

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09353

研究課題名(和文) 上部尿路上皮癌術後経過における血中・尿中ctDNA変異遺伝子モニタリング

研究課題名(英文) Postoperative plasma and urinary circulating tumor DNA monitoring in upper tract urothelial carcinoma

研究代表者

小原 航 (Obara, Wataru)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：90337155

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)：本研究の目的は、上部尿路上皮癌の術後経過におけるctDNAの変異遺伝子量の変化が既存の画像学的検査よりも早期に再発や転移の検出が可能であるかを検証することである。

上部尿路上皮癌23例において個別に追跡する遺伝子変異を選択し、術前後の血液、尿中ctDNAモニタリングを行い、術後再発を認めた症例全例で再発時点でctDNAの上昇を認め、術後再発の検出が可能であった。さらに、尿中ctDNAにおける術前と術後2日目の変化率が術後再発のリスク因子であることが示唆された。

以上の結果から、血中・尿中ctDNAはバイオマーカーとしての妥当性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上部尿路上皮癌はバイオマーカーに乏しく、低侵襲のバイオマーカーが望まれている。ctDNAは近年癌に対するバイオマーカーとしての妥当性が報告されている。ctDNA解析のためのサンプルは血液を用いることが多いが、尿もサンプルとして有用と考えられる。上部尿路上皮癌において血液と尿の両者を用いてctDNA解析を行った研究はこれまでになく、本研究により、上部尿路上皮癌においてctDNAモニタリングは新たな低侵襲バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。さらに、ctDNAの変化が再発予測に有用である可能性が示唆され、術後補助療法の治療選択の一助となる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to evaluate the utility of individualized ctDNA monitoring using digital polymerase chain reaction (dPCR) as a tumor recurrence biomarker for UTUC in the perioperative period.

Twenty-three patients with upper tract urothelial carcinoma were included. In each patient, case-specific mutations were selected and performed plasma and urinary ctDNA monitoring. All patients with postoperative recurrence had case-specific ctDNA at the time of recurrence. Moreover, the change rate of urinary ctDNA between pre operation and day 2 after operation was identified as a prognostic factor associated with short recurrence free survival.

Plasma and urinary ctDNA might be a minimally invasive biomarker for the detection of postoperative recurrence.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：泌尿器科学 上部尿路上皮癌 バイオマーカー ctDNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究で対象とする上部尿路上皮癌(腎盂・尿管癌)には有用な腫瘍マーカーは存在せず、画像以外の診断法や治療効果を予測するバイオマーカーも確立されていない。限局性上部尿路上皮癌に対しては腎尿管全摘除術が行われるが、術後2年以内の膀胱内再発率は15~50%、局所再発および遠隔転移は約25%に生じる(Rink M, et al. Ann Surg Oncol. 2012)。再発および転移性尿路上皮癌に対してはプラチナ製剤を含む多剤併用化学療法や免疫チェックポイント阻害剤を用いた薬物療法が行われるが、5年生存率は20%程度と決して満足いくものではない。以前、私たちが行った再発および転移性尿路上皮癌に対するワクチン療法の臨床試験において、腫瘍量と治療効果が相関することが示唆された(Obara W, et al. Ann Oncol. 2017)。従って、再発および転移性尿路上皮癌に対しては、より腫瘍量の少ない段階で治療を介入することが予後の改善に繋がるものと考えられる。

近年、血中 DNA から再現性のある塩基配列決定法が確立され、原発腫瘍と同じ変異を持つ DNA が血中を循環していることが明らかにされた(Schwarzenbach H, et al. Nat Rev Cancer. 2011)。この ctDNA は癌細胞由来の DNA であり、ctDNA 中の遺伝子変異は、鋭敏な癌の存在診断になることが示唆される。しかし、血液中の DNA は微量であり、その中の ctDNA の変異遺伝子頻度(Variant Allele Frequency; VAF)は一般に1%以下とされる。これは次世代シーケンサー(Next Generation Sequencer; NGS)による変異遺伝子の検出限界以下であり、リキッドバイオプシーとしての NGS による網羅的プロファイリングでは、超低 VAF に対応できないこと、頻回検査には費用がかかりすぎることから現実的ではない。このような超低頻度遺伝子変異の検出に優れた技術として digital PCR (dPCR) が挙げられる。NGS と比較するとプローブを使用した1塩基変異の高感度検出が dPCR の特長であり、私たちが行った先行研究では検出感度は0.001%程度であった。体内腫瘍量モニタリングを目的とした場合には、NGS よりも高感度に検出が可能で、頻回検査にも無理なく対応できる dPCR が優れており、この技術を応用し術後モニタリングすることで上部尿路上皮癌の微小な再発や転移病変をより早期に検出できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、上部尿路上皮癌の術後経過における ctDNA の変異遺伝子量の変化が既存の画像学的検査よりも早期に再発や転移の検出が可能であるかを検証することである。

一般的に ctDNA 研究に用いられる検体は血液が多いが、上部尿路上皮癌で特徴的かつ非侵襲的に採取可能な検体として尿がある。近年、尿路上皮癌において尿中 ctDNA の有用性を示した報告(Lee DH, et al. Sci Rep. 2018, Hayashi Y, et al. Cancer Sci. 2019)が散見されるが、これらは hTERT や FGFR といった特定の遺伝子変異を標的として ctDNA 中の変異遺伝子量を測定し、癌の存在診断の有用性を示したものであり、網羅的に遺伝子変異を探索し、症例特異的な遺伝子変異を同定して ctDNA 中の変異遺伝子量を解析した研究や、ctDNA を用いて治療後経過のモニタリングを行った研究はない。また、上部尿路上皮癌において血液および尿中 ctDNA の両者を比較してモニタリングを行った研究はなく新たな知見が得られる可能性がある。低侵襲かつ微量な検体を用いて、再発や転移の微小病変が検出可能となれば、バイオマーカーとして有用となるのみならず、術後補助療法や治療の早期介入のオプションを示すことが可能となり、治療法の限られている再発および転移性上部尿路上皮癌においてその意義は大きい。また、症例毎に個別化医療の提供が可能となり医療費の抑制にも繋がることを期待される。

### 3. 研究の方法

上部尿路上皮癌に対する手術症例を対象とし、手術前後の ctDNA の変異遺伝子量の変化が術後再発や転移の早期発見に有用かを検証する。

1) 上部尿路上皮癌に対して手術を施行した症例を対象とし、術前後の血液と尿を採取し、血漿および尿の上清を-80℃で保存する。術後2年まで検体採取を継続する。

2) 手術検体の新鮮凍結標本から DNA を抽出し、NGS による全エクソームシーケンシングを行う。なお、術前の血液より末梢血単核細胞を採取し、腫瘍組織とともにシーケンシングを行い、生殖細胞系列変異は除外する。

3) 症例毎に追跡する遺伝子変異を同定する。追跡する遺伝子変異の選定としては、NGS のリード数が20以上、変異リード数が5以上、VAFが10%以上、non-synonymous 変異、既存のデータベース(COSMIC、ClinVar等)で報告済。以上を満たす変異のうち、共同研究施設に保有する Probe/Primer がある場合はその遺伝子変異を採用する。Probe/Primer がない場合は最も VAF の高い変異を選択し Probe/Primer を作成する。また、尿路上皮癌では hTERT のプロモーター変異が報告されているが、本研究では全エクソームシーケンシングを行うため NGS では検出できない。従って、全症例の腫瘍組織 DNA において hTERT のプロモーター変異に対して dPCR を行い、VAF10%以上であれば追跡する遺伝子変異として採用する。

4) 血漿、尿上清サンプルより DNA を抽出し、dPCR を用いて ctDNA における変異遺伝子量を

解析する。追跡する遺伝子変異が症例毎に異なると予想されるため、dPCR に使用する Probe/Primer も多岐にわたる。従って、腫瘍組織から抽出した DNA を用いて dPCR を行い、変異遺伝子が検出可能であれば血中および尿中 ctDNA を用いて dPCR を行う。

各症例の ctDNA 解析結果と臨床経過とから、下記について明らかにする。

- 再発時の ctDNA 検査の陽性率
- disease-free 状態の ctDNA 検査の陰性率
- 従来検査と比較して、ctDNA での再発発見率、診断までの時間差 (leading time)
- 再発、転移形式 (膀胱内または膀胱外) の違いによる ctDNA の変動
- 偽陰性・偽陽性を示す症例・病態の特徴
- 血中および尿中 ctDNA 検査の比較

#### 4. 研究成果

研究対象は上部尿路上皮癌の手術症例 30 例を予定していたが、45 例登録しており、腫瘍組織、手術前後の血液、尿サンプル採取は終了している。

追跡する遺伝子変異の選択を目的とした腫瘍組織の遺伝子変異解析は 39 例で終了している。そのうち 23 例では各症例において追跡する遺伝子変異を選択し、術前後の血液、尿サンプルにおいて ctDNA の解析が終了しており、手術前後の ctDNA 変化が確認された。23 例のうち 21 例は術前のサンプルで ctDNA の検出が可能であり、術後の低下を確認した。2 例は術前化学療法を施行し、原発腫瘍の消失を認めた症例であったが、これらの症例では、術前のサンプルにおいて ctDNA は検出されなかった。

術後再発を認めた症例は 11 例で、膀胱再発が 10 例、転移再発が 2 例であり、1 例は膀胱再発、転移再発を同時に認めた症例であった。膀胱再発症例全例で再発時に尿中 ctDNA の上昇を認め、そのうち 5 例では、臨床的再発診断より早期に尿中 ctDNA の上昇を認めており、リードタイムの平均は 60 日であった。一方転移再発症例 2 例については、2 例ともに再発時に血中 ctDNA の上昇を認めた。特に膀胱再発の検出に関しては、尿中 ctDNA は尿細胞診よりも感度が高い結果となった。(図 1)

さらに、尿中 ctDNA における術前と術後 2 日目の VAF 変化率と無再発生存期間を検証したところ、尿中 ctDNA の VAF が低下しない症例群で有意に無再発生存期間が短縮しており、尿中 ctDNA が術後再発のリスク因子であることが示唆された。(図 3)

以上の結果から、血中・尿中 ctDNA はバイオマーカーとしての妥当性があり、既存の画像検査よりも早期に再発の検出が可能である可能性があると考えられ、さらに、ctDNA は術後再発の予測も可能であることが示唆された。

近年上部尿路上皮癌における術後補助療法の重要性が報告されているが、術後補助療法の適応に関してはいまだ確立されていないため、今後 ctDNA が術後再発の検出だけでなく術後補助療法の治療選択の一助となりうる可能性が示唆される。

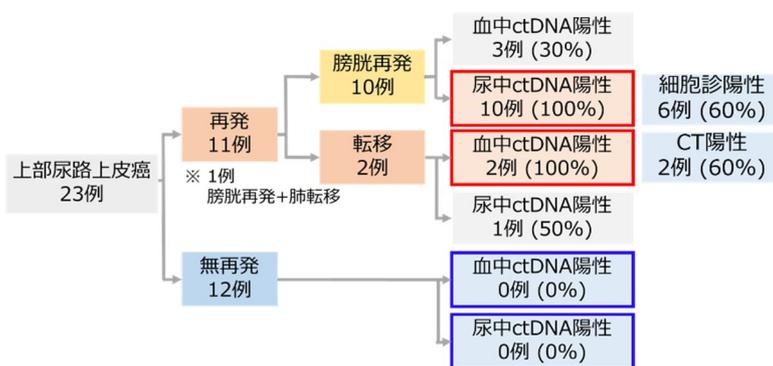


図 1. 上部尿路上皮癌術後 ctDNA モニタリング

上部尿路上皮癌術後経過において、症例特異的変異を用いた ctDNA モニタリングにより、膀胱再発では尿中 ctDNA による再発の検出が可能であり、転移では血中 ctDNA による再発の検出が可能であった (赤枠 100%)。また、無再発の確認も可能 (青枠 0%) であった。

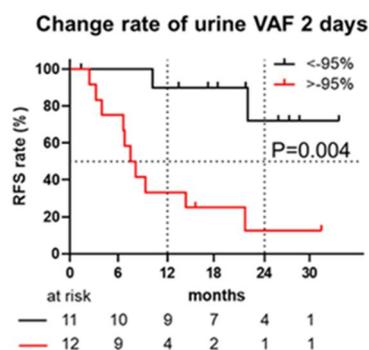


図 3. 尿中 ctDNA の変化と

#### 術後再発との関連

尿中 ctDNA の低下率が低い症例は有意に無再発生存期間が短かった。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Tamura Daichi, Abe Masakazu, Hiraki Hayato, Sasaki Noriyuki, Yashima Abo Akiko, Ikarashi Daiki, Kato Renpei, Kato Yoichiro, Maekawa Shigekatsu, Kanehira Mitsugu, Takata Ryo, Maejima Kazuhiro, Sasagawa Shota, Fujita Masashi, Suzuki Yutaka, Nakagawa Hidewaki, Iwaya Takeshi, Nishizuka Satoshi S., Obara Wataru | 4. 巻<br>115             |
| 2. 論文標題<br>Postoperative recurrence detection using individualized circulating tumor <scp>DNA</scp> in upper tract urothelial carcinoma   | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science  | 6. 最初と最後の頁<br>529 ~ 539 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/cas.16025   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Daichi Tamura   |
| 2. 発表標題<br>Detection of individualized mutation using plasma and urinary circulating tumor DNA in patients with upper tract urothelial carcinoma |
| 3. 学会等名<br>American Urological Association Annual Meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田村 大地                              |
| 2. 発表標題<br>上部尿路上皮癌患者における循環腫瘍DNAを用いた症例特異的変異の検出 |
| 3. 学会等名<br>第81回日本癌学会学術総会                      |
| 4. 発表年<br>2022年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Daichi Tamura  |
| 2. 発表標題<br>Detection of individualized mutations and monitoring of postoperative recurrence using circulating tumor DNA in patients with upper tract urothelial carcinoma |
| 3. 学会等名<br>European Association of Urology Annual Meeting (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2023年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|---------------|---|---|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 西塚 哲<br><br>(Nishizuka Satoshi)<br><br>(50453311) | 岩手医科大学・医歯薬総合研究所・特任教授<br><br><br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|