

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15326

研究課題名(和文) 消化管癌のctDNAによる長期間モニタリングシステムの構築

研究課題名(英文) Patient-specific circulating tumor DNA monitoring using digital PCR in gastrointestinal cancer

研究代表者

佐藤 慧 (Kei, Sato)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60803591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌、胃癌、大腸癌を含む消化管癌について、原発巣の次世代シーケンズによる遺伝子パネル解析にて検出された症例特異的変異を標的とし、治療経過中の腫瘍量の変化をctDNAを用いて追跡できるかを検討した。ctDNA変動はCTなどの画像所見や腫瘍マーカーに比して正確に治療効果を反映することを明らかにした。ctDNA陽性率は食道癌、大腸癌で約80%、胃癌で約40%であった。大腸癌、胃癌ではさらに原発巣の3か所から組織採取を行い解析した。3か所で共通する変異は非共通変異に比べctDNA陽性率が高かった。本研究のctDNAモニタリングシステムは進行消化管癌患者に有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌、胃癌、食道癌を含む消化管癌において、原発巣の変異スクリーニングにより検出された症例特異的変異のctDNAモニタリングが、1)再発・再増大の早期検出、2)無再発の確認、3)正確な治療効果判定、に有用である可能性を明らかにした。ctDNA検査が日常臨床検査として普及するにはいくつかの問題点があるが、本研究のdPCRを用いたctDNA解析は低コストで短いturnaround timeで検査可能であり頻回な検査に適している。また、本研究を通して、組織特異的遺伝子パネルの有用性、1か所生検や少数変異で効率的なctDNAモニタリングが十分可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to monitor therapeutic response using circulating tumor DNA (ctDNA) using digital PCR (dPCR) with individual tumor-specific mutations as identified from next generation sequencing (NGS) panel in patients with gastrointestinal cancer, including esophageal, gastric, and colorectal cancer. The dynamics of ctDNA level reflected therapeutic response more accurately compared with CT. In a relapsed patient, ctDNA elevation was observed several months before the recurrence was diagnosed by CT scan. The rate of positive ctDNA was about 80% in esophageal and colorectal cancer patients and about 40% in gastric patients, respectively. Multi-region samplings (three sites) from the resected specimens were also performed in colorectal and gastric cancers. The positive rate of ctDNA was higher in common mutations among three sites than non-common mutations. Our ctDNA monitoring system using may be useful for advanced gastrointestinal cancer patients.

研究分野：消化器外科

キーワード：Circulating tumor DNA 大腸癌 胃癌 食道癌 変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における死亡原因の1/3を占める悪性腫瘍の中でも消化管がんは死因の上位を占め、男性では胃がん2位・大腸がん3位、女性では大腸がん1位・胃がん2位となっている。また食道がんはその発生頻度は低いものの予後は消化管がんの中で最も不良であり、近年、食道胃接合部がんの発生率の上昇も懸念されている。消化管がんの根治的治療は外科的切除だが、進行がんでの切除後再発率は高く、術前後の補助化学療法・放射線治療を含めた集学的治療が行われている。大腸がんでは遠隔転移を有する患者でも転移巣の切除により予後改善が得られ、食道がん放射線療法後再発や切除後のリンパ節再発も限局した病変では治療により根治が得られる患者も多く、治療経過中の病勢の正確な診断、転移・再発病変を微小なうちに診断することが重要である。しかしながら、CT、PETなどの画像診断では微小病変の評価や、消化管狭窄に伴う周辺反応性間質性変化、胸腹水貯留、リンパ節腫大などの非悪性病変との鑑別も困難である。CEAに代表される血清腫瘍マーカーは、簡便な検査法であるが特異度・鋭敏度は低く、正確に病勢を評価できない場合が多い。実際既存のfollow up方法では大腸がん再発病変の切除率は上昇させるものの、生存率の向上には寄与していないことが報告されている(Primrose et al, *JAMA*, 2014)。これらの背景から体内腫瘍細胞量を鋭敏に検出できる方法が必要と考えられる。

血中には体内の細胞から遊離したDNA断片が存在するが、担癌患者では癌細胞由来の遊離DNAが循環している(Circulating tumor DNA: ctDNA)。近年、個別化医療および低侵襲性の観点からctDNAを用いたliquid biopsyが注目されている。申請者は先行研究として治癒切除可能大腸癌を対象にctDNA解析を行った。通常1つの腫瘍には数個~数十個の遺伝子変異が集積しており、その網羅的解析には次世代シーケンス(NGS)技術が必要であるが、当初血漿DNA中の0.1%~数%程度の微量なctDNAの検出はNGSでは技術的に困難であった。そこで0.001%まで高精度に定量可能な第3世代PCR技術であるdigital PCR(dPCR)を用いctDNAの定量を行った。これらの技術を合わせ『原発巣のNGSによる網羅的変異解析を行い、検出された変異についてdPCRによるctDNA monitoringを施行する』というliquid biopsy systemを構築した。早期がんを含めた21例の大腸がん(Stage I-III)のうちdPCRを施行した24変異中8変異(33%)で術前のctDNA検出と術後の低下が確認され、正確にmonitoring可能なことを示した(Sato K. *PLoS One* 2016)。この結果を受けて当研究室ではctDNAを用いた大腸がん患者の治療後長期monitoringを開始している。また遺伝子変異状況や治療手段の異なる食道がん、胃がんを含めた消化管がん全般を対象を広げliquid biopsy研究を進めている。

2. 研究の目的

近年のがんゲノム診断では対象とする遺伝子を数十個~数百個に絞りNGSを行う遺伝子パネル検査が用いられることが多くなっている。標的領域を絞ることで微量検体からの解析が可能となり、また分子バーコード法を用いたerrorの減少によりctDNAを直接NGS解析する報告も見られる。一方、dPCRではKRAS、BRAF、EGFR、PIK3CAなどの多種のがんにわたり見られるHotspot変異には動作確認済みのAssay kitが市販されており、血漿を用いたmonitoringや治療経過中の薬剤耐性変異の出現の報告も見られる。しかし、いずれの手法も長所短所が存在し、ctDNA monitoringの実臨床への応用にはコストや解析にかかる労力も考慮し、がんの種類によるアプローチ法の選択と工夫が必要である。本研究ではこれまでの研究室独自に培った経験をもとに、食道がん、胃がん、大腸がんの消化管がんを対象として、個々のがん腫における共通部分・相違部分を比較しながら、効率的なctDNA monitoring法を検討する。本研究により、大腸がんのようにHotspot変異を有するがん、変異の比較的少ないがん、食道がんのようにHotspot変異を有さず多数の遺伝子に変異が生じるがん、胃がんのように腫瘍内でのheterogeneityに富むがん、接合部がんのように起源となる細胞・臓器の確定が困難ながんなど多様ながんに対するliquid biopsyの応用の仕方が明らかにできるものと思われる。

3. 研究の方法

大腸癌、食道癌、胃癌を対象とし、治療前生検あるいは初回手術治療患者では切除検体より癌組織を採取する。治療前および治療期間中、サーベイランス期間中のCTや腫瘍マーカーなど既存検査に合わせて血液検体を採取する。末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)をコントロールとしIon PGM™シーケンサー(Thermo Fisher Scientific社)を用いNGSによる遺伝子パネル検査を施行した。検出された症例特異的変異に対し、それぞれ変異検出用のProbe/Primerセットをデザイン・合成し(日本遺伝子研究所)、dPCRを用いて経時的に採取された血漿サンプルのctDNA解析を施行した。観察期間中のctDNAの推移と手術、化学療法・放射線療法の治療効果やfollow中の再発の予測について評価した

4. 研究成果

1) 食道癌原発巣遺伝子変異解析

食道癌では、食道・頭頸部扁平上皮癌で変異頻度の高い31遺伝子を標的とした独自デザインの食道癌パネル(SCC panel)を用いて変異スクリーニングを行った。35例のNGS解析では、変異アリル頻度(Variant allele frequency [VAF])>2%の変異は計221個検出された。TP53変異は34例(97%)で検出された。3例以上で変異が検出された12遺伝子を示す(図1)。検出された症例特異的変異のうち1症例につき1~3個の変異を対象としてctDNA解析を行ったが、原発巣VAF

の高い遺伝子変異は ctDNA 陽性率が高く、原発巣で低 VAF の変異は ctDNA 陽性率が低かった。さらに *KMT2C*, *KMT2D*, *CREBBP* は変異検出頻度が高く 1 症例に同一遺伝子内に変異が多発する症例も多数見られたが、いずれの変異に対しても有効な dPCR Probe/Primer は作成できず、ctDNA-dPCR 解析には適さない遺伝子変異であると考えられた。

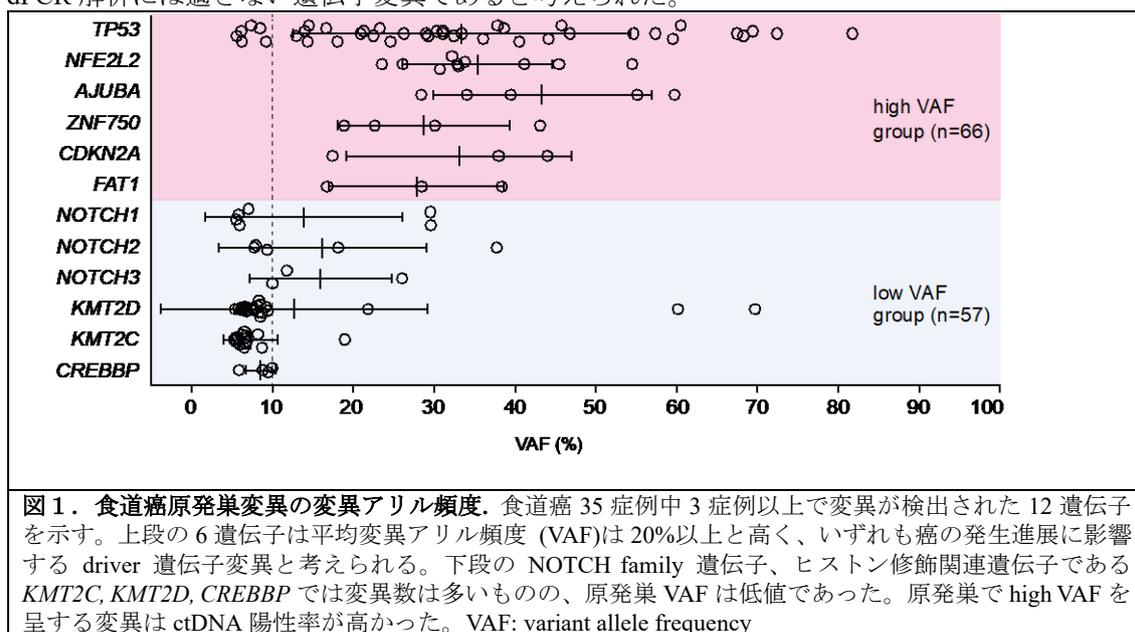


図1. 食道癌原発巣変異の変異アレル頻度. 食道癌 35 症例中 3 症例以上で変異が検出された 12 遺伝子を示す。上段の 6 遺伝子は平均変異アレル頻度 (VAF) は 20% 以上と高く、いずれも癌の発生進展に影響する driver 遺伝子変異と考えられる。下段の NOTCH family 遺伝子、ヒストン修飾関連遺伝子である *KMT2C*, *KMT2D*, *CREBBP* では変異数は多いものの、原発巣 VAF は低値であった。原発巣で high VAF を呈する変異は ctDNA 陽性率が高かった。VAF: variant allele frequency

2) 食道癌 ctDNA モニタリング

ctDNA モニタリングを行った食道癌症例を示す (図 2)。本症例は粘膜下層浸潤にとどまる表在癌であり、術前 CT 検査では転移所見は見られず clinical Stage I の症例であり、初回治療として手術が施行された。切除標本で複数の微小リンパ節転移が認められ pathological stage IIIA の診断となった。また口側断端の癌からの距離が短かったため、補助療法として術後放射線化学療法が施行された。無再発で 3 年以上経過していたが 1,336 日の follow up の CT 検査にて左胸壁に腫瘍が検出された。原発巣 NGS 解析で検出された変異のうち、変異アレル頻度の高い順に *TP53*, *AJUBA* 変異を ctDNA 解析の対象とし変異検出用 dPCR Probe/Primer をデザイン・合成した。ctDNA 検査では術前より陰性が持続していたが、1,336 日 (Time point 16) の腫瘍検出時点では、*TP53* および *ZNF750* 両者の ctDNA の上昇が認められた。胸壁腫瘍については良性所見、原発巣肺癌、胸壁腫瘍などとの鑑別が必要であったが、ctDNA 陽性化から食道癌再発の診断は容易であった。さらに *TP53* 変異に関しては画像で病変が検出される 4 か月前にすでに ctDNA が上昇しており、再発の早期発見に ctDNA 検査が有用である可能性が示された。胸壁の再発転移巣に対し陽子線療法が施行され、病変は消失し効果判定は CR が得られ、追加化学療法が施行された。ctDNA は腫瘍縮小に一致して陰性化し持続している。腫瘍マーカー (SCC, CEA, CYFRA) の推移も示すが、胸壁再発時点で腫瘍マーカーはすべて陰性、陽子線治療後の肺炎に伴い CYFRA の増加が見られ、既存の腫瘍マーカー検査では偽陰性・偽陽性が多いことがわかる。ctDNA モニタリングでは、1) 再発・再増大の早期検出、2) 無再発の確認、3) 正確な治療効果判定、において臨床的妥当性を有することを示している。全 34 例で ctDNA モニタリングにより、1) 再発・再増大の早期予測は 6 例、2) 無再発状態の確認は 18 例、3) 治療効果の判定は 24 例で評価可能であった。34 例中 31 例 (91%) でいずれかの臨床的妥当性が示された。本症例は術後病理検査で微小リンパ節転移が認められたものの、原発巣は表在癌であり腫瘍細胞量は少なく、治療前 ctDNA が陰性であった可能性がある。しかし、切除後 3 年以上偽陽性なく陰性を維持し、再発出現時およびそれに先行して ctDNA が上昇していることから、根治治療後のサーベイランスに有用と考えられる。また、胸壁の再発病巣も腫瘍細胞量としては術前原発巣と大差ないにもかかわらず ctDNA 上昇を認めていることは、ctDNA は腫瘍細胞量自体より癌細胞の分裂速度 (腫瘍増大速度) を鋭敏に示している。

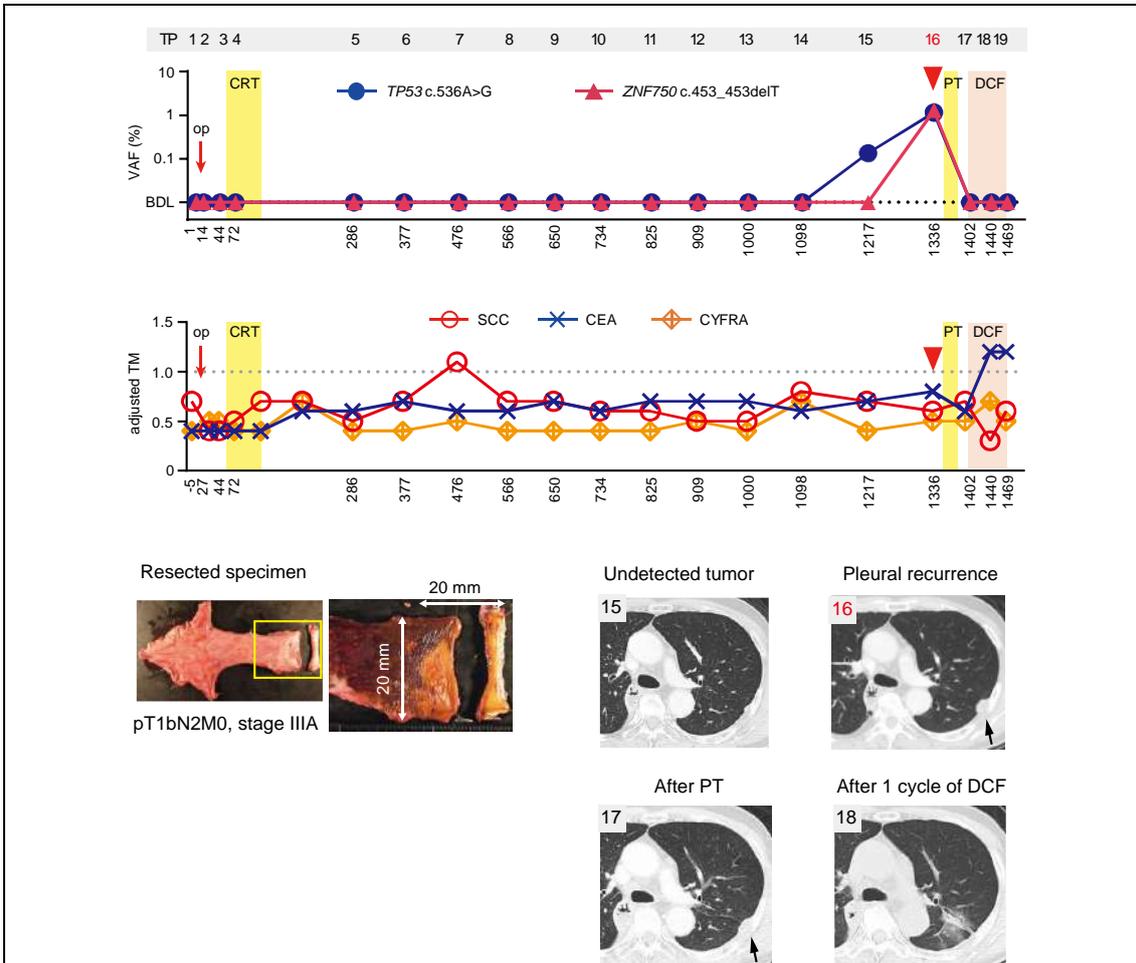


図2. 食道癌症例の ctDNA モニタリング. 上段: ctDNA モニタリング. 原発巣で検出された *TP53* および *AJUBA* の 2 つの症例特異的変異を用いてモニタリングした。中段: 腫瘍マーカー *SCC*, *CEA*, *CYFRA* の経時的変化。それぞれの正常値条件を 1.0 に *ajust* している。下段: 画像所見。左) 切除標本写真: 胸部上部食道に 20x20mm のルゴール不染の表在癌を認める。右) 胸部 CT: Time point (TP16) で左胸膜に再発病巣を認める。4 か月前 (TP15) では認められず、陽子線治療後には縮小、消失した。TP, time point; VAF, variant allele frequency, CRT, chemoradiotherapy; PT, proton beam therapy, DCF, docetaxel/cisplatin/5-FU, TM, tumor marker.

3) 胃癌・大腸癌原発巣変異解析

胃癌および大腸癌症例では、切除標本原発巣の 3 か所から組織採取し、食道癌と同様に PBMC をコントロールに NGS を用いた変異解析を行った (図 3)。胃癌・大腸がんの解析ではがんで異常が報告される 151 遺伝子を標的とした Pan-cancer panel (ClearSeqSS) パネルを用いた。3 か所で共通する Founder mutation と genetic heterogeneity を示す 1,2 か所のみに変異を認める Non-founder 変異が検出された。大腸癌では 1 症例あたり Founder 変異: 3.7 (0-9) 個, Non-founder 変異: 8.4 (0-55) 個、胃癌では Founder 変異: 2.0 (0-5) 個, Non-founder 変異: 8.3 (0-69) 個認められた。いずれの症例でも ctDNA 陽性率は Non-founder 変異に比べ、Founder 変異で高かった。また、原発巣および ctDNA の変異アリル頻度の比較では、原発巣変異アリル頻度が高いほど ctDNA の VAF も高かった。

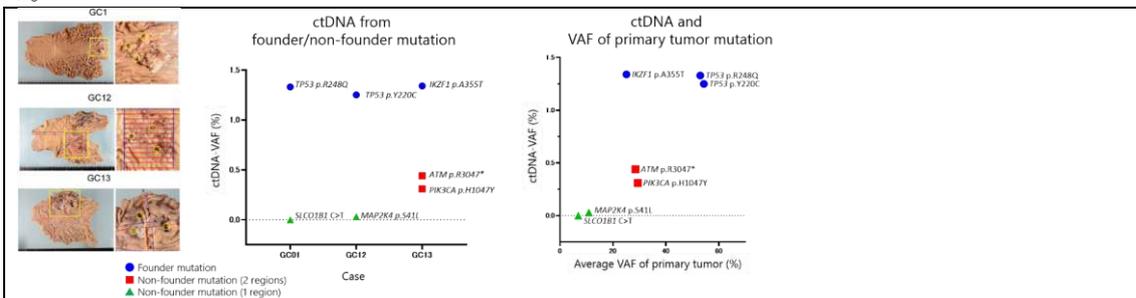


図3. 胃癌組織採取部位と原発巣変異および ctDNA. 左) 胃癌切除標本の組織採取部位. 原発巣 3 か所より組織採取しそれぞれより DNA を抽出した。3 か所共通変異を Founder 変異、2 か所あるいは 1 か所のみで検出された変異を Non-founder 変異としている。中) 3 例の ctDNA-VAF では、Founder 変異は Non-founder 変異に比べ ctDNA-VAF が高かった。右) 原発巣の VAF が高い症例は ctDNA-VAF も高値であった。VAF, variant allele frequency

4) 胃癌・大腸癌 ctDNA 解析

食道癌と同様に原発巣で検出された症例特異的変異に対し Probe/Primer を作成し dPCR を用いて ctDNA 解析を施行した。食道癌と異なり大腸癌・胃癌では *KRAS*, *BRAF*, *PPK3CA* 遺伝子の hotspot 変異がしばしば見られ、これらの変異についてはデザイン・合成の時間・費用が省略可能であった。治療前 ctDNA 陽性率は大腸癌で 83.3%、胃癌で 33.3%であった。胃癌における ctDNA 低陽性率に関しては、使用したパネルに日本人胃癌で変異頻度の高い遺伝子が搭載されていないこと、非腫瘍性の間質の増生に富むスキルス胃癌では実際の腫瘍細胞量が少なく血中に ctDNA が放出されにくいことが考えられた。また、転移再発形式として腹膜播種では ctDNA 陽性率が低かった。ctDNA は癌細胞のアポトーシスや壊死により核から DNA が遊離し血中へ放出されることにより検出されるが、腹膜播種という状態が癌細胞死の生じにくい環境である可能性や腹水から血中へ ctDNA が移行しにくい可能性などが考察された。今後癌の種類や状態に応じた詳細な ctDNA 放出のメカニズムの解明が必要と思われた。

5) 胃癌・大腸癌の ctDNA モニタリング

大腸癌・胃癌でも食道癌と同様に ctDNA モニタリングが、1) 再発・再増大の早期検出、2) 無再発の確認、3) 正確な治療効果判定、に有用である可能性を明らかにしている。大腸癌 ctDNA モニタリングの 1 例として、遠隔転移を有する重複大腸癌症例を示した (図 4)。右側結腸 (盲腸) および左側結腸 (S 状結腸) にそれぞれ T4a, T3 の原発巣、リンパ節転移および多発肝転移・肺転移を有する Stage IV 症例である。症状コントロールのため初回治療として両原発巣の切除が行われた。術後 1 次化学療法が行われ、その後心不全症状見られ 2 次化学療法へ変更するも、徐々に腫瘍増大を認め緩和治療に移行した。原発巣変異解析では、両側とも *TP53*, *APC*, *KRAS* 遺伝子の変異を認めたが、いずれも異なる変異である。これら 6 変異を用いて ctDNA モニタリングを施行している。左側結腸癌の ctDNA はいずれも原発巣切除後に陰性化し、その後観察期間中陰性を持続した。一方、右側結腸癌由来の ctDNA は術後も陽性が持続し、化学療法により一次的な減少は見られるものの、病勢悪化とともに上昇した。このことから遠隔転移は右結腸癌に由来し、左結腸癌は漿膜浸潤・リンパ節転移を有する進行癌であるが完全切除が施行できていることがわかる。本症例は両側とも *KRAS* 変異を有しており、抗体治療を含む化学療法レジメに相違はないが、ctDNA モニタリングを用いた治療方針決定の有益性を示す重要な所見であろう。

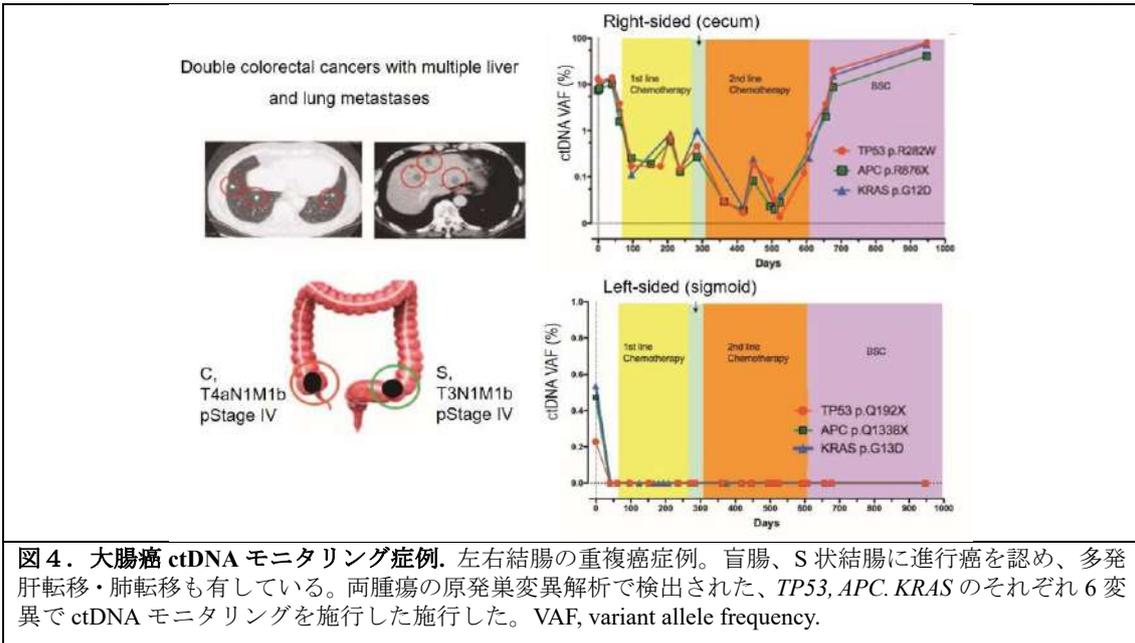


図 4. 大腸癌 ctDNA モニタリング症例. 左右結腸の重複癌症例。盲腸、S 状結腸に進行癌を認め、多発肝転移・肺転移も有している。両腫瘍の原発巣変異解析で検出された、*TP53*, *APC*, *KRAS* のそれぞれ 6 変異で ctDNA モニタリングを施行した。VAF, variant allele frequency.

ctDNA 解析における近年の報告では NGS を用いた broad-coverage assay によるものが多い。NGS は組織採取困難な症例や癌の進展にともない新たに獲得される変異の検出、治療法のない癌種や状態での薬剤の投薬根拠となる変異の検出には、いわゆる Liquid biopsy として最も適した方法と考えられる。しかし、治療期間中の頻回な検査や長期間の follow up など多数の癌患者で行うことは、コストや解析時間から現段階では困難と思われる。また、0.1%以下の微量な ctDNA はいずれの手法を用いても、偽陽性・偽陰性は完全に避けられないため、異なる手法による検証も必要である。図の大腸癌 ctDNA モニタリングに示されるように、dPCR を用いた本解析では経過中 20 以上の time point で頻回かつ長期の ctDNA 検査がなされており、検査結果が得られるまでの turn-around time が 1 日程度であることから、日常臨床での decision-making に有用であることが予想される。治療法決定に多くの情報が必要な場合の NGS 解析と治療効果の頻回な判定、長期間の再発モニタリングには dPCR と、両 ctDNA 解析手法を合わせたシステムの確立が重要であろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Otsuka Koki, Kimura Toshimoto, Matsuo Teppei, Fujii Hitoshi, Yaegashi Mizunori, Sato Kei, Kondo Suguru, Sasaki Akira | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Laparoscopic Low Anterior Resection with Two Planned Stapler Fires | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 JSLs : Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons | 6. 最初と最後の頁 e2018.00112 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4293/JSLs.2018.00112 | 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 Akiyama Yuji, Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Nikai Haruka, Sato Kei, Baba Shigeaki, Chiba Takehiro, Kimura Toshimoto, Takahara Takeshi, Nitta Hiroyuki, Otsuka Koki, Mizuno Masaru, Kimura Yusuke, Koeda Keisuke, Sasaki Akira | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Evaluation of the need for routine feeding jejunostomy for enteral nutrition after esophagectomy | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease | 6. 最初と最後の頁 6854 ~ 6862 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2018.11.97 | 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 Nishizuka Satoshi S., Sato Kei A., Hachiya Tsuyoshi | 4. 巻 1908 |
| 2. 論文標題 A Pipeline for ctDNA Detection Following Primary Tumor Profiling Using a Cancer-Related Gene Sequencing Panel | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Methods Mol Biol | 6. 最初と最後の頁 229 ~ 241 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9004-7_16 | 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 Akiyama Yuji, Iwaya Takeshi, Endo Fumitaka, Nikai Haruka, Sato Kei, Baba Shigeaki, Chiba Takehiro, Kimura Toshimoto, Takahara Takeshi, Otsuka Koki, Nitta Hiroyuki, Mizuno Masaru, Kimura Yusuke, Koeda Keisuke, Sasaki Akira | 4. 巻 403 |
| 2. 論文標題 Thoracoscopic esophagectomy with total meso-esophageal excision reduces regional lymph node recurrence | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery | 6. 最初と最後の頁 967 ~ 975 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00423-018-1727-5 | 査読の有無 無 |
| 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mizunori Yaegashi, Takeshi Iwaya, Kei Sato, Fumitaka Endo, Masashi Fujita, Hidewaki Nakagawa, Satoshi Nishizuka |
| 2. 発表標題 The effect of primary tumor heterogeneity on circulating tumor DNA detection in colorectal cancer patients |
| 3. 学会等名 日本癌学科会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mizunori Yaegashi, Takeshi Iwaya, Masashi Fujita, Zhenlin Ju, Doris Siwak, Kei Sato, Fumitaka Endo, Ryo Sugimoto, Tamotsu Sugai, Lance Liotta, Yilling Lu, Gordon Mills, Hidewaki Nakagawa, Satoshi S. Nishizuka |
| 2. 発表標題 The clinical utility of ctDNA in colorectal cancer validated by multiregional sequencing and protein analysis |
| 3. 学会等名 アメリカ癌学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019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 |
| | | |