

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15600

研究課題名（和文）肝癌の治療効果予測におけるハイスループット・リキッドバイオプシーシステムの構築

研究課題名（英文）High-throughput Liquid Biopsy System in Predicting Treatment Efficacy for Hepatocellular Carcinoma

研究代表者

村岡 優（Muraoka, Masaru）

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：20596887

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）：cfDNA（Cell Free DNA）の中には腫瘍由来のDNAが含まれている。免疫チェックポイント阻害剤の治療効果との関連が報告されているCTNNB1変異とHCCにみられるDNAのメチル化のうち癌特異的なSEPT9に注目し、それぞれの異常を有するcfDNAをdigital PCRを用いて高感度に検出する方法を確立した。TERT promoter C228T変異はHCCに高頻度に見られる変異である。アテゾリズマブ+ベバシズマブ療法中のTERT promoter変異陽性cfDNA（Mutant DNA）量の変化と治療効果の関連を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌に対する分子標的治療薬、免疫チェックポイント阻害剤の有効例と無効例を事前に予測することは困難である。無効例では早期の治療変更が必要であり、有効例と考えられる症例でも治療中に治療抵抗性のある腫瘍がみられることがある。腫瘍の悪性度や治療に関連する可能性がある腫瘍因子の異常を迅速に評価できることは治療薬選択において有益であり、腫瘍量を的確に反映する腫瘍因子を経時的に評価することで適切な時期に治療方法を変更できるようになる。Digital PCRを用いて得られた肝細胞癌の腫瘍因子の情報が生命予後延長に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cell free DNAs (cfDNAs) contain tumor-derived DNAs. We focused on CTNNB1 mutation, which has been reported to be associated with therapeutic effects of immune checkpoint inhibitors, and SEPT9, a cancer-specific DNA methylation found in HCC, and established a highly sensitive method to detect cfDNA with each abnormality using digital PCR. TERT promoter C228T mutation is frequently found in HCC. We confirmed the association between changes in the amount of TERT promoter-positive cfDNA (mutant DNA) during atezolizumab plus bevacizumab therapy and therapeutic response.

研究分野：肝臓病学

キーワード：リキッドバイオプシー 肝細胞癌 digital PCR TERT promoter変異 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) は予後不良な癌種のひとつである。近年、癌治療における非侵襲的な解析方法として、リキッドバイオプシーが注目されている。担癌患者の血液中には、腫瘍由来のタンパク質、DNA、RNA、そしてエクソソームに代表される分泌小胞が含まれている。cfDNA (Cell Free DNA) は、細胞のアポトーシスによって血液中に放出される DNA であり、その中には腫瘍に由来する循環腫瘍 DNA (ctDNA) が含まれている。ctDNA は、がんの早期発見、腫瘍の治療後の再発のモニタリング、治療標的の同定などへの応用が期待されており、肺癌における EGFR のような特定の遺伝子異常は、病態の進行を示すターゲットとして用いることができる。これまでの大規模な検討により、HCC の遺伝子異常として hTERT、TP53、Wnt- $\beta$ -カテニンシグナル、クロマチンリモデリングに関与する異常が同定されている。HCC に関連する異常のうち、TERT promoter 変異は最も頻繁に観察される。TERT promoter 変異は HCC の多段階発癌において早期癌の段階で高頻度にみられることより発癌のゲートキーパーに相当すると言われ (文献 1.)、当施設で過去に実施した研究では、早期癌と進行癌における腫瘍内の変異率 (variant allele frequency) がほぼ同等であり (文献 2.)、肝動脈塞栓術後の TERT promoter 変異陽性 cfDNA 量の増加が治療対象とした腫瘍の体積と有意に相関していることより (文献 3.)、TERT promoter 変異陽性 cfDNA が腫瘍量を反映するマーカーとなり得る可能性がある。また、cfDNA はアポトーシスに由来するため、HCC の薬物治療中の cfDNA 量の変化が腫瘍の壊死を反映する可能性があり、HCC の非侵襲的な治療効果予測のために治療中の cfDNA 量の変化を検討する意義がある。進行した HCC 治療のため、複数の薬物療法が使用できるようになったが事前に治療効果を予測することは困難であり、良好な治療効果が得られる症例は限られる。現在 HCC 治療抵抗性を規定する因子として同定されているものはなく、探索が必要である。HCC の診断、治療法選択、治療中のモニタリングにリキッドバイオプシーを応用する場合、簡便で迅速に結果が得られる検査手法が望ましいため、当施設ではデジタル PCR (dPCR) を用いた解析を進めてきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞癌の薬物治療効果を規定する腫瘍因子を同定し、リキッドバイオプシーに応用することである。治療効果予測に関連する腫瘍由来因子を検出する定性的評価と治療中の腫瘍由来因子のダイナミクスをみる定量的評価を試みた。治療効果を予測する定性的評価のターゲットとして、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果との関連が報告されている CTNNB1 変異に注目した。また、癌の悪性度と関連する可能性がある DNA メチル化の検出をリキッドバイオプシーへ応用できるか検討を行った。定量的評価のターゲットとして、HCC に高頻度にみられる TERT promoter C228T 変異に注目した。HCC の治療法の選択、治療法の変更の際には早急な判断が求められるため、dPCR を用いた迅速かつ正確な治療効果予測の実現を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CTNNB1 変異検出のための multiplex digital PCR 法の確立

The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースより、HCC にみられる CTNNB1 変異は chr3: 41224606-41224646 (GRCh38) の約 40bp の領域に集中していることを確認した。特に代表的な 121A>G と 133T>C 変異を同時に絶対定量するため、それぞれの変異に特異的な TaqMan probe を設計した。Primer は CTNNB1 変異が集中する領域を含む chr3: 41224581-41224701 を増幅するように設計した。121A>G、133C>G と両変異野生型配列を含む 250bp の人工 DNA (chr3: 41224515-41224764) を作成し、各変異型 DNA の連続希釈系列を dPCR により定量評価した。dPCR は QuantStudio 3D (ThermoFisher) を使用した。

### (2) dPCR を用いたメチル化 DNA の検出

TCGA データベースで利用可能な 377 例の HCC 登録があり、メチル化データを取得した。TCGA から得られたメチル化データはイルミナ社の網羅的メチル化解析のプロープ情報が含まれており、約 48 万 5 千個の CpG 領域の情報が得られた。DNA メチル化レベルは  $\beta$  値として 0 (非メチル化) から 1 (完全メチル化) の数値として表される。TCGA データベースから得られた腫瘍部と正常肝のペアデータがある 49 例を解析し、メチル化プロープの  $\beta$  値の中央値を求め、正常肝 < 5%、腫瘍 > 40% を満たすプロープを選定した。選定したメチル化領域のうち、正常肝の  $\beta$  値が一番低い腫瘍特異的メチル化領域を同定し、dPCR を用いたメチル化特異的 PCR 法を確立した。

### (3) TERT promoter 変異に注目した cfDNA 量の変化と肝細胞癌治療効果予測

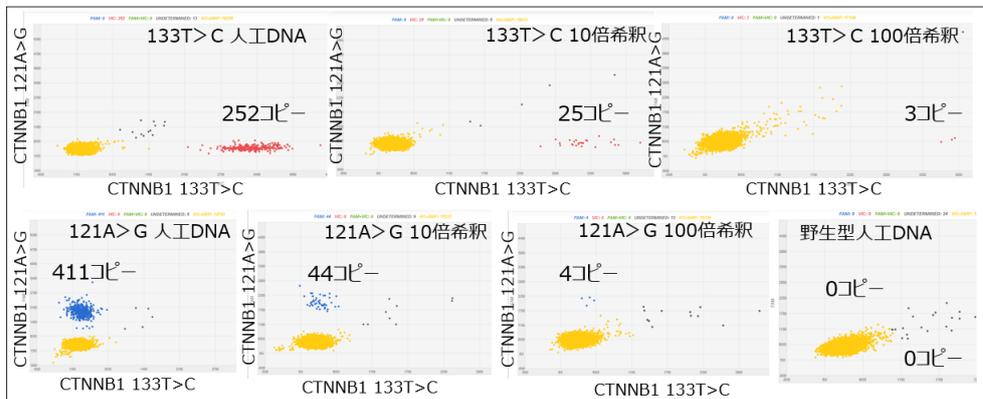
2020 年 12 月から 2022 年 9 月にアテゾリズマブ + ベバシズマブ療法 (Atez+Bev) を実施した 32 例を対象とした。治療前、2~6 コース目に採取した血漿 2ml より DNA を抽出し、20  $\mu$ l に抽出した。抽出した DNA 30~50ng を鋳型として TaqMan 法を用いた dPCR により血漿 1ml あたりの TERT promoter C228T Mutant DNA を定量した。治療効果は RECIST で判定し、Mutant DNA 量の変化と治療効果の関連を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) CTNNB1 変異 133T>C と 121A>G の同時定量

CTNNB1 変異 121A>G と 133T>C、それぞれ野生型の配列を含む 250bp の人工 DNA を 121A>G: 380 コピー/ $\mu$ l、133T>C: 200 コピー/ $\mu$ l、野生型: 400 コピー/ $\mu$ l となるように調整した。121A>G と 133T>C の検出はそれぞれ FAM 色素と VIC 色素を用いた TaqMan probe を作成し、同時検出可能な検査系を確立した。野生型 DNA を鋳型として dPCR により 121A>G、133T>C を定量し、偽陽性がないことを確認した。人工 DNA (121A>G) の 10 倍、100 倍希釈系列を鋳型とした解析では変異型コピー数は 411 コピー、44 コピー、4 コピー、人工 DNA (133T>C) の希釈系列を鋳型とした解析では変異型コピー数が 252 コピー、25 コピー、3 コピーであり、良好な定量性を確認した。(図 1)

図1. CTNNB1変異133T>Cと121A>Gの同時定量



##### (2) HCC 診断におけるメチル化特異的 dPCR の確立

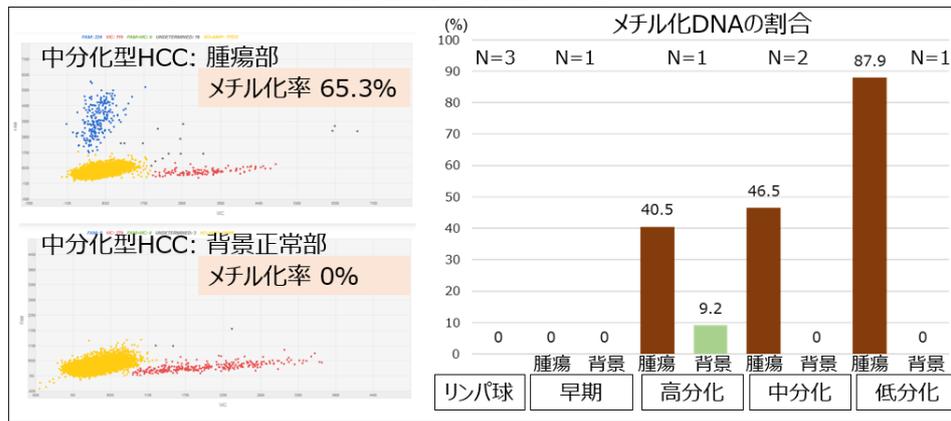
TCGA データベースから得られた正常肝と腫瘍部のペアデータより正常肝<5%、腫瘍部>40% のメチル化のみられる領域を検索し 155 箇所の CpG 領域が候補に挙がった。その中で正常肝のメチル化率が一番低い領域は chr17: 75369484 の CpG 領域であり SEPT9 に存在する。SEPT9 のメチル化を検出する方法として、メチル化 C (シトシン) はバイサルファイト変換後に C のままであるが非メチル化 C はバイサルファイト変換後に U (ウラシル) に変換されることを利用したメチル化特異的 PCR を用いた。バイサルファイト変換後の U は PCR を経て T に固定される。chr17: 75369484 を含む 100bp の CpG 配列が完全にメチル化した DNA であった場合 (完全メチル化 DNA) と CpG 配列のメチル化が全くない場合 (完全非メチル化 DNA) を考え、バイサルファイト変換後の配列を決定した (図 2.)。chr17: 75369484 をターゲットとして、完全メチル化 DNA 配列を増幅するプライマー・MGB-TaqMan プローブと、完全非メチル化 DNA 配列を増幅するプライマー・MGB-TaqMan プローブを作成し、メチル化 DNA と非メチル化 DNA を同時検出できる検査系を確立した (SEPT9 メチル化・非メチル化検出 TaqMan assay)。

HCC 切除後の FFPE 検体より薄切標本を作製し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) により腫瘍部・正常肝部分を取り分けた。それぞれの組織より DNA を抽出し、ネガティブコントロールとしてリンパ球より抽出した DNA を用いた。リンパ球、早期肝細胞癌、高分化型、中分化型、低分化型肝細胞癌より抽出した DNA の SEPT9 (chr17: 75369484) メチル化はリンパ球、早期癌ではみられず、低分化型では 87.9% に認め、腫瘍の悪性度と SEPT9 メチル化の関連が認められた (図 3.)。

図2. SEPT9 の腫瘍特異的メチル化領域 (chr17: 75369484) の配列

chr17:75,369,420-75,369,519	バイサルファイト変換前のDNA配列
TTCATTGAGCTGAGCCAGGGGGCTAGGGGCTCCTCCGGCGGCTAGCTCTGCACT GCAGGAGCGCGGGCGCGGCCAGCCAGCGCGAGGGCCCCGGG chr17: 75369484	
	バイサルファイト変換後の完全メチル化DNA配列
TTTATTTAGTTGAGTTAGGGGTTTAGGGGTTTTTTTCGGCGGTTAGTTTTGTATT GTAGGAGCGCGGGCGCGGCGTTTTAGTTAGCGGTAGGGTTTCGGG chr17: 75369484	
	バイサルファイト変換後の完全非メチル化DNA配列
TTTATTTAGTTGAGTTAGGGGTTTAGGGGTTTTTTGGTGGTTAGTTTTGTATT GTAGGAGTGTGGGTGTTTTAGTTAGTTAGTTAGGGTTTGGG chr17: 75369484	

図3. HCC組織中のSEPT9メチル化と組織学的分化度の関係

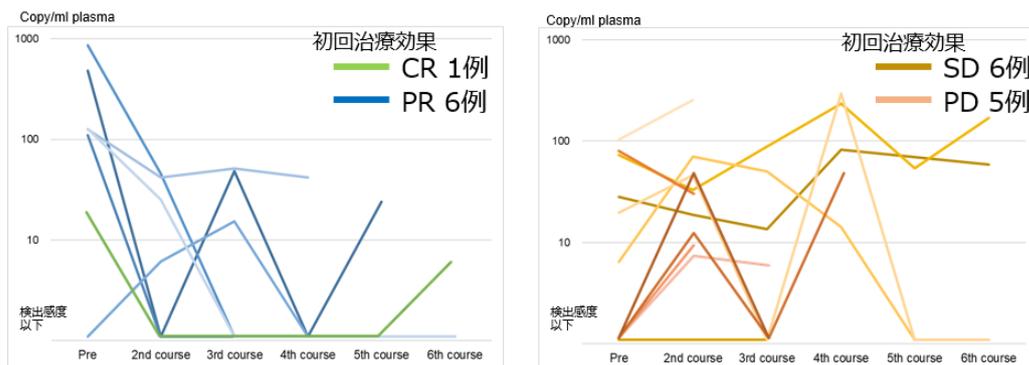


(3) アテゾリズマブ+ベバシズマブ治療後の TERT promoter 変異陽性 cfDNA 量の変化

32 例中 21 例 (65.6%) において治療前後に TERT promoter 変異陽性 cfDNA (Mutant DNA) が検出された。初回画像評価前に治療を中止した 3 例を除外して解析したところ、初回治療効果奏功例 (CR1 例と PR6 例) では非奏功例に比べて 2 コース目以降に Mutant DNA が減少・消失する例が多くみられた (図 4.)。

アテゾリズマブ+ベバシズマブ 2 コース目以降の Mutant DNA 減少例を Responder とし、Responder7 例と Non-responder11 例の Progression free survival rate を解析したところ、MST は Responder: 9.5 カ月、Non-responder: 2.2 カ月であり (P<0.001)、アテゾリズマブ+ベバシズマブ治療後 2 コース目以降の Mutant DNA 減少が治療効果と有意に関連していた。

図4. アテゾリズマブ+ベバシズマブ治療効果とTERT promoter Mutant DNA量の変化の関連



参考文献

1. Nault JC, Calderaro J, Di Tommaso L et al. Hepatology 2014; 60: 1983-1992.
2. Muraoka M, Maekawa S, Suzuki Y, et al. Hepatol Res. 2020; 50: 1071-1082: 2020
3. Muraoka M, Maekawa S, Katoh R, et al. Hepatol. Commun. 2021; 5:1927-1938.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村岡 優
2. 発表標題 進行肝細胞癌薬物療法におけるcell free DNA量を用いたリキッドバイオプシーの臨床応用
3. 学会等名 第108回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru Muraoka
2. 発表標題 Clinical Indications for Liquid Biopsy using Cell Free DNA Content in the Pharmacotherapy of Advanced Hepatocellular Carcinoma
3. 学会等名 APASL Oncology 2022 in Takamatsu (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------