずれの症例でも Founder 変異の ctDNA-VAF は Non-founder 変異に比べ高値を示し、原発巣の VFA が高い変異は Non-founder 変異でも ctDNA 検出が可能であった (図 2)。この結果は胃癌でも同様であり、原発巣遺伝子解析で高い VAF を示す変異は腫瘍内で共通する clonal な変異であり、ctDNA 検出率が高いことが示された。ctDNA モニタリングの臨床的妥当性は大腸癌で 85% の症例で確認されたが、胃癌では 33% の症例にとどまった (文献 3, 4)。胃癌症例の検討では、間質性分が多く腫瘍細胞量の少ないスキルス胃癌や血流中への ctDNA の放出の少ない腹膜播種症例が含まれていたことも要因と考えられた。現在、症例を増やし検討中である。

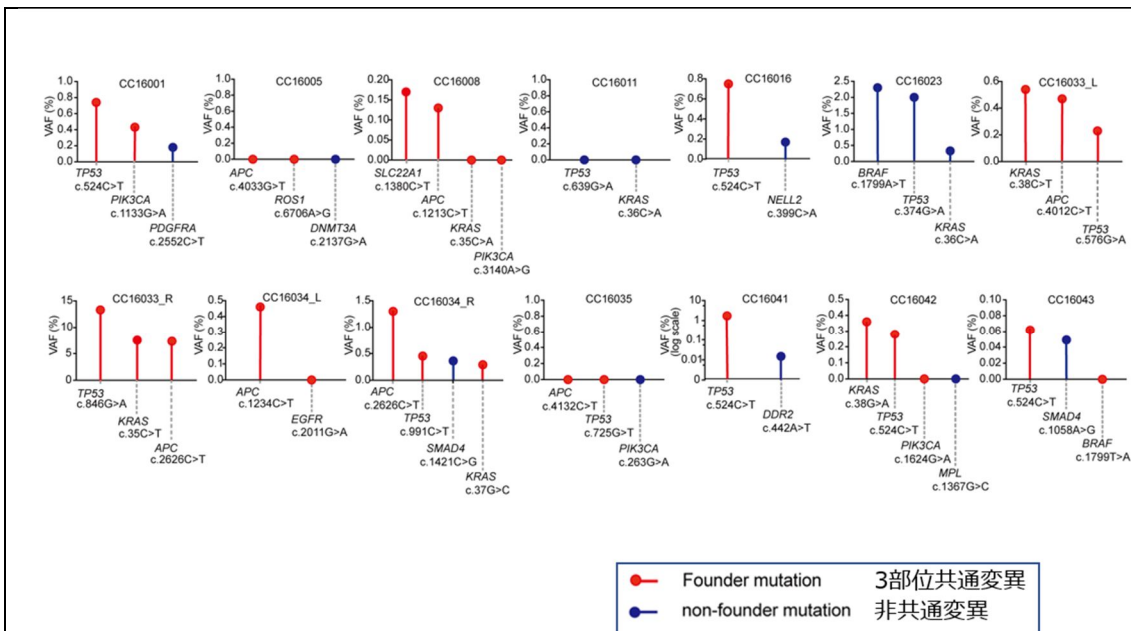


図 2 . 大腸癌原発巣 heterogeneity と治療前 ctDNA

原発巣 3 部位で共通する Founder 変異は Non-founder 変異に比べ ctDNA 陽性率が高かった。

3) 食道癌化学療法における早期 ctDNA 変動による治療効果予測

初回治療として化学療法を施行した進行食道癌症例 38 例を対象として、化学療法 1 サイクル前後の ctDNA 変動割合と治療効果を比較した。治療前に対する 1 サイクル施行後の ctDNA の割合 post/pre-ctDNA が治療変更時点での客観的奏効をどの程度予測可能か ROC 解析を用いて評価した。本研究では CT 画像で原発巣も含めた長径 1cm 以上の病変すべてをそれぞれ楕円体として腫瘍総体積を近似計算し、治療前と治療変更時点の腫瘍体積を比較し 50% 以上減量を客観的奏効あり、50% まで減量がえられないものを奏効なしと定義した。post/pre-ctDNA の治療変更時点での診断能は Area under the curve (AUC): 0.88 と高かった。また cutoff 値は 0.13 であった。post/pre-ctDNA : 0.13 未満の症例は 0.13 以上の症例に比し、有意に奏効期間が長く、良好な予後を示した (HR: 0.40, p=0.031) (図 3)。この結果から、化学療法 1 サイクル後に ctDNA が治療前の 10% 程度まで低下する症例は化学療法の効果が期待され継続が推奨される一方で、ctDNA の減少程度が少ない症例では治療継続しても効果は乏しく、早期治療変更が望ましいことが示唆された (文献 5)。

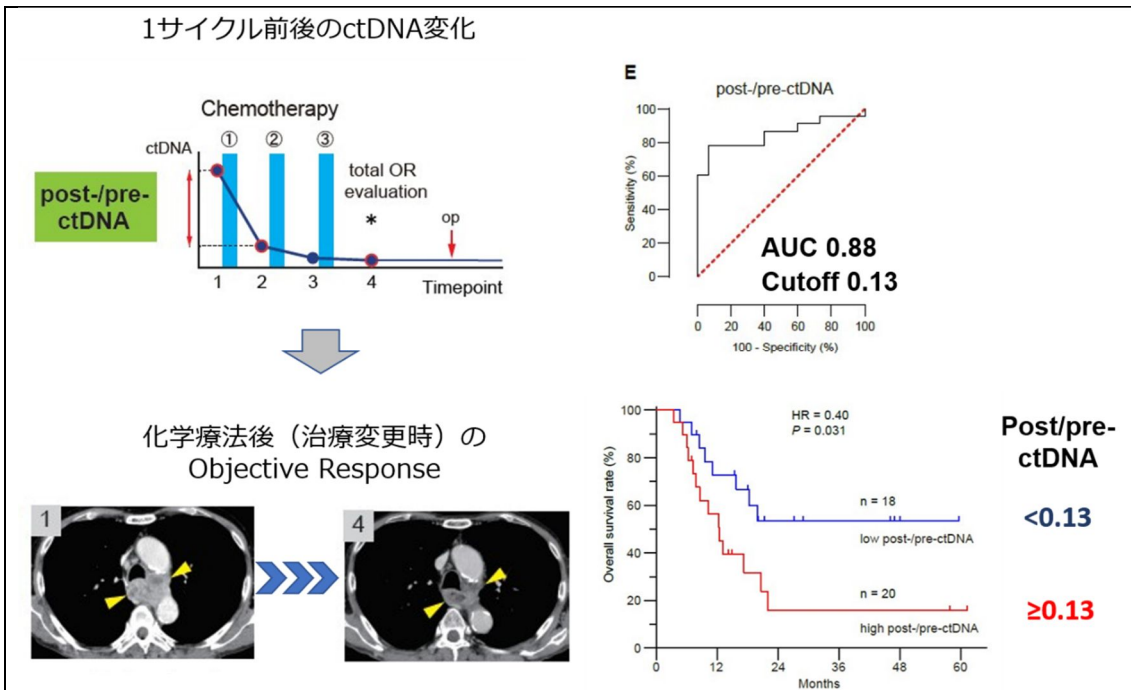


図3．食道癌症例における早期 ctDNA 変化と化学療法効果予測
 治療前に対する1サイクル施行後の ctDNA の割合 post/pre-ctDNA の治療変更時点での奏効予測を評価した。効果予測能は AUC 0.88, cutoff: 0.13 であった。post/pre-ctDNA<0.13 症例は有意に予後良好であった。

4) 大腸癌術後サーベイランスと ctDNA モニタリング

各癌の dPCR を用いた ctDNA モニタリング研究で「早期再発発見」と「無再発確証」に臨床的妥当性が示されている。dPCR による ctDNA 検査は対象とする変異を少数に限定するため、NGS 検査と比較して安価であり多数の患者でくり返し検査が可能である、また変異アリルの検出感度が10~100倍程度と高感度であることから、より微量の癌細胞の検出が可能である。これらの利点はがんの術後サーベイランスに最も適していると考えられる。

52例の大腸癌症例で術後サーベイランス期間における dPCR-ctDNA モニタリングの有効性を評価した。無再発症例42例では術後 ctDNA が陰性化し以後持続した。再発10例では ctDNA 陽性 timepoint は無再発例に比べ有意に多かった。また、画像での再発診断に約6か月先行して ctDNA が上昇することが示された。ctDNA モニタリングは再発早期発見により早期治療介入やサーベイランスにおける CT 検査の削減を可能にすることが示唆された。

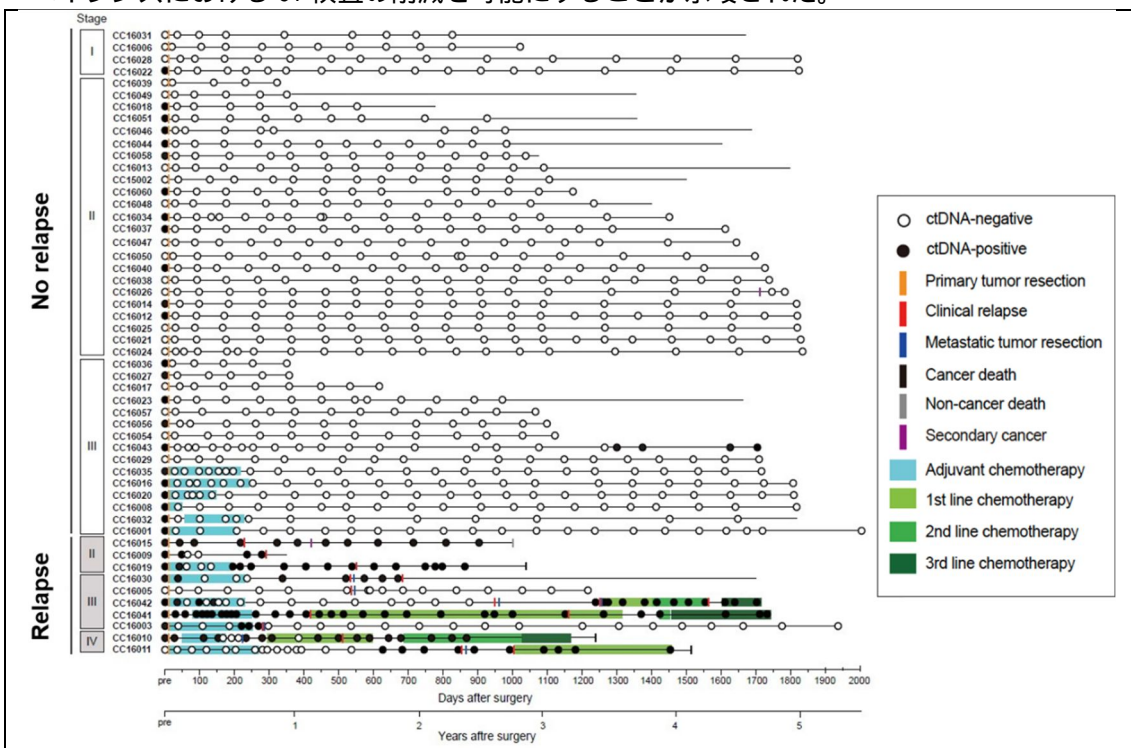


図4 . 大腸癌術後患者における ctDNA モニタリング
再発 42 例では術後 ctDNA 陰性で長期間推移し、陽性例では ctDNA 陽性 timepoint が多い。画像での再発診断に先行して ctDNA の陽性化が見られる。

以上より、dPCR を用いた ctDNA モニタリングはがん診療において有用性が高いことが示された。現在、当施設では本システムを用いた ctDNA 検査を自由診療で実施できる体制を整備済みである。今後も多種のがんにおける有用性を発信していきたい。

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5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Takahashi Fumiaki, Tokino Takashi, Sasaki Yasushi, Nishizuka Satoshi S.	4. 巻 160
2. 論文標題 Frequent Tumor Burden Monitoring of Esophageal Squamous Cell Carcinoma With Circulating Tumor DNA Using Individually Designed Digital Polymerase Chain Reaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 463 ~ 465.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.09.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
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
1. 著者名 Iwaya Takeshi, Nishizuka Satoshi S.	4. 巻 161
2. 論文標題 Reply	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 367 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.03.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujisawa Ryosuke, Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Idogawa Masashi, Sasaki Noriyuki, Hiraki Hayato, Tange Shoichiro, Hirano Tomomi, Koizumi Yuka, Abe Masakazu, Takahashi Tomoko, Yaegashi Mizunori, Akiyama Yuji, Masuda Mari, Sasaki Akira, Takahashi Fumiaki, Sasaki Yasushi, Tokino Takashi, Nishizuka Satoshi S.	4. 巻 42
2. 論文標題 Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgab088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Noriyuki, Iwaya Takeshi, Chiba Takehiro, Fujita Masashi, Ju Zhenlin, Endo Fumitaka, Yaegashi Mizunori, Hachiya Tsuyoshi, Sugimoto Ryo, Sugai Tamotsu, Siwak Doris R., Liotta Lance A., Lu Yiling, Mills Gordon B., Nakagawa Hidewaki, Nishizuka Satoshi S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Analysis of mutational and proteomic heterogeneity of gastric cancer suggests an effective pipeline to monitor post-treatment tumor burden using circulating tumor DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0239966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0239966	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩谷 岳
2. 発表標題 消化器癌のLiquid biopsyの進歩 「デジタルPCRを用いた消化器癌のctDNAモニタリング」
3. 学会等名 第6回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Iwaya, Satoshi S. Nishizuka
2. 発表標題 Intensive disease monitoring with circulating tumor DNA using digital PCR in patients with esophageal cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

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 第122回日本外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩谷 岳、遠藤 史隆、藤澤 良介、佐々木 教之、二階 春香、馬場 誠朗、秋山 有史、佐々木 章、西塚 哲
2. 発表標題 原発巣変異およびctDNA治療後早期変動による 食道癌化学療法効果予測
3. 学会等名 第74回日本食道学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩谷 岳、遠藤 史隆、八重樫 瑞典、佐々木 教之、藤澤 良介、二階 春香、馬場 誠朗、秋山 有史、佐々木 章、西塚 哲
2. 発表標題 がんゲノム情報を用いた食道癌治療の最適化
3. 学会等名 第120回日本外科学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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