

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10678

研究課題名(和文) Liquid biopsyを用いたHCC術後再発予測に有用なバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) New biomarker for recurrence of HCC by using liquid biopsy

研究代表者

谷合 信彦 (TANIAI, NOBUHIKO)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：20287725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者の血液中には循環腫瘍細胞(circulating tumor cell: CTC)と循環DNA(circulating cell-free DNA: cfDNA)が存在する。術後にこれらが採取される症例では体内に微量の腫瘍細胞が残存している(Minimal residual disease: MRD)ことが強く示唆されることが大腸癌患者で報告されてきた。本研究では、肝細胞癌患者でも同様な現象がみられること、cfDNAのうち、特に長さが長いものが術後に採取される症例では再発率が高いことに加え、術前にcfDNAのメチル化レベルが低い症例の再発リスクが高いことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌の術後再発リスクを判断するバイオマーカーは確立されておらず、また、フェトプロテイン、PIVKA2などの腫瘍マーカーは再発例においても必ずしも増加しない。肝細胞癌の再発は遠隔転移ではなく局所再発(肝内再発)が多い点特徴であり、肝機能が保たれ、腫瘍が小さいうちに発見できれば再手術により長期生存あるいは根治が望める。したがって、本法を用いて少量の血液から再発リスクを予測し、ハイリスク群に重点的なサーベイランスを行うことで、治療成績の改善が見込める。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cell (CTC) and circulating cell-free DNA (cfDNA) are detected in patients with malignancy. Presence of CTC and cfDNA indicate minimal residual disease (MRD) which is one of cause of recurrent disease. Some researchers showed that MRD is risk factor of recurrence in colorectal cancer patients who underwent curative surgery. In the present study, we showed that MRD is risk factor in patients with hepatocellular carcinoma. Presence of long fragment cfDNA after surgery and hypomethylation of cfDNA in the pre-operative blood are also risk factor of recurrence.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 lipid biopsy CTC

1. 研究開始の当初の背景

1) 肝癌術後サーベイランスの現状

肝細胞癌(HCC)の切除後再発率は約 80%と高率であるため術後のサーベイランスが重要である。HCC の再発は遠隔転移ではなく局所再発(肝内再発)が多い点の特徴であり、肝機能が保たれ、腫瘍が小さいうちに発見できれば再手術により長期生存あるいは根治が望める。しかし、HCC サーベイランスにおける腫瘍マーカーの有用性は明らかでなく、画像検査によるサーベイランス法は確立されていない。したがって精度の高いサーベイランス法を開発し、定型化することでHCC 治療成績を改善できる可能性がある。

2) Liquid biopsy を用いたバイオマーカーの開発

担癌患者の末梢血には腫瘍細胞(circulating tumor cell: CTC)と腫瘍細胞由来の circulating cell free DNA (ccfDNA)が循環している。末梢血中の ccfDNA および CTC を用いて分子診断を行うことを liquid biopsy と呼ぶ。我々は2012年より liquid biopsy の研究に取り組み、1) ccfDNA を用いた変異の高感度検出法(European society of coloproctology: ESCP2013 Belgrade)、2) ccfDNA 量が根治切除や腫瘍の増大により変化すること(AACR 2015 Philadelphia) 3) 大腸癌肝転移症例に肝切除を行うと癌由来の ccfDNA が減少するが、減少しない症例では早期に再発すること(ESMO 2015 Vienna, AACR2016 New-Orleans, ESMO2016 Copenhagen)、4) ccfDNA の長さの変化が直腸癌術前化学療法の効果予測に有用であること(ESCP2016 Milano)、5) KRAS 変異型症例では ccfDNA の KRAS 変異コピー数が腫瘍マーカーとして有用であること(ESCP2016 Milano)を報告してきた。

これらの研究成果より肝癌においても ccfDNA 量および ccfDNA 内の変異コピー数は腫瘍の増大および縮小により変化することが予想される。この理論に基づき、術前および術後継続的に ccfDNA を測定することで肝癌術後再発高危険群の同定と再発を早期に発見するサーベイランス法が開発できるとの着想に至った。

3) Liquid biopsy 技術の発達

昨年 liquid biopsy 技術に大きな進歩があった。1つはデジタル PCR(dPCR)のマルチプレックス化であり、もう1つは新規 CTC 検出器の開発である。dPCR で1つ1つの変異を検索していくためには大量の DNA を要するため少量の ccfDNA からでは検査に不足することがあった。しかし同時に多数の変異を検出するマルチプレックス技術が開発され、より少ない DNA 量でより多くの変異を検出できるようになった。これまでの多くの CTC 研究には FDA に認可された検出器である CellSearch が用いられてきたが、その感度は低く、進行癌症例から 15-30ml の採血を行っても、1/3 程度の症例からしか CTC が検出できず、検出個数も 3 個以下、EpCAM 異存的な検出であるため Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)をきたした細胞は検知できず、採取された細胞の免疫組織染色を行うことも困難であった。Ion Torrent™ LiquidBiopsy™ Platform は Thermo Fisher Scientific 社から新規 CTC 検出機器である。本機器は CTC と ccfDNA を同時に採取可能であり、これまでの当科での大腸癌臨床検体を用いた検討では CTC 検出感度は 80%、検出個数 20-50 個/ml とこれまでの機器とは桁違いの性能である。

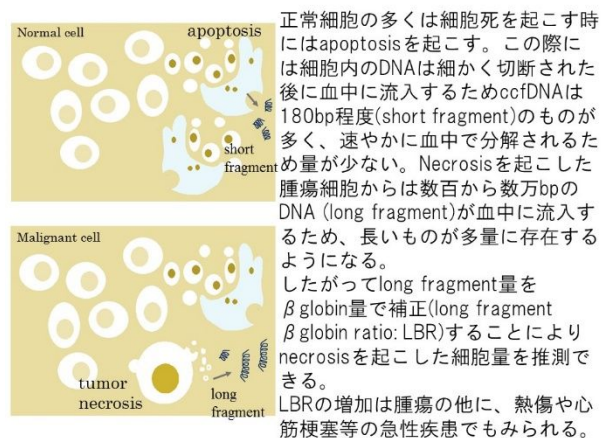
2. 研究の目的

ccfDNA および CTC を用いて(1)HCC 術後の早期再発危険群を同定する方法と(2)再発を早期に同定するサーベイランス法を開発する。

1) Liquid biopsy による再発高危険群の同定

ccfDNA は健常者では 180bp 前後の長さの短い(short fragment)ものが 100ng/ml 程度検出される。担癌患者では short fragment に加え、数百から数千 bp のもの(long fragment)が数百から数千 ng/ml 検出される。腫瘍を切除することで long fragment は減少するが、一方で手術侵襲により一時的に long fragment が増加する。これまでの大腸癌肝転移に対する肝切除の研究から手術侵襲による long fragment の増加は術後 1 週間がピークであり、2 週間以上経過すると侵襲由来の long fragment は激減する。大腸癌肝転移に対する肝切除では術後 1 ヶ月の long fragment

量を β -globin 量で補正したもの(： LBR)が術前値と比較し低下している群では術後 6 ヶ月以内の早期再発率が 11.1%であったのに対し、増加している症例では 92.3%であった(感度 88.8%、特異度 92.3%、陽性的中率 88.8%、陰性的中率 92.3%)。これまでに HCC の早期再発危険群の同定に LBR が用いられた報告はないため、これを検証する意義は大きい。術後に CTC が検出された症例では早期再発率が高いとの報告はあるが、感度は 77%と低い(Lu, et al. Br J Cancer 2011)。本研究用いる CTC 検出器は検出力が格段に高いため、感度の向上が期待できる。



2) Liquid biopsy によるサーベイランス

これまで HCC 術後サーベイランスは α -フェトプロテイン、PIVKA2 などの腫瘍マーカー、および CT、超音波、MRI を用いて行ってきた。しかし再発例においても腫瘍マーカーは必ずしも増加しない。高感度なバイオマーカー開発は肝癌治療成績を飛躍的に改善できる可能性がある。

我々はこれまでに ccfDNA 内の KRAS 変異が大腸癌の再発早期同定(CEA が上昇する前に同定できる)に有用であることを報告してきた。HCC では *p16*, *APC*, *TERT*, *CCND1*, *RB1*, *ASH1L*, *NCOR1*, *MACROD2*, *TTC28* が頻度の高い変異として知られており(国際がんゲノムコンソーシアム)、これらの変異を末梢血から同定する意義は大きい。

CTC が再発の早期同定に有用であったという報告はこれまでにない。これまでの多くの研究では CTC の検出に CellSearch を用いてきた。CellSearch は感度が低いという問題点があったため、再発の早期同定のような目的には向かない。

3. 研究の方法

1) 術前の CTC および ccfDNA、手術切除標本、術後 1 ヶ月目の CTC と ccfDNA を用いて早期再発

危険群を同定する方法を開発する。2)術後1ヶ月目、以降2ヶ月毎のCTC、ccfDNAを用いて術後再発を早期に同定する方法を開発する。

ccfDNAからは総量、long fragment量、グロビンを計測しLBRを求めるとともにp16、TERT等の変異を検出する。切除標本を次世代シーケンサーにて(NGS)我々の開発した肝臓癌パネルを用いて変異の有無を検出する。NGSで検出した変異をccfDNAから検出する。CTCは新規に開発されたIon Torrent™ LiquidBiopsy™ Platformを用いて検出する。

2) サンプル採取

対象は根治切除を行うHCCである。術前および手術1ヶ月後、その後は2ヶ月毎にそれぞれ8mlの採血を行う。

3) ccfDNAの抽出

3000回転/分で10分間遠心後、血漿1mlよりプロメガ社Maxwell RSC Instrumentを用いてccfDNA抽出する。同機器は全自動で70分にて血漿からccfDNAを抽出できる。ccfDNAの抽出にはQuiagen QIAamp Circulating Nucleic Acid Kitが最もよく用いられているが、同一患者の検体を用いたこれまでの検証からMaxwell RSC Instrumentの方がより多くのccfDNAを回収できることを確認している。本研究ではこれまでにない高感度なCTC検出器を用いるが、従来の機器を用いる場合にはCTCよりもccfDNAの方が感度良好である。

4) CTCの回収

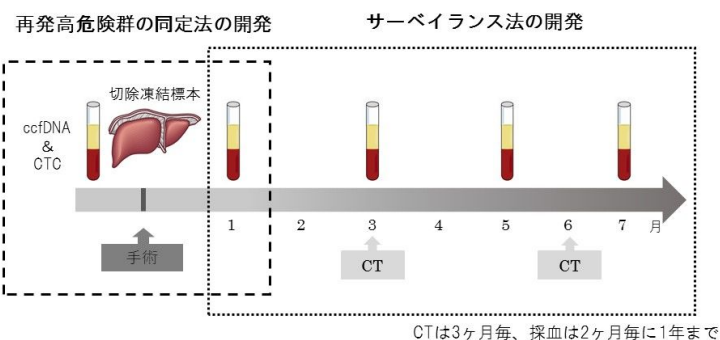
CTCの回収にはIon Torrent™ LiquidBiopsy™ Platformを用いる。cell lineを血中にspikeした予備実験ではCTC1個/mlでも検出できることを確認している。Cell Searchでは1個/15mlであったことを考えると検出力は格段に高い。磁気を用いたpositive selectionとsize-based selectionの2段階のselectionを行うことで高い検出力と80%以上の精製率(約20%の血球細胞が混入)が得られる。最後に免疫組織染色を行うことで、混入した血球細胞を除外する。EpCAMを用いるためEMTをきたした腫瘍細胞をcaptureできない可能性がある。これまでの研究からvimentin等の抗体を用いることでEMTをきたした腫瘍細胞をcaptureできる可能性があることがわかっているが、これについては今後更なる検証が必要である。

5) 癌由来ccfDNA量の測定とccfDNAを用いた早期再発リスク症例の同定と再発の早期同定

細胞が死にDNAがマクロファージに貪食され血中に流入したDNAがccfDNAである。一般に正常細胞の多くはapoptosisをおこすが、apoptosis由来のDNAは細断され、180bp(short fragment)程度になる。necrosisでは細胞内のDNAが一気に血中に流入するため数百から数万bpのccfDNA(long fragment)が検出されるようになる。癌細胞は正常細胞と比較するとnecrosisをおこす



CTC検出器の写真



ことが多いため、long fragment の量は腫瘍細胞量と比例すると考えられている。肝転移症例では LINE-1 の 297bp 量を グロビン量で補正したもの(long fragment -globin ratio: LBR) が最もよく腫瘍量を反映することがわかっているが、HCC で同様の結果が得られるのかは未だ不明である。LINE-1 の長さの違うものや ALU 等を用いた方が良い成績が得られる可能性もあり、検証する必要がある。

肝転移では手術 1 ヶ月後に LBR が低下しなかった症例では術後早期に再発する可能性が極めて高いことがわかっているため、本研究では HCC でも LBR が早期再発リスク症例の同定に有用であるか検証する。LBR の測定にはリアルタイム PCR を用いる。

HCC では *p16*, *APC*, *TERT*, *CCND1*, *RB1*, *ASH1L*, *NCOR1*, *MACROD2*, *TTC28* の変異の頻度が高いことが国際がんゲノムコンソーシアムのプロジェクト研究からわかっている。ccfDNA におけるこれらの変異は腫瘍の存在を示唆するため、これらを術後に測定することで再発高危険群の同定、および再発早期発見のモニタリングに有用である可能性がある。*p16*, *APC*, *RB1* については ccfDNA で検出可能であることをすでに確認している。本研究では HCC において術後に ccfDNA より *p16*, *APC*, *TERT*, *CCND1*, *RB1*, *ASH1L*, *NCOR1*, *MACROD2*, *TTC28* 変異が検出されることが早期再発リスク症例の同定に有用であるか検証する。同時に術後に定期的な採血を行い、画像上再発が同定される前に、ccfDNA からこれらの変異が同定できるか検証する。変異の検出には QuantStudio 3D (Thermo Fisher Scientific)を用いる。

6) CTC を用いた早期再発リスク症例の同定と再発の早期同定

ccfDNA は正常細胞由来のものが混じているのに対し CTC は腫瘍細胞そのものであるため、CTC の残存は腫瘍の残存を意味する。これまで肝細胞癌の早期再発リスク症例の同定や再発の早期発見に CTC が用いられてこなかったのは CTC 検出力の低さが原因であると考えている。本研究では高感度機器を用いることで CTC が早期再発リスク症例の同定や再発の早期発見に有用であるか検証する。術前 CTC 数が多い症例や手術 1 ヶ月後に CTC が検出される症例では再発リスクが高いことが予測されるが、この仮説が正しいか検証する。また再発例では画像で再発が確認される前に CTC が検出される可能性があるため、CTC のモニタリングが再発の早期同定に有用であるか検証する。

4. 研究成果

がん患者の血液中には循環腫瘍細胞(circulating tumor cell: CTC)と循環 DNA(circulating cell-free DNA: cfDNA)が存在する。術後にこれらが採取される症例では体内に微量の腫瘍細胞が残存している (Minimal residual disease: MRD) ことが強く示唆されることが大腸癌患者で報告されてきた。本研究では、肝細胞癌患者でも同様な現象がみられること、cfDNA のうち、特に長さが長いものが術後に採取される症例では再発率が高いことに加え、術前に cfDNA のメチル化レベルが低い症例の再発リスクが高いことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Iwai T, Yamada T, Takahashi G, Takeda K, Koizumi M, Shinji S, Matsuda A, Yokoyama Y, Hara K, Ueda K, Ohta R, Tani ai N, Yoshida H.	4. 巻 46(1)
2. 論文標題 Circulating cell-free long DNA fragments predict post-hepatectomy recurrence of colorectal liver metastases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Surg oncol	6. 最初と最後の頁 108-114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ejso.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Yamada T, et al	4. 巻 99
2. 論文標題 Liquid biopsy for the management of patients with colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 39-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000494411	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 -

1. 著者名 Furuki H, Yamada t, Tani ai N, et al	4. 巻 18
2. 論文標題 Evaluation of liquid biopsies for detection of emerging murgung mutated genes in metastatic colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 975-982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejso.2018.01.224	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamada T, et al
2. 発表標題 Emergence of KRAS mutation may play a major role in the secondary resistance to EGFR blochade.
3. 学会等名 ESMO-GI（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田岳史、他
2. 発表標題 liquid biopsyを用いた切除不能RAS野生型大腸癌に対する抗EGFR抗体による早期腫瘍縮小効果の予測
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田岳史、他
2. 発表標題 Liquid biopsyを用いたReal-time Precision Medicine
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古木裕康、山田岳史、谷合信彦、他
2. 発表標題 Circulating tumor DNAを用いた大腸癌肝転移術後の早期再発危険群の同定
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古木裕康、山田岳史、谷合信彦、他
2. 発表標題 Detection of emerging somatic mutations in metastatic colorectal cancer using original custom panel of NGS
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古木裕康、山田岳史、谷合信彦、他
2. 発表標題 liquid biopsyを用いた大腸癌肝転移術後の微小残存病変検出の可能性
3. 学会等名 日本消化器癌発生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷合信彦、山田岳史、吉田寛
2. 発表標題 Liquid Biopsyによる大腸癌肝転移肝切後再発高リスク症例に対する新バイオマーカー
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017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
研究 分担者	山田 岳史 (YAMADA TAKESHI) (50307948)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究 分担者	吉田 寛 (YOSHIDA HIROSHI) (60246999)	日本医科大学・大学院医学研究科・教授 (32666)	