

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15575

研究課題名（和文）ctDNA検査を用いた食道癌の免疫チェックポイント阻害剤の適正使用の検討

研究課題名（英文）Consideration of appropriate use of immune checkpoint inhibitors in esophageal cancer using ctDNA

研究代表者

二階 春香（Nikai, Haruka）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：90750860

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ctDNAによるICI治療の効果予測を行った。通常の化学療法と同様に、ICI治療でも1サイクル後にctDNAが低下する症例は奏効が得られ長い効果持続がえられていた。逆に急速増大症例では、ctDNAは早期から急上昇していた。また、ごく軽度の増大があるものの治療継続の判断に迷うような症例では、ctDNAは早期に上昇を認め、その後画像上も遅れて明らかな増大を認めていた。以上より、dPCRを用いたctDNAモニタリングは食道癌免疫チェックポイント阻害剤治療における早期治療効果判定、HPDの早期発見など画像診断評価の弱点を克服する重要な検査ツールとなる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICI治療では従来の化学療法とは異なった治療経過をたどることがあり、迅速かつ正確に腫瘍細胞量を判定し、治療効果判定とすることがICI適正使用のために必要であると思われる。ctDNAによる効果判定は画像による炎症反応を含んだ腫瘍サイズによる判定と異なり、遺残癌細胞量を示すものであり、より客観的指標である。本研究の成果は、ctDNAによる早期治療効果判定、HPDの早期発見など画像診断評価の弱点を克服する重要な検査ツールとなる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted predictive analysis of the effectiveness of ICI therapy using ctDNA. Similar to conventional chemotherapy, cases where ctDNA decreased after one cycle of ICI therapy showed a favorable response and prolonged effects. Conversely, in cases with rapid ctDNA increase, early progression was observed. In cases where there was uncertainty about continuing treatment despite mild progression, ctDNA showed early elevation, followed by clear enlargement on imaging.

Based on the above, ctDNA monitoring using dPCR demonstrated the potential to overcome the limitations of imaging-based diagnostic evaluations, such as early assessment of treatment efficacy and early detection of hyperprogressive disease (HPD), making it an important diagnostic tool for immunotherapy with checkpoint inhibitors in esophageal cancer.

研究分野：Esophageal cancer

キーワード：ICI Nivolumab Circulating tumor DNA Esophageal cancer

1. 研究開始当初の背景

近年、これまでの手術、化学療法、放射線療法の3大標準治療に加え、第4の治療法として「がん免疫療法」が注目されている。免疫系の直接的活性化を目指した従来の免疫療法に対し、免疫活性化にブレーキをかける機構である免疫チェックポイントを阻害するという逆転の発想にもとづく治療法の開発は免疫療法に大きな変革をもたらした。2020年3月に食道癌の二次治療以降で Nivolumab 療法、2020年10月に PD-L1 陽性食道癌の二次治療以降で Pembrolizumab 療法が承認された。このように免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor: ICI) の臨床での使用機会は年々拡大しているが、いくつかの問題点も明らかになってきている。ICI の効果判定では、pseudo progression と呼ばれる投与開始後に腫瘍が一度増大しその後縮小するという特徴的な反応が 10-30%ほどにみられ、真の進行の見極めが重要であり CT による効果判定検査は通常 8 週間とされている。奏功例では生存曲線でロングテールを示す集団も見られるが、中止・休止の判断も難しく治療期間が長期におよぶ例も増加している。また、hyper progressive disease (HPD) と呼ばれる ICI 治療前と比較し急速な増悪スピードを示す症例の報告も散見されるが、未だ HPD の機序は明らかになっておらず、予測も困難である。

近年、腫瘍細胞由来の血中遊離 DNA (Circulating tumor DNA: ctDNA) が患者特異的な血液バイオマーカーとして注目されている。ctDNA 検査による再発早期発見や微量癌細胞遺残の判定に関する報告は多いが、いまだ日常癌診療で確立したツールとはなっていない。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、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。当施設では少数の症例特異の変異を標的として低コストで頻回な dPCR による ctDNA モニタリングシステムを構築し、食道癌、胃癌、大腸癌でその臨床的妥当性を報告している (文献 1 - 5)。

2. 研究の目的

本研究では今後大幅な増加が予測される食道癌免疫療法において、dPCR を用いた症例特異的変異を対象とした ctDNA モニタリングが正確かつ迅速な治療効果判定法となりうるか、について検証した。

3. 研究の方法

食道癌で ICI 治療をうける患者を対象とし、原発巣あるいは血液検体で NGS を用いたゲノムプロファイリング検査を行った。検出された症例特異的変異より 1 症例ごと 1-3 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。ICI 治療では効果発現に時間を要すること、pseudo progression や HPD を念頭に、特に治療開始初期の ctDNA 変動とその後の画像所見について評価した。

4. 研究成果

1) ゲノムプロファイリング検査と ctDNA アッセイの注意点

遺伝子パネル検査は、保険の FoundationOne CDx, FoundationOne Liquid CDx (Foundation Medicine 社)、自由診療 (研究用) の OTS-Scan OTS-Liquid Scan (Quantdetect 社) を用いた。それぞれ組織検体、血漿検体での遺伝子パネルが準備され、症例によっては組織・血液双方でゲノムプロファイリングが行われた。重要な点として Liquid でのプロファイリング検査では、germline 変異やクローン性造血 (clonal hematopoiesis of indeterminate potential: CHIP) が多く見られた。これらは遺伝子パネル検査の本来の目的である治療検索や本研究のような ctDNA モニタリングにも誤った情報を提供してしまうため注意が必要である。本研究では、候補変異を標的とする Probe/primer を合成後は、末梢血単核球 DNA でも確認し germline variant, CHIP を除外した。さらに dPCR 解析は微量 DNA からの解析が可能であり、生検組織など検体量不足で NGS が施行できなかった症例でも該当変異の腫瘍組織内の定量確認が可能であった。

2) ICI 治療奏効例における ctDNA 変化

先行研究では化学療法 1 サイクル後の ctDNA-VAF (variant allele frequency) の治療前に対する割合 post/pre-ctDNA でその後の治療効果を判定した。Post/pre-ctDNA が 0.13% 未満の症例は 0.13 以上の症例に比較し、有意に奏効率が高く、治療が奏功し、予後も良好であった (文献 5)。本研究でも同様に Post/pre-ctDNA による ICI 治療の効果予測を行った。通常の化学療法と同様に、ICI 治療でも 1 サイクル後に ctDNA が治療前の 13% 程度まで低下する症例は奏効が得られ長い効果持続がえられている (図 1、2)。

82歳、男性 T4N1M1(HEP), Stage IVB

Pembrolizumab + CDDP/5-FU

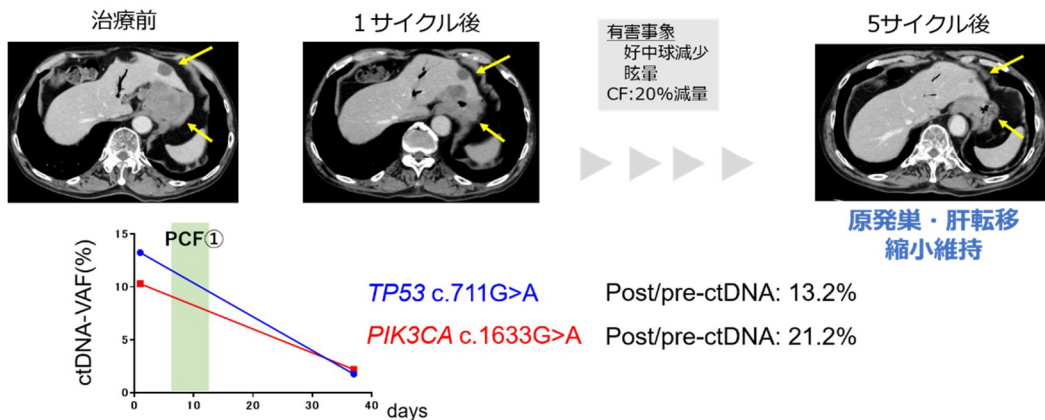


図1 . Pembrolizumab-CDDP/5-FU 奏効症例の ctDNA 変化

Pembrolizumab-CF 療法後 ctDNA の大幅な 10-20%程度までの ctDNA 低下を認める。有害事象により治療間隔は長くなり、減量も行ったが、5 サイクル施行後も縮小を維持している。

3) ICI 治療後の病勢進行と非特異的病変の鑑別

ICI 治療ではしばしば急速な病勢進行が見られるため、免疫療法関連有害事象による症状増悪や画像変化と真の病勢進行の判別が困難である。図2に ICI 治療導入後に全身状態の悪化と肺結節陰影の出現を認めた症例の経過を示す。臨床所見からは肺転移出現など病勢進行も考えられたが、抗菌薬と治療休止による経過観察後も原発巣縮小は維持され、肺病変は消失しており肺炎に伴う結節影であったことが確認された。本症例では 1 サイクル前後の ctDNA 変化である post/pre-ctDNA は 1.64%まで減少していたが、肺病変は非特異的炎症所見であることや、化学療法を休止してもある程度効果持続が期待できることを示唆する所見とも考えられた(図2)

81歳、男性 T3brN1M0, Stage IIIB

Pembrolizumab + CDDP/5-FU

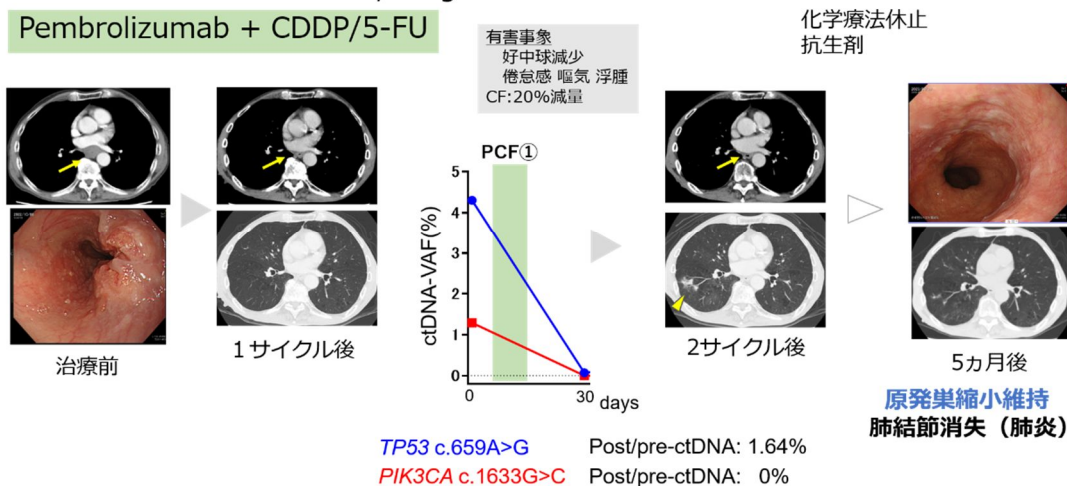


図2 . Pembrolizumab-CDDP/5-FU 奏効症例の治療後非特異的所見と ctDNA 変化

Pembrolizumab-CF 療法後 ctDNA の大幅な低下を認める。原発巣も著明な縮小が見られる。全身状態悪化と肺結節出現があったが、保存的治療により消失した。また食道癌原発巣も無治療で長期間縮小維持が得られている。

4) ICI 治療非奏効例における ctDNA 変化

ICI 治療では一次的な腫瘍増大を示しその後時間をかけて縮小する症例も多く、新規病変の出現がなければ、数サイクル継続し効果を確認する場合が多い。図3に増悪例の ctDNA 変動所見を示した。緩徐な肺転移病変の増大を示すものの新規病変出現や既存の腫瘍マーカーの上昇はなく、その後の効果発現を期待し治療を継続したが、病変は増大を続けた。ctDNA は 1 サイクル後も 3 倍ほどの上昇を認め、病変進行の予測が可能と思われた。

71歳、男性 食道癌放射線化学療法後、肺転移

Pembrolizumab + CDDP/5-FU

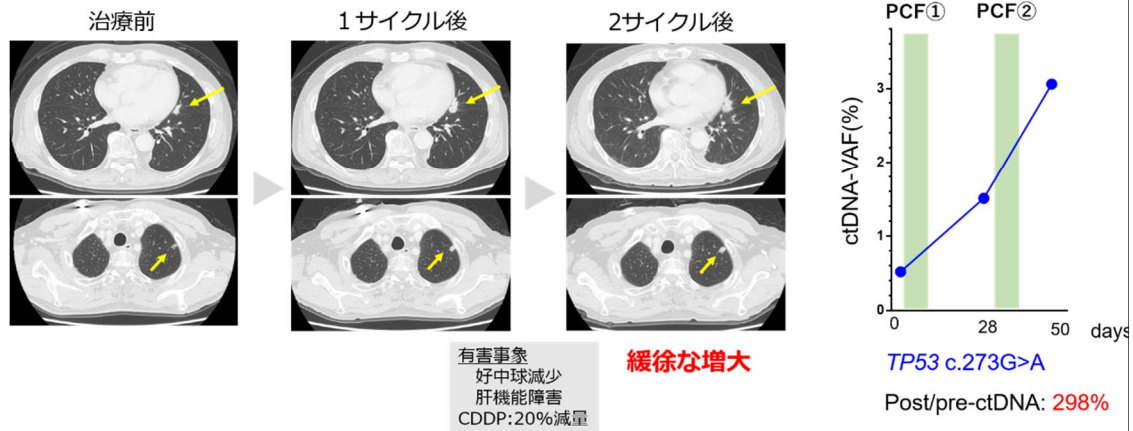


図3 . Pembrolizumab-CDDP/5-FU 非奏効症例の ctDNA 変化
画像上病変の軽度増大が見られる。ctDNA も 1 サイクル後は治療前の 3 倍に上昇している。
ctDNA モニタリングは Pseudo progression 鑑別に有用であろう。

5) hyper progressive disease と ctDNA 変化

ICI 治療では 10% 程度の症例で HPD 症例が報告されている。腫瘍量や肝転移など HPD を予測する因子はいくつかあげられるが、治療手段の少ない進行食道癌治療で免疫療法を除外することは難しい。図4に HPD 症例の ctDNA 変化を示した。ctDNA は 1 サイクル後に約 50 倍の上昇を示している。ICI 導入直後に 1~2 週間という感覚で侵襲的な画像診断を行うことは現実的ではないが、採血のみで低侵襲な ctDNA 検査であれば治療開始直後の腫瘍量変化が可能である。また NGS による ctDNA 検査では turnaround time が 1 月近く要すること、高額であることから、日常診療での導入は困難である。われわれの dPCR-ctDNA モニタリングシステムはこれらの問題点をすべて解消するものであり、HPD の早期判定に極めて有用である。

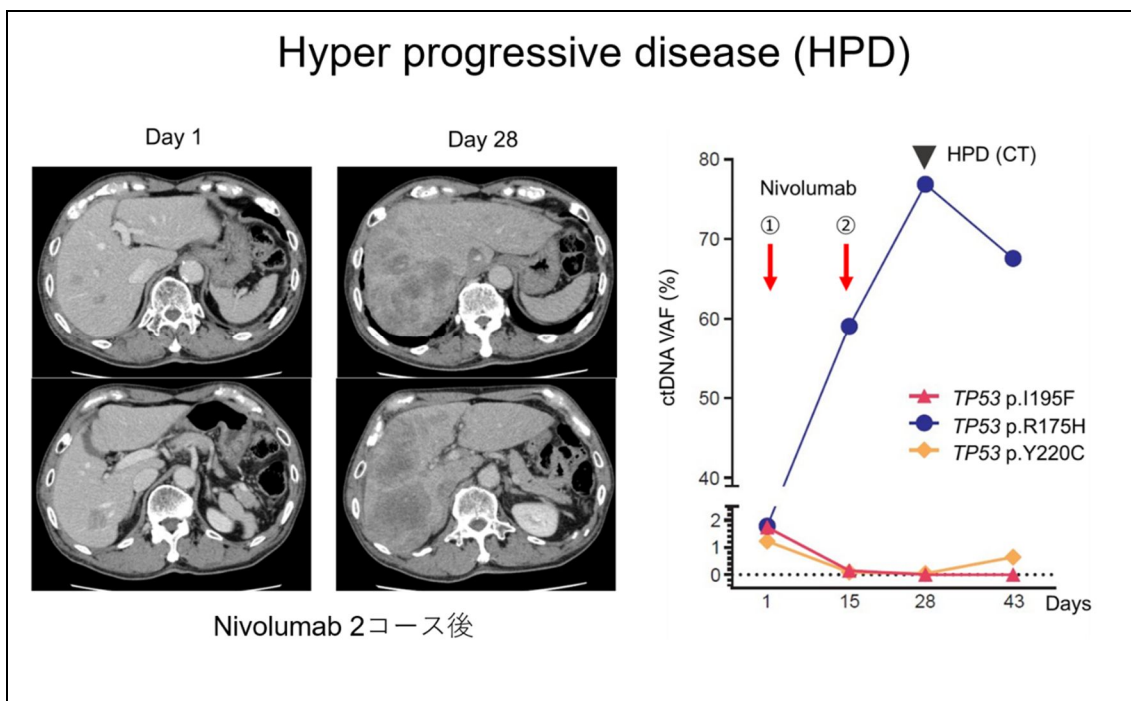


図4 . HPD 症例の ctDNA 変化
Nivolumab 療法 2 コース、4 週間の期間で著名な肝転移増大を示している。ctDNA は 2 週間ごとに数十%のオーダーで上昇している。ctDNA 検査は早期に HPD を予測する重要なツールとなりえる。

以上より、dPCR を用いた ctDNA モニタリングは食道癌免疫チェックポイント阻害剤治療におけ

る早期治療効果判定、HPD の早期発見など画像診断評価の弱点を克服する重要な検査ツールとなる可能性を示した。

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 二階 春香、馬場 誠朗、秋山 有史、高橋 真人、藤澤 良介、熊谷 秀基、遠藤 史隆、岩谷 岳、新田 浩幸、佐々木 章
2. 発表標題 当院における食道癌に対するNivolumab療法の治療成績
3. 学会等名 第77回日本食道学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------