

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17764

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる外科切除症例におけるctDNAの再発予測因子としての意義

研究課題名(英文)The Significance of ctDNA as a Predictor of Recurrence in Surgical Resection Cases Using Next-Generation Sequencing

研究代表者

小原 秀太(Ohara, Shuta)

近畿大学・大学病院・助教

研究者番号：20813926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCAPP-SeqとSignateraを用いて術後の予後予測やctDNAの状態と画像検査における再発の関係を評価した。

術後すぐの解析(術後中央値9日、範囲2-53日)では5人の患者がctDNA陽性となり全例が再発し、ctDNA陽性は有意に予後不良であった。さらに経過観察中に5人の患者がctDNA陽性となり全例が再発した。また経過観察中に1回でもctDNAが検出されると、有意に予後不良であった。ctDNA陽性の画像検査に対するリードタイム中央値は2.8(0-12.8)カ月であった。ctDNA陰性は予後良好な転帰と関連しており、長期の陰性適中率は83.3%(30/36人)であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍残存病変を検出するためのcirculating tumor DNA(ctDNA)のモニタリングは、様々ながん種において再発予測や薬物療法の個別化などの面でその有用性が示されている。しかし、非小細胞肺癌におけるその有効性については、十分なデータはない。本研究ではCAPP-SeqやSignateraを用いて術後の予後予測やctDNAの状態と画像検査における再発の関係を評価し、術後の採血ポイントを術後早期だけでなく、6か月毎におこなうことで、術後の予後予測だけでなく、術後再発の早期発見にctDNA解析が有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used CAPP-Seq and Signatera to evaluate the relationship between postoperative prognostic and ctDNA status and recurrence on imaging studies.

In a landmark analysis (median 9 days postoperatively, range 2-53 days), 5 patients tested positive for ctDNA and all recurred, with ctDNA positivity associated with a significantly worse prognosis. Five more patients tested positive for ctDNA during follow-up, and all relapsed. The prognosis was significantly worse if ctDNA was detected at least once during follow-up. Overall, the median lead time for ctDNA-positive imaging was 2.8 (0-12.8) months. ctDNA negativity was associated with a favorable outcome, with a long-term negative predictive value of 83.3% (30/36 patients).

研究分野：Thoracic surgery

キーワード：circulating tumor DNA liquid biopsy recurrence surgery lung cancer Signatera CAPP-Seq NSCLC

1. 研究開始当初の背景

手術可能な肺癌患者は最も治癒の可能性が高いにも関わらず、その治療成績は満足できるものではない。これは臨床的に検出できない微小な残存病巣が存在しているにも関わらず、それに対して有効な治療が行われていないことに起因する。この予後を改善するために周術期の化学療法が試みられてきた。『手術単独』と『手術と術後補助化学療法』の5つの比較試験を統合解析したLACEメタアナリシス(図1, Pignon et al., JCO, 2008)によるとシスプラチンベースの術後化学療法を行った場合の五年生存率の改善効果はわずか5.4%に過ぎない[1]。

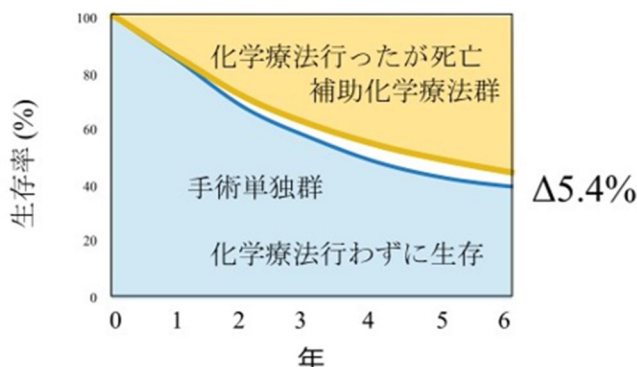


図1, 手術単独群と補助化学療法群を比べた無再発生存曲線
Pignon et al., JCO., 2008より引用 改変

このため、より治療効果が高い周術期治療の開発に向けて、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤を用いた臨床試験も多数行われた。EGFR 変異陽性非小細胞肺癌(病理病期 IB-III A 期)に対するオシメルチニブを用いた術後補助療法(ADAURA 試験)[2]、アテゾリズマブを用いた術後補助療法(Impower 010 試験)[3]では、これらの新規薬剤を用いることで対照群を有意に上回る無再発生存期間が示されたものの、有害事象や費用の面からも、より再発リスクの高い患者に絞り込んで治療をおこなうことが理想である。本研究は、手術可能な肺癌患者において、循環血漿中の DNA の癌関連遺伝子異常を検出することが微小残存病巣の指標となるかについて検討することを目的に計画した。

2. 研究の目的

切除可能臨床病期 II 期以上の肺癌患者を対象として、血漿中の腫瘍由来の可溶性 DNA (circulating tumor DNA、以下 ctDNA) が微小遠隔転移の存在、すなわち術後再発や予後の指標として臨床的有用であるかについて検討する。本研究の結果をもとに ctDNA をバイオマーカーとして用いた周術期の治療戦略を立案することを目的とした。

3. 研究の方法

2018 年 1 月から 2020 年 6 月までに近畿大学病院で治療を受けた臨床病期 II-III 期の非小細胞肺癌患者を対象とした。術前 1~2 日前、術後 1 週間以内、6、12、18、24 ヶ月後に血液の採取を行った。1 週間以内に 1600xg で 10~15 分間行い遠心分離し、血漿(各々を -80 度で保存した)。また、手術検体、正常肺検体も手術当日に採取し -80 度で保存した。まず初めにパイロットスタディとして 197 遺伝子の変異を検出可能な Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq) を用いて ctDNA の検出を試みた。続いて Natera 社の Signatera (全エクソーム解析をし腫瘍検体から正常組織検体を引いて残った遺伝子変異から 16 個選び、患者オリジナルのリキッドバイオプシー遺伝子パネルを作成する)を用いた検討も実施中である。

4. 研究成果

(1) CAPP-Seq を用いたパイロットスタディ

2018 年 1 月から 2019 年 5 月に、当院で外科的切除を施行した臨床病期 IIA-III A 期の原発性肺癌 20 例を対象としたパイロットスタディを行った。CAPP-Seq を用いて術前および術後の ctDNA を解析し、検出された遺伝子異常のうち cosmic データベースにて肺癌で報告されているものを ctDNA と定義した。術前 ctDNA 陽性例は 8 例(40%)であり、陰性例と比較して、病理学的腫瘍径が有意に大きかった(p=0.02)。術後の ctDNA 陽性例は 4 例(20%)であり、陰性例と比較して、病理学的な低分化と有意に関連していた(p=0.03)。無再発生存の解析では、術後 ctDNA 陽性例は陰性例と比較して有意に予後不良であった(2 年無再発生存率:25% vs 85%, p=0.015)。また術前 ctDNA 陽性例は陰性例と比較して予後不良な傾向にあった(2 年無再発生存率:50% vs 85%,

p=0.13)。また術前 ctDNA 陽性で術後陰性となった症例では 5 例中 4 例が無再発であったが、術前 ctDNA が陽性で術後も陽性であった症例は 3 例中 2 例が再発した。このパイロットスタディより術後の ctDNA 検出が微小残存病変を反映すること、術後の ctDNA 解析は術後の再発予測に術前の ctDNA 解析よりも有用であることが示された(図 2)。

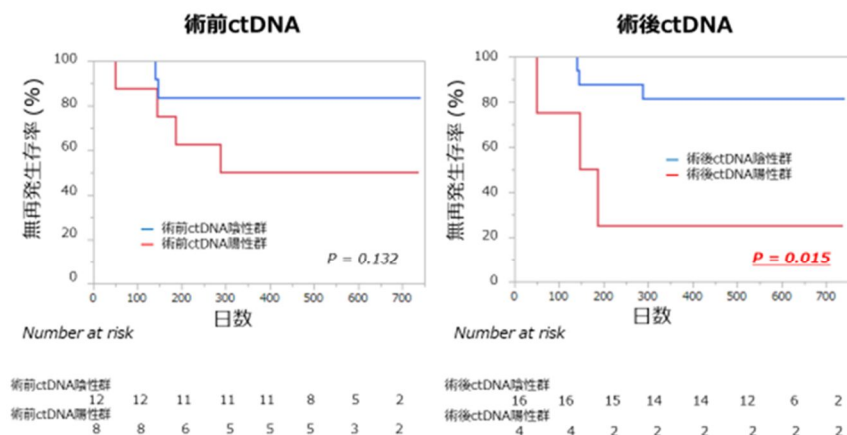


図2. 術前・術後のctDNA陽性と無再発生存期間との関連

術後の ctDNA 解析は、再発しやすい集団を特定し、術後補助療法の適応を検討する上で役立つ可能性があると考えられた[4]。

(2) Signatera を用いた解析

しかし術後の経過観察中に ctDNA が陽性化する症例も文献上報告されており、ctDNA を用いた経過フォローが、現在実臨床で行われている画像検査のフォローよりも優れている可能性がある。再発をより早期に検出する手段としての ctDNA 検査の意義を検証するためコホートを 50 例に拡大し、術後 6 か月ごとに ctDNA 検査を行う解析を実施、さらに ctDNA が真に腫瘍由来であることを示すため、Natera 社の Signatera を用いた。

2018 年 1 月から 2020 年 6 月までに近畿大学病院で治療を受けた臨床病期 II-III 期の非小細胞肺癌患者を対象とし、年齢中央値は 73 歳 (50-89 歳)、男性は 78%、喫煙者は 78%、腺癌は 57%であった。病理病期 I 期が 26%、II 期が 39%、III 期が 35%で、59%の患者が pN0 であった。術後すぐの解析 (術後中央値 9 日、範囲 2-53 日)では 5 人の患者が ctDNA 陽性となり、その後全例が再発し、ctDNA 陽性は有意に予後不良であった (HR=5.3 94%CI: 1.8-15.3 p=0.002)。さらに経過観察中に 5 人の患者が ctDNA 陽性となり、その後全例が再発した。また経過観察中に 1 回でも ctDNA が検出されると、有意に予後不良であった (HR 12.2, 95%CI 4.2-34.9, p<0.0001)。全体として、ctDNA 陽性の画像検査に対するリードタイム中央値は 2.8(0-12.8)カ月であった。ctDNA 陰性は予後良好な転帰と関連しており、長期の陰性適中率は 83.3%(30/36 人)であった。術後の採血ポイントを術後早期だけでなく、6 か月毎におこなうことで、術後の予後予測だけでなく、術後再発の早期発見に ctDNA 解析が有用であることが示された。

1. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3552-3559.
2. Wu YL, Tsuboi M, He J et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383: 1711-1723.
3. Felip E, Altorki N, Zhou C et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021; 398: 1344-1357.
4. Ohara S, Suda K, Sakai K et al. Prognostic implications of preoperative versus postoperative circulating tumor DNA in surgically resected lung cancer patients: a pilot study. *Transl Lung Cancer Res* 2020; 9: 1915-1923.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Shuta Ohara, Kenichi Suda, Toshio Fujino, Akira Hamada, Takamasa Koga, Masaya Nishino, Masato Chiba, Masaki Shimoji, Toshiki Takemoto, Junichi Soh, Tetsuya Mitsudomi | 4. 巻 154 |
| 2. 論文標題 Dose-dependence in acquisition of drug tolerant phenotype and high RYK expression as a mechanism of osimertinib tolerance in lung cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Lung Cancer | 6. 最初と最後の頁 84-91 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2021.02.017. | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Shuta Ohara, Kenichi Suda, Kazuko Sakai, Masaya Nishino, Masato Chiba, Masaki Shimoji, Toshiki Takemoto, Toshio Fujino, Takamasa Koga, Akira Hamada, Junichi Soh, Kazuto Nishio, Tetsuya Mitsudomi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Prognostic implications of preoperative versus postoperative circulating tumor DNA in surgically resected lung cancer patients: a pilot study | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research | 6. 最初と最後の頁 1915-1923 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tlcr-20-505. | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Shuta Ohara, Kenichi Suda, Toshio Fujino, Akira Hamada, Takamasa Koga, Masaya Nishino, Masato Chiba, Masaki Shimoji, Toshiki Takemoto, Junichi Soh, Tetsuya Mitsudomi | 4. 巻 154 |
| 2. 論文標題 Dose-dependence in acquisition of drug tolerant phenotype and high RYK expression as a mechanism of osimertinib tolerance in lung cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Lung Cancer | 6. 最初と最後の頁 84-91 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2021.02.017 | 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 Shuta Ohara, Kenichi Suda, Toshio Fujino, Akira Hamada, Takamasa Koga, Masaya Nishino, Masato Chiba, Masaki Shimoji, Toshiki Takemoto, Junichi Soh, Tetsuya Mitsudomi | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Prognostic value of plasma fibrinogen and D-dimer levels in patients with surgically resected non-small cell lung cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Surgery Today | 6. 最初と最後の頁 1427-1433 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-020-02019-1 | 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 Shuta Ohara, Kenichi Suda, Tetsuya Mitsudomi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Cell Line Models for Acquired Resistance to First-Line Osimertinib in Lung Cancers-Applications and Limitations | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 354 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10020354. | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 小原秀太 須田健一 光富徹哉 | 4. 巻 46 |
| 2. 論文標題 早期肺がんへのLiquid biopsyの応用 - 再発予測としてのMinimal Residual Disease 検出の意義 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 近畿大学医学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 73-78 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15100/00022063 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 小原秀太, 須田健一, 藤野智大, 濱田顕, 千葉真人, 下治正樹, 武本智樹, 宗淳一, 光富徹哉 |
| 2. 発表標題 肺癌切除症例におけるctDNA解析の有用性 |
| 3. 学会等名 第72回日本気管食道科学会(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小原秀太, 須田健一, 坂井和子, 藤野智大, 古賀教将, 西野将矢, 濱田顕, 千葉真人, 武本智樹, 宗淳一, 西尾和人, 光富徹哉 |
| 2. 発表標題 Next-generation sequencing(NGS)を用いた外科切除症例における再発予測因子としての意義 |
| 3. 学会等名 日本肺癌学会 関西支部会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小原秀太, 須田健一, 坂井和子, 藤野智大, 古賀教将, 西野将矢, 濱田顕, 千葉真人, 武本智樹, 宗淳一, 西尾和人, 光富徹哉 |
| 2. 発表標題 Next-generation sequencing(NGS)を用いたctDNAの外科切除症例における再発予測因子としての意義 |
| 3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小原秀太, 須田健一, 坂井和子, 藤野智大, 古賀教将, 西野将矢, 濱田顕, 千葉真人, 武本智樹, 宗淳一, 西尾和人, 光富徹哉 |
| 2. 発表標題 Next-generation sequencing(NGS)を用いたctDNAの外科切除症例における再発予測因子としての意義 |
| 3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小原秀太, 須田健一, 藤野智大, 濱田 顕, 千葉真人, 下治正樹, 武本智樹, 宗 淳一, 光富徹哉 |
| 2. 発表標題 肺癌術後におけるcirculating tumor DNA検出の意義 |
| 3. 学会等名 第39回日本呼吸器外科学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 2021/11/11 第9回南大阪肺癌分子腫瘍研究会で「肺癌切除症例におけるctDNA解析の有用性」を発表 |
|---|

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 |
|---------|---------|