

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20788

研究課題名（和文）術前liquid biopsyを用いたゲノム・RNA発現解析による肺癌術後の個別化医療の探索

研究課題名（英文）Exploration for personalized adjuvant therapy to lung cancer patients using liquid biopsy

研究代表者

木場 隼人（Koba, Hayato）

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任助教

研究者番号：80967886

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺癌術前に採取された採血検体から抽出された血中遊離DNA(cfDNA)と細胞外小胞(EVs)を解析し、その後の予後との関連を検討し、予後予測に関する新たなバイオマーカーの創出並びに治療標的の発見によりオーダーメイドの術後治療の確立を目指すものである。285例の肺癌手術前の血液検体からcfDNAとEVsを抽出した。

患者のうち、EGFR遺伝子変異が陽性に限ると、cfDNAにて同遺伝子変異が検出された群では優位に予後が不良であることが分かった。

またEVs中のタンパク質を検討したところ、ZNFxが検出される群がされない群に比べて優位に予後が良かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中には癌由来の遺伝子変異やタンパク質が循環していることは以前から報告されていた。今回我々の検討では、肺癌の手術前に特定の遺伝子異常やタンパク質が認められる患者群で、生命予後が別れることが示された。肺癌の周術期の治療開発が盛んに行われているが、現時点では病期Stageによって治療を行うべきかどうかを決めている。我々が見出したこれらの因子によって、周術期の治療の判断材料になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed cell free DNA (cfDNA) and extracellular vesicles (EVs) extracted from blood specimens collected before lung cancer surgery, examined their relationship with subsequent prognosis, and developed new biomarkers for predicting prognosis. The aim is to establish personalized postoperative treatments by creating and discovering therapeutic targets. cfDNA and EVs were extracted from blood samples of 285 patients before lung cancer surgery.

Among patients with EGFR mutation, it was found that the group in which the same gene mutation was detected in cfDNA had a significantly worse prognosis.

Furthermore, when examining the proteins in EVs, the group in which ZNFx was detected had a significantly better prognosis than the group in which ZNFx was not detected.

研究分野：Liquid biopsy

キーワード：Extracellular vesicles 肺癌 Liquid biopsy

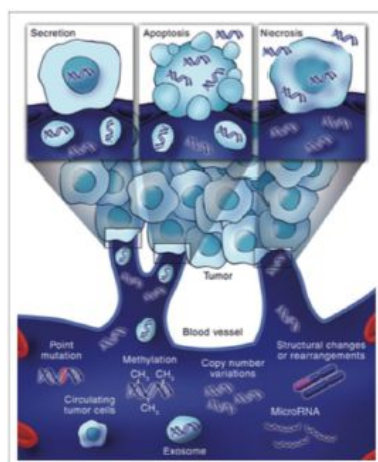
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は罹患率、死亡率ともに増加傾向で、年間の新規発生は12万人、死亡数は7.5万人と悪性新生物の中で第1位である。早期肺癌では外科的切除で根治が望まれるが、残念ながら再発を来してしまうことがある。現在は術後病期を参考に術後化学療法が行われることが標準的であるが、その治療成績は十分とは言えない。再発リスクを評価する新たな予後予測のバイオマーカーが望まれており、更に治療標的を探索することは重要と考える。

近年、血液中の血中遊離 DNA circulating cell-free DNA (cfDNA) を用いて癌の遺伝子変異を検出する方法が実用化されているが、このような手法は組織生検に対して liquid biopsy と呼ばれる。我々は以前より cfDNA の有用性やその分子生物学的な特徴について検討、報告を行ってきた。この中で特に、診断時の腫瘍組織で認められず cfDNA で検出された遺伝子変異が、経過で出現した転移巣で検出されることは注目に値する。また Liquid biopsy としては細胞外小胞体 Extracellular vesicles (EVs) 中の核酸やタンパクが注目されており、病勢や治療標的となることが期待されている (Figure. [1])。

本研究では、肺癌術前に採取された採血検体から抽出された cfDNA と EVs を解析し、その後の予後との関連を検討し、予後予測に関する新たなバイオマーカーの創出並びに治療標的の発見によりオーダーメイドの術後治療の確立を目指すものである。



2. 研究の目的

本研究の目的は、術前の liquid biopsy の解析により、無再発生存期間(DFS)との関連性を評価すること。ならびに予後不良集団における術前 liquid biopsy のゲノム解析によるプロファイリングと、術後再発病変との関連性を評価することである。

3. 研究の方法

2017年1月から2020年5月に当院で外科手術を受けた肺癌症例のうち術前化学療法が行われていない患者を対象に、患者背景、無病生存期間、全生存期間、術前 cfDNA を後方視的に検討する。

- (1) 手術前7日以内の血漿(4 ml)から、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit® (Qiagen) を用いて cfDNA を抽出し、Qubit® High sensitivity を用いて濃度を計測、EGFR 遺伝子変異 (EGFRm)の有無を Digital Droplet PCR を用いて測定した。
- (2) 同一対象の血清 500 µl から MagCapture Exosome isolation Kit PS Ver.2(FUJIFILM)を用いて抽出し、BCA 法で濃度測定を行った。タンパク質の網羅的な解析はショットガン MS にて行った。観察期間中に再発が確認され術前、無再発期、再発期の3ポイントで検体が得られている患者を対象に共通しているタンパクを同定。その後全例の術前サンプルから抽出した Exosome を Dot Blot 法にて対象のタンパク質の有無を判定し、予後解析を行った。

4. 研究成果

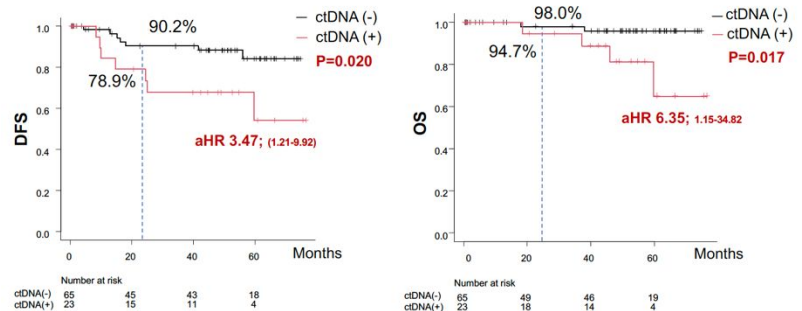
該当する対象としては、285例であり、男性179例、女性106例、年齢中央値は71(36-88)歳で、

小細胞癌は 8 例であった。EGFRm 陽性肺癌は 93 例(32.6%)含まれていた。非小細胞肺癌の pStage0/I/II/III/IV はそれぞれ 7/187/42/36/6 例で、小細胞肺癌の pStageI/II/III はそれぞれ 4/1/3 例であった。非小細胞肺癌の mDFS は pStage0-II で未達、pStage III/IV でそれぞれ 14.6(7.8-29.7)/21.5(8.5-NA)か月であった。mOS は pStage III で 53.3(28.7-NA)か月で、他の Stage では未達であった。

(1) 組織検体にて EGFRm が陽性と判明しているのは 93 例あり、このうち common mutation(Exon19 deletion, Exon 21 L858R)を有するのは 88 例であった。このうち cfDNA にて EGFRm が検出されたのは 23 例であり、DFS は HR 3.47, p=0.020, OS は HR 6.35, p=0.017 とどちらも優位に不良であった(Figure)。術前の cfDNA 濃度と DFS との間に明確な関連は示されなかった(相

関係数は -0.0233(P=0.699)/-0.0143(P=0.812)。

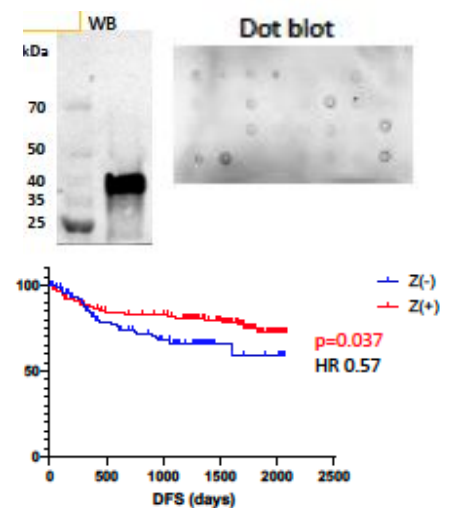
考察:腫瘍由来の cfDNA を正しく検出すれば、周術期の予後予測のバイオマーカーになり得ることがわかった。



(2) EVs の解析は、上記の条件を満たす 6 例で網羅的なタンパク発現解析を施行した。EVs から抽出された蛋白濃度は BCA 法で 9-82 μg/ml であった。

術前から再発時に上昇するものとして ZNFx が 6 症例の検体から共通して見いだされた。本蛋白を 253 名全ての術前サンプルで評価したところ、151 例で陽性であった。陽性群と陰性群の DFS に関して生存期間解析を行ったところ、陽性群で優位に予後が良かった(p=0.037, HR 0.57)。

考察:既報によると ZNFx は癌種によって発癌への寄与が異なるが、肺癌においては癌抑制因子であると報告されている。術前の採血検体を精査することで、予後不良群に対する追加治療の必要性を示唆するものと考えられた。今後この因子の機能解析を行い、治療標的となりうるか検討が必要である。



引用文献

[1] Diaz, L.A., Jr. and A. Bardelli (2024) *J Clin Oncol* 32:579-586.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Hayato Koba
2. 発表標題 Genomic and proteome analysis using preoperative cell free DNA and extracellular vesicles of lung cancer patients
3. 学会等名 AACR annual meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Murase
2. 発表標題 Prognostic evaluation by using cfDNA in patients with resectable lung cancer
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会 学術集会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hayato Koba
2. 発表標題 Pre-operative markers extracted from extracellular vesicles related with lung cancer relapse
3. 学会等名 AACR annual meeting 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------