

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09224

研究課題名(和文) Circulating tumor DNA検査の臨床導入における課題点の克服

研究課題名(英文) Overcome of issues in introduction to medical practice of Circulating tumor DNA monitoring

研究代表者

遠藤 史隆 (Endo, Fumitaka)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：70714442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：われわれが先行研究で開発した『原発巣変異スクリーニングで検出された症例特異的変異より少数変異を選択し、digital PCR (dPCR)を用いてcirculating tumor DNA (ctDNA)をモニタリングする』システムを用いて、食道癌、大腸癌、胃癌においてctDNAモニタリングの「早期再発発見」「無再発状態の確認」「治療効果判定」における妥当性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌、大腸癌、胃癌の治療において、dPCRを用いた症例特異的変異を対象としたctDNAモニタリングは、早期再発発見、無再発の確認、正確な治療効果判定、において臨床的妥当性を有する。10%程度の患者でctDNAの検出しにくい病態が存在するが、多数の症例で画像診断や腫瘍マーカーなど既存検査の診断精度を上回っており、ctDNA解析を中心としたがん診療が期待される。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we established tumor burden monitoring with ctDNA using next generation sequencer for mutation detection in primary tumors and digital PCR for ctDNA monitoring in blood samples. In this study, we demonstrated that frequent tumor burden monitoring using tumor-specific ctDNA analyzed by dPCR can offer timely treatment outcome information and provide potential opportunities for early intervention and selection of alternate, more effective relapse treatments during the treatment course of patients with esophageal cancer or colorectal cancer or gastric cancer. In addition, our results indicate that the high sensitivity of dPCR is a useful validation of relapse-free status.

研究分野：臨床腫瘍学、分子治療学、外科学

キーワード：circulating tumor DNA digital PCR 消化管癌 バイオマーカー 次世代シーケンサー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

血中には体内で細胞死を起こした細胞から遊離した DNA が存在するが、担癌患者では原発腫瘍に存在する変異遺伝子と同じ変異を持つ DNA (Circulating tumor DNA : ctDNA) が血中を循環している (Schwarzenbach et al, *Nat Rev Cancer Res* 2011)。ctDNA の検出は体内に癌細胞が存在する定性的な診断となり、その特異性から優れた癌の存在診断マーカーとなりうる (Shaw et al, *Genome Res* 2012)。ctDNA 解析では、現在次世代シーケンサー (Next generation sequencer : NGS) を用いた遺伝子パネル検査が保険適応となっているが、本検査は標準治療終了患者の薬剤提案を目的とした変異スクリーニング検査であり、症例ごと 1 回に限定されている。また、薬剤提案による治療到達率は 10% 以下である。申請者らは、症例特異的な少数の変異を対象として、digital PCR (dPCR) を用いた ctDNA モニタリングについて検討を重ねている。

内視鏡切除の可能な早期癌を含めた切除可能大腸癌における先行研究では、原発巣切除検体における遺伝子変異を NGS にて解析後、同定された遺伝子変異について腫瘍切除前後での血漿中の変異遺伝子量の変化を dPCR で定量可能かを検討した。原発巣切除前後の ctDNA 変動を確認した (Sato et al, *PLoS One* 2016)。同研究で使用した Vacutainer 採血管 (CPT 採血管) は採血後 2 時間以内に遠心分離する必要があるが、時間的制約が大きかった。そこで作業効率を向上させるため新規採血管を Cell-Free DNA BCT® (BCT 採血管) ( Streck 社) を採用した。検体保存期間中の血中有核細胞の genome DNA が血漿内へ流出することを防止することで、採血後室温で 14 日間保存でも血中遊離 DNA 量の安定化が見られることを報告した (Endo, et al. *medRxiv*.2020)。

原発巣変異スクリーニングに関しては、食道癌では、がん関連遺伝子上の Hotspot 領域を標的とした Cancer Hotspot Panel v2 (CHPv2) を用いたターゲットシーケンスを行ったが、同定された遺伝子変異は *TP53* (6 個)、*FBXW7* (1 個) のみであった。食道癌では、CHPv2 の有用性は低いことが示唆されたため、効率的変異同定には組織・癌種特異的なターゲットシーケンスが必要と考えられた。そこで、食道癌症例で 5% 以上の頻度で変異が報告されている 31 遺伝子を標的とした Ion Torrent プラットフォーム用のカスタムパネル (食道癌カスタムパネル) を作製することで変異同定効率の改善を得た。したがって、疾患特異的な遺伝子パネルの必要性が示唆された。

腫瘍組織では部位により検出変異が異なる genetic heterogeneity が存在するが、検体採取部位で検出される変異と血中で検出される ctDNA との関連性も問題となる。したがって、組織採取部位や個数も ctDNA 検査に影響を与えうる。

ctDNA 検査に影響をあたえうる患者病態の因子として、分裂期にある腫瘍細胞が多い場合 ctDNA 検出率は高いが、増殖スピードが緩徐な腫瘍、スキルス癌など間質が豊富で腫瘍細胞量自体は少ない腫瘍では、一般的に検出率が低い。また、肝転移や腹膜播種、肺転移など転移臓器、再発形式によっても ctDNA 検出率が異なることが報告されている。

以上のように、ctDNA モニタリング検査は解析に多くの工程があり、臨床での実装にむけてさまざまな問題点が生じることが予想される。

## 2. 研究の目的

先行研究で構築した「原発巣変異スクリーニングより検出された症例特異的な変異の digital PCR を用いた ctDNA モニタリング」システムをベースとし、本研究では食道癌、大腸癌、胃癌を中心とした消化器癌を対象とし、dPCR を用いた長期間の ctDNA モニタリングを行い ctDNA 検査の臨床的妥当性の検証および課題点の抽出と改善について検討した。

## 3. 研究の方法

内視鏡的あるいは手術にて採取した原発巣切除検体の一部から抽出した DNA を NGS 解析し、腫瘍特異的な遺伝子変異を同定した。NGS 解析には先行研究と同様、半導体型次世代シーケンサー (Ion PGM/Proton, Thermo Fisher 社および HiSeq 2000, illumina 社) を用いた。NGS で同定された腫瘍特異的な変異遺伝子に対して、Hypercool Primer&Probe™ 技術 (日本遺伝子研究所) を用いて、Primer/Probe セットを作製した。血液サンプルは、各治療前後、follow up 中は 3 か月ごとの CT/腫瘍マーカー採取に合わせた time point、で採取した。血液検体は各 time point で 16mL 採取し、血漿を遠心分離し DNA 抽出まで凍結保存した。末梢血単核細胞 (PBMC) も NGS 解析の際、原発巣の腫瘍特異的な変異の対照とするため、冷凍保存した。DNA 抽出は、血漿からは QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen 社) を使用し、腫瘍組織および PBMC からは QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen 社) を使用して DNA を抽出した。Digital PCR は、QuantStudio 3D dPCR System (Thermo Fisher Scientific 社) を使用した。診療経過中の時系列血漿 DNA について、dPCR を用いて ctDNA 定量解析を行った。

## 4. 研究成果

食道癌 36 例、大腸癌 12 例、胃癌 10 例で、原発巣変異解析、1~5 個の症例特異的な変異を選定し、変異検出用 Probe を作成し、ctDNA モニタリングを行った。食道癌の 92%、大腸癌の 85%、

胃癌の 33%で、ctDNA 検査の「早期再発発見」「無再発状態の確認」「治療効果判定」における臨床的妥当性を明らかにした (Iwaya T, et al. *Gastroenterology*, 2021; Yaegashi M, et al. *Br J Cancer*, 2021; Sasaki N, et al. *Plos One*, 2020 )。

食道癌の症例は順調に集積・解析でき、検討の結果として、ctDNA モニタリングでは既存の CT 画像診断と比較して、1)数カ月先行し再発・再増大を予測可能であること、2)非特異的画像所見によらず腫瘍細胞量を評価できることから正確な化学・放射線療法の効果判定が可能であること、3)治療後の ctDNA の持続陰性化により無再発状態の確認が可能であることが示唆された (図 1)。

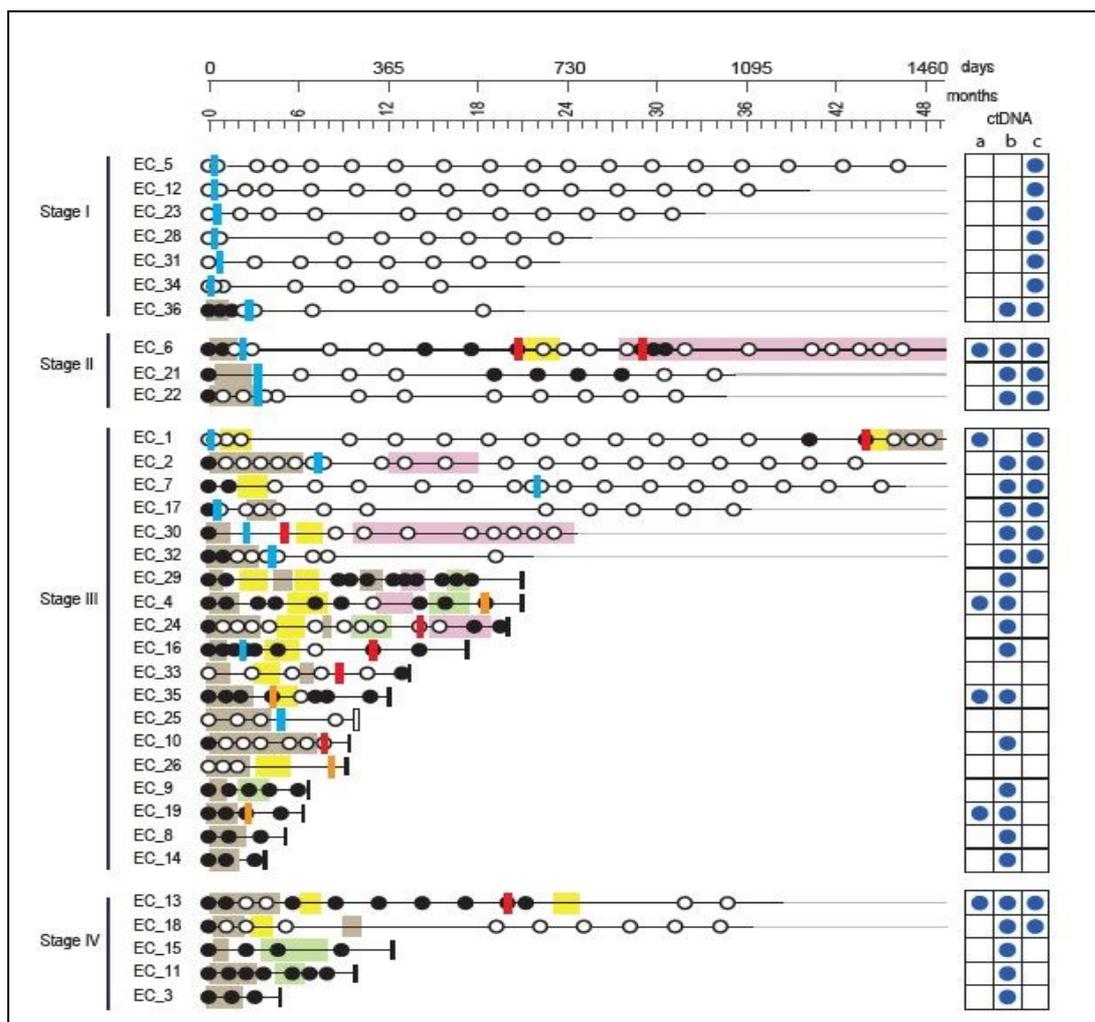
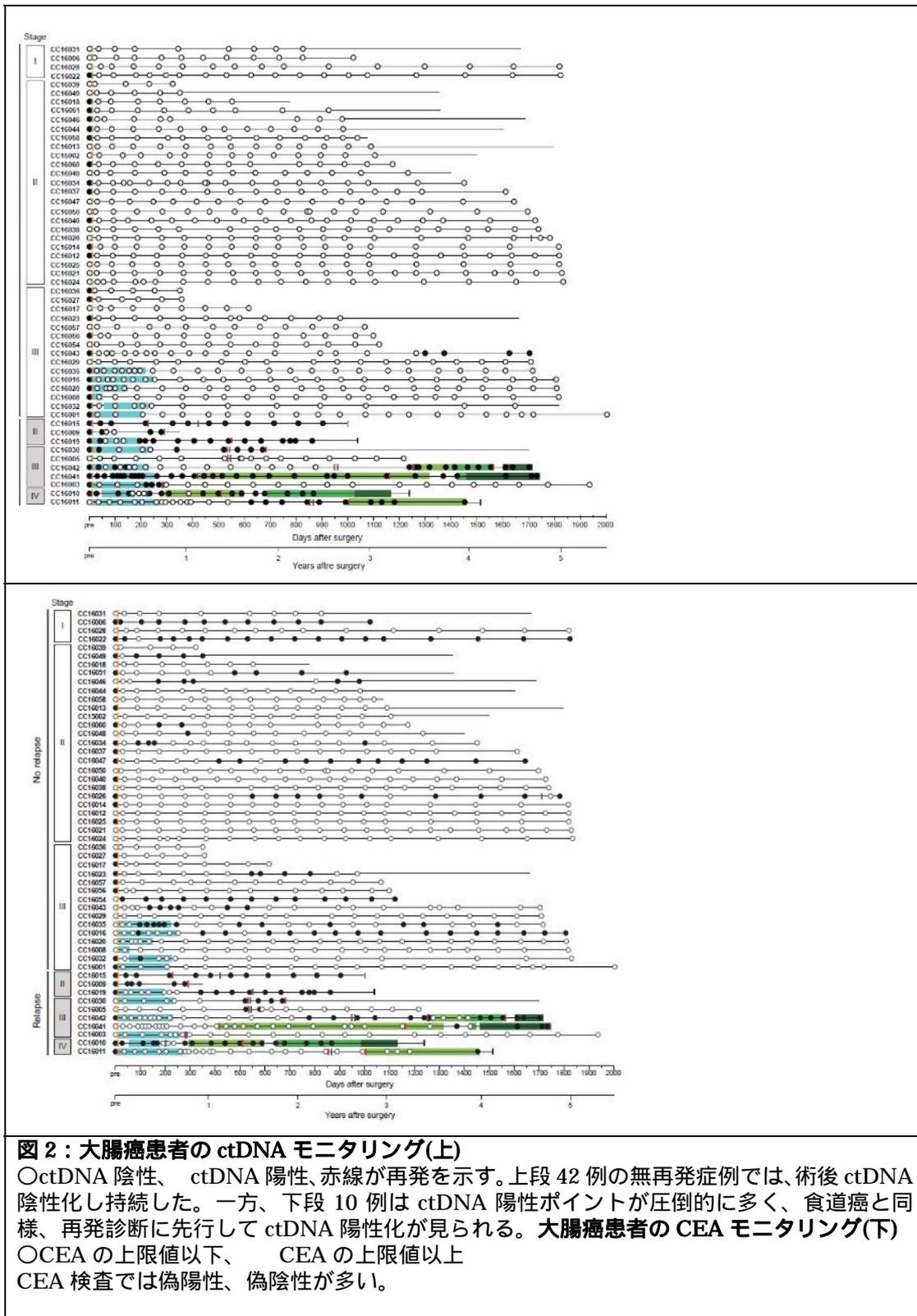


図 1：食道癌患者の ctDNA モニタリング

○ctDNA 陰性、● ctDNA 陽性、赤線が再発を示す。再発診断に先行して ctDNA 陽性化が見られる。右 Box はそれぞれの症例で ctDNA 検査の妥当性項目 a. 早期再発発見、b. 治療効果判定、c. 無再発の確認、に合致しているかを示している。

大腸癌、胃癌では原発巣 3 か所で遺伝子変異スクリーニングを行い、原発巣 genetic heterogeneity におよぼす影響を検討した。原発巣で検出された変異のうち、変異アリル頻度の高い遺伝子変異は、3 か所で共通する変異が多く、非共通変異に比べ ctDNA 検出率が高いことが示された。したがって、変異アリル頻度の高い遺伝子変異を選定すれば、ctDNA モニタリングには支障がないと考えられた。実際、大腸癌でも食道癌と同様 85%の症例で ctDNA 検査の臨床的妥当性が確認された(Yaegashi M, et al. *Br J Cancer*, 2021)。しかし、胃癌症例では diffuse type では、治療前および腹膜播種再発時に ctDNA の上昇が見られなかった(Sasaki N, et al. *Plos One*, 2020)。食道癌症例、大腸癌症例でも、腹膜播種再発で ctDNA 上昇が見られない症例が 1 例ずつ存在していた。したがって、発生臓器によらず癌の播種性転移は ctDNA 検出が難しいことが示唆された。52 例の大腸癌症例の追加解析では、ctDNA 検査と CEA 検査の再発診断の感度、特異度は、85.7%/97.6%と 64.3%/61.9%と ctDNA 検査の診断性能が圧倒的に高かったが、興味深いことに ctDNA 陰性腹膜播種症例では、再発時に腫瘍マーカー CEA 上昇を示し

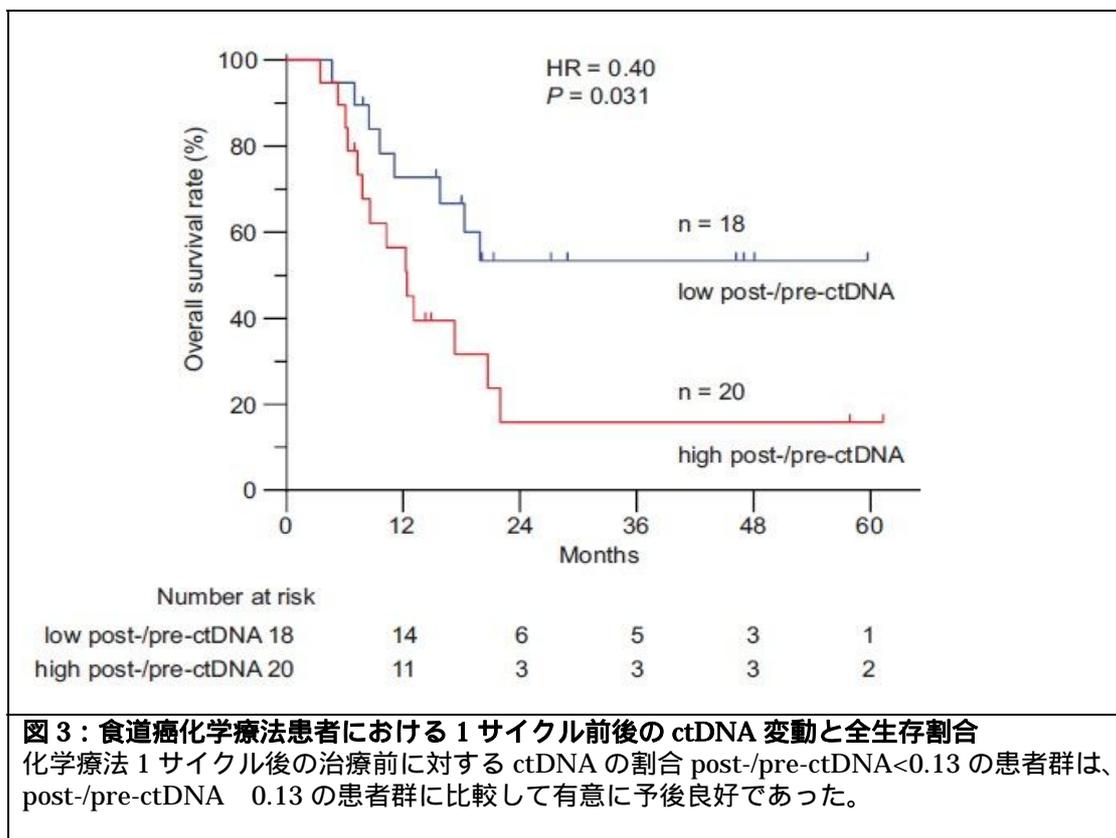
ており、従来の腫瘍マーカー検査の併用が有効である可能性が考えられた(図2, 未発表データ)。



大腸癌 ctDNA モニタリングの再発、無再発診断の高い診断精度から、大腸癌術後サーベイランスにおける侵襲的な CT スキャン検査の削減が期待され、現在評価中である。

ctDNA モニタリング検査は、微小病変の出現や治療による消退も正確に反映していた。そこで、食道癌化学療法後の早期 ctDNA 変動がその後の治療効果を予測可能であるかを検討した。化学療法 1 サイクル前後の ctDNA 変動 (post-/pre-ctDNA) が治療変更時点の治療効果 (objective response) を予測可能か Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線解析にて評価

した。その結果、Area under the curve (AUC): 0.88 と高い診断精度を示した。Cutoff 値は 0.13 であり、1 サイクル後で ctDNA が治療前の 13%以下まで低下する症例は、13%まで低下しない症例比べて、有意に化学療法奏功期間が長く、全生存割合も高いことが示された。( 図 3 ) ( Fujisawa R, et al. *Carcinogenesis*, 2021 )。



#### まとめ

dPCR を用いた症例特異的の変異を対象とした ctDNA モニタリングは、早期再発発見、無再発の確証、正確な治療効果判定、において臨床的妥当性を有する。10%程度の患者で ctDNA の検出しにくい病態が存在するが、多数の症例で画像診断や腫瘍マーカーなど既存検査の診断精度を上回っており、ctDNA 解析を中心としたがん診療が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeshi Iwaya, Fumitaka Endo, Fumiaki Takahashi, Takashi Tokino, Yasushi Sasaki, and Satoshi S. Nishizuka	4. 巻 2021 Jan;160(1)
2. 論文標題 Frequent tumor burden monitoring of esophageal squamous cell carcinoma with circulating tumor DNA using individually designed digital PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 463-465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.09.035	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 Mizunori Yaegashi, Takeshi Iwaya, Noriyuki Sasaki, Masashi Fujita, Zhenlin Ju, Doris Siwak, Tsuyoshi Hachiya, Kei Sato, Fumitaka Endo, Toshimoto Kimura, Koki Otsuka, Ryo Sugimoto, Tamotsu Sugai, Lance Liotta, Yiling Lu, Gordon B. Mills, Hidewaki Nakagawa and Satoshi S. Nishizuka	4. 巻 2021 Apr;124(9)
2. 論文標題 Frequent post-operative monitoring of colorectal cancer using individualised ctDNA validated by multiregional molecular profiling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1556-1565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-021-01266-4	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 該当する
1. 著者名 Fujisawa R, Iwaya T, Endo F, Idogawa M, Sasaki N, Hiraki H, Tange S, Hirano T, Koizumi Y, Abe M, Takahashi T, Yaegashi M, Akiyama Y, Masuda M, Sasaki A, Takahashi F, Sasaki Y, Tokino T, Nishizuka SS.	4. 巻 42
2. 論文標題 Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1239-1249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgab088	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 Sasaki N, Iwaya T, Chiba T, Fujita M, Ju Z, Endo F, Yaegashi M, Hachiya T, Sugimoto R, Sugai T, Siwak DR, Liotta LA, Lu Y, Mills GB, Nakagawa H, Nishizuka SS.	4. 巻 15
2. 論文標題 Analysis of mutational and proteomic heterogeneity of gastric cancer suggests an effective pipeline to monitor post-treatment tumor burden using circulating tumor DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0239966
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0239966	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 遠藤 史隆
2. 発表標題 食道癌治療後の肺転移に対して外科的切除術を施行した症例の治療成績
3. 学会等名 日本外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 史隆
2. 発表標題 進行胃癌の腫瘍出血に対する緩和的照射療法の有用性の検討
3. 学会等名 日本外科系連合学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 史隆
2. 発表標題 食道扁平上皮癌患者におけるCirculating tumor DNAと既存検査の比較
3. 学会等名 第119回 日本外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 史隆
2. 発表標題 Investigation of operative outcomes of esophagectomy for esophageal cancer in elderly patients
3. 学会等名 World Congress of Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋智子、岩谷岳、八重樫瑞典、木村聡元、高清水清治、有吉佑、藤沢良介、小泉優香、遠藤史隆、大塚幸喜、佐々木章
2. 発表標題 大腸癌に対するPrecision Medicine Circulating Tumor DNAを用いた大腸癌術後サーベイランスにおけるCT検査削減の可能性に関する研究
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤澤良介、岩谷岳、遠藤史隆、佐々木教之、二階春香、馬場誠朗、秋山有史、開勇人、小泉優香、阿部正和、片桐弘勝、木村聡元、大塚幸喜、井戸川雅史、新田浩幸、佐々木章、佐々木泰史、時野隆至、西塚哲
2. 発表標題 Circulating tumor DNAの初期変動を用いた食道癌化学療法効果予測に関する検討
3. 学会等名 第121回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩谷岳、遠藤史隆、藤沢良介、佐々木教之、二階春香、馬場誠朗、秋山有史、佐々木章
2. 発表標題 原発巣変異およびctDNA治療後早期変動による食道癌化学療法効果予測
3. 学会等名 第74回 日本食道学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩谷岳、遠藤史隆、八重樫瑞典、佐々木教之、藤沢良介、二階春香、馬場誠朗、秋山有史、佐々木章、西塚哲
2. 発表標題 がんゲノム情報を用いた食道癌治療の最適化
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木教之、岩谷岳、秋山有史、千葉丈広、遠藤史隆、八重樫瑞典、佐々木章、西塚哲
2. 発表標題 胃癌ゲノム医療に向けた原発集heterogeneityおよびCirculating tumor DNA解析
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩谷岳、遠藤史隆、八重樫瑞典、千葉丈広、佐々木教之、佐藤慧、秋山有史、佐々木章、西塚哲
2. 発表標題 消化管癌の新規バイオマーカーとしてのCirculating tumor DNAの有用性
3. 学会等名 第74回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 がんの診断のためのプローブ/プライマーライブラリー	発明者 西塚 哲、岩谷 岳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6544783	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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	秋山 有史  (Yuji Akiyama)  (10405798)	岩手医科大学・医学部・准教授   (31201)	
研究分担者	西塚 哲  (Satoshi Nishizuka)  (50453311)	岩手医科大学・歯薬総合研究所・特任教授   (31201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岩谷 岳  (Takeshi Iwaya)  (70405801)	岩手医科大学・医学部・准教授    (31201)	

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