

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15591

研究課題名（和文）分子バーコードを用いたNGS解析でのctDNA評価による乳癌の遠隔再発リスク診断

研究課題名（英文）Risk of distant recurrence based on ctDNA analysis by NGS platform with molecular barcode

研究代表者

吉波 哲大（Yoshinami, Tetsuhiro）

大阪大学・医学部附属病院・特任助教（常勤）

研究者番号：30894240

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、術後遠隔転移再発乳癌5症例の、保存された初回診断時の血漿を用いctDNA解析を行った。ctDNA解析には、腫瘍組織を用いないnon tumor-informed検査（NT検査）を用いた。結果、4例でctDNAが陽性で、初診断時のctDNA陽性が遠隔再発症例の特徴であることが示された。NT検査での同様の報告は乏しく貴重なデータとなった。さらに、4例とも、DNAの塩基置換や欠失・挿入は未検出で、がん固有のメチル化が陽性であった。エピゲノムをターゲットとしてctDNA解析を行うことで高感度な遠隔再発リスク診断となる可能性を示した。これらは、2024年日本乳癌学会で報告予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、遠隔再発リスク診断には腫瘍組織のゲノムプロファイリング結果を利用するctDNA検査が主流であるが、一定の割合でそれが不成功となる症例がある。本研究で用いた検査は、組織の事前検査は不要で、すべての患者を対象とすることができる。加えて、事前の腫瘍組織検査が必要ない分、ctDNA解析結果の受領までの時間が短く、治療方針の決定にすみやかに結果を利用できる。このような明らかな患者へのメリットがある検査の臨床導入につながる研究成果であると考えられる。さらに、ctDNA解析におけるエピゲノムプロファイリングの重要性を臨床検体を用いて評価した研究は現時点では多くなく学術的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：In this research, ctDNA analysis was performed on five patients experienced distant recurrence after radical surgery, using stored plasma samples obtained at the time of initial diagnosis. No tumor-informed assay, which can detect ctDNA without genomic profiling data from tumor tissues, is used as ctDNA analysis in the current research. The assay revealed that four patients had positive-ctDNA, indicating that detectable ctDNA at initial diagnosis was one of the features in patients with distant recurrence. This data is valuable because there are few reports about it with no tumor-informed assay. Moreover, in all four patients, no mutations such as base substitution, or insertion/deletion, were identified, and cancer-specific methylation were detected. Epigenomic profiling enables to improve the sensitivity of ctDNA analysis for the evaluation of risk on distant recurrent. The results of this research will be presented at Japanese Breast Cancer society 2024.

研究分野：乳癌におけるctDNA解析の臨床導入

キーワード：ctDNA breast cancer clinical implementation

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血中循環腫瘍 DNA(circulating tumor DNA; ctDNA)の評価が、がん微小転移の存在診断に繋がることが注目された。がん微小転移を検出する ctDNA 解析は、さまざまな形で臨床導入できる可能性を有しており、多くのトランスレーショナル研究が行われてきた。例えば、診断時の ctDNA 陽性は術後遠隔再発リスクになることや、術前化学療法後の ctDNA 状況で non pCR 症例の予後が分かること、また、術後経過観察中に ctDNA 陽性になればほぼ全例がその後に画像上の再発をきたすことなど、多くの重要な研究成果が報告されてきた。

一方、ctDNA の血中含有量は微量であるため高感度な検出方法が必要とされている。分子バーコード(MB)を用いた次世代シーケンサー(NGS)解析は、容易に任意の部位を ctDNA 解析の標的にできかつ高い感度を有する ctDNA 解析方法である。また、ctDNA は腫瘍の DNA 変化を保持しているが、乳癌は多様な DNA の変化を伴う不均一な疾患であることが知られているため、まず、腫瘍組織を用いて DNA の変異状況を評価し各症例特有の遺伝子変異を同定し(ゲノムプロファイリング)、それを ctDNA 解析の標的とする必要がある。このような ctDNA 解析は tumor-informed assay として分類されている。そして、より多くの症例特異的な DNA 変化を標的とした MB-NGS 解析を行うことで、がん微小転移の検出感度を高めることができるため、標的の数を増やす方向で tumor-informed assay が開発されてきた。上記のような、多くの画期的なトランスレーショナル研究成果は、ctDNA 解析 assay の向上が基本にあったと言える。

しかし、tumor-informed assay には複数の問題点もある。一つ目としては、事前に必要とされる腫瘍組織を用いたゲノムプロファイリングが成功しない症例が一定数いること、二つ目に腫瘍組織検査が必要な分検査結果の受領まで時間(turnaround time)が概ね 4 週間程度必要で、術前化学療法の適応判断には用いにくいことである。そこで、事前の腫瘍組織によるゲノムプロファイリングが不要で、より汎用性が高く、turnaround time が短い non tumor-informed assay の開発の促進が重要と考えた。そして、non tumor-informed assay の臨床導入が進めば、より精密な術前化学療法の適応判断が可能になりその臨床的意義は非常に大きいと言える。

2. 研究の目的

本研究では初診断時に採取された血漿を検体とし、分子バーコードを用いた non tumor-informed assay による ctDNA 解析を行い、その結果が遠隔再発のリスク診断に有用であるかどうかを検討することを目的とした。

non tumor-informed assay では、腫瘍組織のゲノムプロファイリングを行わないため、一般的に乳癌で多く認められる変異を網羅的に測定することで、感度を保つ工夫がされている。そして、対象とする変異には、塩基置換や挿入・欠失といった変異に加え、乳癌に幅広く認められるメチル化変異も含まれており、それにより感度が著しく向上したと言われている。本研究では、non tumor-informed assay における、メチル化変異の重要性も検討をした。

3. 研究の方法

対象は以下の基準を満たす乳癌症例とした。

- ・初診断後に根治的治療が実施された。
- ・術後 5 年以内に遠隔再発を認めた。
- ・あらゆる治療前の血漿が 3ml 以上保存されている。(診断時サンプル)

対象の診断時サンプルを non tumor-informed assay である Guardant Reveal powered by INFINITY (INFINITY)にて測定し、臨床病理学的情報を電子カルテから収集した。

4. 研究成果

本検討では 5 例を対象とした。初診断時の年齢中央値は 47(29-66)歳で、組織学的因子は pT1/2/3 が 1/3/1 例、pN0/1/2 が 2/1/2 で、病期は A 2 例、A 3 例であった。全例が組織学的グレード 3 で、Ki67 40%以上であった。ER 陽性 HER2 陰性が 2 例、ER 陰性 HER2 陽性が 2 例、ER 陰性 HER2 陰性が 1 例であった。全例で術前薬物療法は行わず、術後に標準的な薬物療法が実施されていた。再発までの期間の中央値は 26.4 (22.8-38.4) カ月で、再発部位は肺のみ 1 例、骨のみ 1 例、リンパ節のみ 1 例、骨とリンパ節 1 例、肺と骨とリンパ節 1 例であった。全例で診断時サンプルの血漿 3ml を INFINITY で測定した。投入 DNA 量中央値 11.5 (7.85 - 34.5)ng で品質は良好であった。5 例中、ctDNA 陽性は 4 例(80%)であった。また、4 例ともゲノム変異は認めず、すべてメチル化変異が検出された。

申請者が以前実施した分子バーコードを用いた tumor-informed assay の研究では、遠隔再発症例 7 例中 4 例(57%)で、初診断時の ctDNA が陽性であった。今回の研究では、80%の陽性割合は十分それに匹敵する結果であったといえる。診断時の遠隔再発リスク評価のためのがん微小転移検出目的での ctDNA 解析として non tumor-informed assay が有用な可能性があると考えられた。また、今回検出された変異がすべてメチル化変異であったことから、non tumor-informed assay においては、従来の塩基置換や挿入・欠失といった変異を標的とするよりも、メチル化変

異を標的とすることが重要であることが示唆された。

より多くの症例を対象としてより迅速に結果が判明する検査は、術前化学療法への適応を判断する際に有用性が高い。本研究では、その特長を有する non tumor-informed assay が、tumor-informed assay に劣ることのない感度を有する可能性が示され、今後の臨床導入を考える研究を立案する際の重要なデータとなると考えられた。本研究結果は 2024 年の日本乳癌学会学術集会の厳選ポスターで発表予定である。また、本研究を立案する際に得た知見をまとめ、tumor-informed assay と non tumor-informed assay の特徴や、ctDNA 検査の臨床導入の展望をテーマに Breast Cancer 誌の Review として投稿した。

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 0件）

1. 著者名 Tetsuhiro Yoshinami	4. 巻 published online
2. 論文標題 Perspectives for the clinical application of ctDNA analysis to breast cancer drug therapy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2024年日本乳癌学会学術集会にて厳選ポスターとして発表予定である。

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