

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08352

研究課題名(和文) 血中循環腫瘍デオキシリボ核酸を用いた進行肝癌の個別化治療

研究課題名(英文) Personalised treatment of advanced hepatocellular carcinoma using circulating tumor DNA

研究代表者

建石 良介(Tateishi, Ryosuke)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：50444089

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)：本研究は肝癌におけるcell-free DNA(cfDNA)ならびに血中循環腫瘍DNA(ctDNA)の臨床応用の可能性を検討したものである。cfDNA量は肝癌進行とともに増加し、独立した予後不良因子であった。薬物療法導入数日後にcfDNA量は増加するが、その上昇幅が大きい症例ほど治療が奏功する傾向が見られた。また治療数日後の血漿には崩壊した腫瘍由来の豊富なctDNAが含まれる可能性を見出した。レンパチニブ著効例で治療後血漿を用いたtargeted ultra-deep sequencingを実施し、薬物療法の治療効果に関与する遺伝子変異が検出できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行肝癌に対する薬物治療は近年大きく進歩したが、治療奏功性を事前に推測する方法はまだ確立していない。本研究の成果により、cell-free DNAの量的変化によって治療奏功性を予測できる可能性や、血中循環腫瘍由来DNAを用いた網羅的遺伝子変異解析により治療奏功性に関与する遺伝子変異を探索できる可能性が示唆された。肝癌に対するゲノム医療、個別化医療の発展が必要とされる中で、重要な知見が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to assess the clinical utility of cell-free DNA (cfDNA) and circulating tumor DNA (ctDNA) in hepatocellular carcinoma. The results indicated a positive association between cfDNA levels and hepatocellular carcinoma progression, acting as an independent prognostic factor for poor outcomes. Notably, cfDNA levels exhibited a significant increase a few days following the initiation of pharmacological treatment, and a greater elevation corresponded to a higher likelihood of treatment success. Furthermore, analysis of post-treatment plasma revealed the presence of abundant ctDNA derived from disintegrating tumors, particularly several days after treatment. In lenvatinib-responsive patients, targeted ultra-deep sequencing of post-treatment plasma demonstrated promising potential for detecting gene mutations involved in therapeutic response to drug therapy.

研究分野：消化器内科 肝臓病学

キーワード：cell free DNA 循環腫瘍DNA リキッドバイオプシー 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

進行肝臓癌に対する治療は、近年目覚ましく進歩している。種々の分子標的薬剤に加え免疫チェックポイント阻害剤による治療が使用可能となり、治療の選択肢が大幅に増えた。しかしながら、どのタイミングでどの薬剤を選択すべきか決定するためのアルゴリズムはまだ整備されておらず、個々の経験により治療が行われている状況であり今後は画一的な基準が必要となってくるであろう。

こうした問題を解決するため、個々の肝臓癌の性質、特にゲノム異常に基づいた個別化医療を目指す必要がある。近年目覚ましい発展を遂げたゲノム解析技術により肝臓癌の遺伝子変異解析は大きく進歩し、様々なドライバー遺伝子変異が見つかった。しかし多くの変異は 5%以下の頻度で、治療標的となるような変異が見つかっていない。また肝臓癌は腫瘍内が不均一な癌であり、一部の組織検体が肝臓癌全体の遺伝子変異プロファイルを反映していないという問題がある。さらに、これまでの一連のゲノム解析は手術検体を用いたものであり、これらの結果はいわゆる比較的早期の肝臓癌におけるゲノム異常を反映したものである。従って、根治治療が困難となった進行肝臓癌の遺伝子変異プロファイルは明らかとなっておらず、どのような遺伝子変異を獲得して肝臓癌が進行するかは未解明である。癌の性質は経過とともに変化していくため、その時々々の癌の性質を調べることは個々の症例に応じたタイミングでの再発リスク評価や治療法を決定するうえで重要である。しかしながら肝臓癌は画像で確定診断が可能で、かつ腫瘍生検は播種リスクが存在することから、腫瘍検体を得てゲノム医療に備える戦略は広く適用し難い。

血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) は侵襲的な組織生検に代わる、非侵襲的癌バイオマーカーとして注目されている。ctDNA は体内の癌由来の遺伝情報の総和を反映していると考えられており、腫瘍内不均一性を打破する有用なツールとなる可能性がある。上述の通り肝臓癌は腫瘍内不均一性が顕著な癌種であり、ctDNA は肝臓癌の遺伝子変異解析に非常に適していることが期待されるが、まだ発展途上の領域でありさらなる研究が必要である。本研究課題を通して、ctDNA が肝臓癌において悪性度の評価や治療効果予測因子として、肝臓癌診療における有用なツールとなるか検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は、肝臓癌における ctDNA のバイオマーカーとしての有用性につき検討することを目的とする。既報によれば、腫瘍サイズが小さく脈管浸潤を来していない肝臓癌では ctDNA は微量で検出されにくい。肝臓癌はそもそも遠隔転移を来しにくい腫瘍であり、従来の方法では解析に耐えうるだけの ctDNA が十分採取できないことが予想される。そこで我々は、ラジオ波焼灼術 (radiofrequency ablation, RFA) や肝動脈塞栓術 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE)、分子標的治療薬 (molecular targeted agent, MTA) を投与した直後の、まさに腫瘍細胞が大量に死滅している際の ctDNA を豊富に含む血漿に着目して解析を行うことにした。本研究では以下の点について検討した。

- (1) cell-free DNA と肝臓癌の関係
- (2) ctDNA 検出法の確立
- (3) ctDNA と肝臓癌進行度、治療奏功性の関連

3. 研究の方法

(1) cell-free DNA と肝臓癌ステージ・予後・治療奏功性の関連

RFA、TACE、MTA による治療を受けた肝臓癌患者を対象に治療前、治療翌日に採取された血漿を保存し、1mL の血漿から QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN 社) を用いて cell-free DNA を抽出した。Cell-freeDNA の量や経時的変化と、肝臓癌の進行度や治療の奏功性につき解析した。

(2) ctDNA 検出法の確立

上述の肝臓癌患者の治療前、治療後に採取した血漿由来の cell-free DNA を用いて、肝臓癌において最も高頻度に見られる変異である TERT promoter 変異の検出を試みた。変異検出用の蛍光プローブを作成し、droplet digital PCR (ddPCR) により変異の検出を試みた。

(3) ctDNA と肝臓癌ステージ・予後・治療奏功性の関連

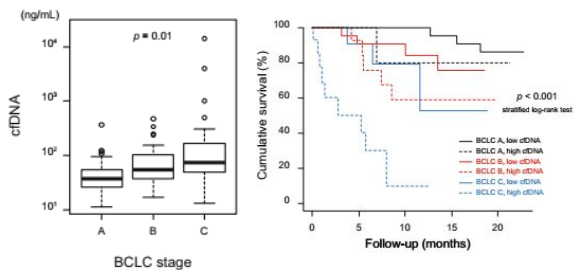
上述の肝癌患者の治療前、治療後に採取した血漿由来の ctDNA と肝癌の進行度や治療の奏功性につき解析した。

4. 研究成果

(1) cell-free DNA と肝癌ステージ・予後・治療奏功性の関連

肝癌ステージや予後との関係

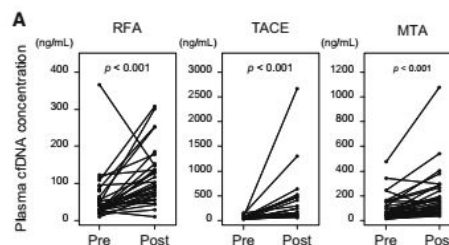
肝癌に対し治療を行った 100 症例を対象に、治療前と治療翌日の血漿から cell-free DNA を抽出した。治療前の cell-free DNA 量は BCLC-A : 36.8ng/mL (26.4-54.0, n = 32)、B : 53.8ng/mL (37.5-102.7, n = 39)、C : 74.5ng/mL (49.7-165.0, n = 29) と肝癌ステージ進行に伴い増加した (右図の左)。肝癌予後に寄与する因子につき Cox ハザードモデルで多変量解析を実施したところ、Child-pugh スコア、BCLC ステージ C、フェトプロテイン値、cell-free DNA 量が抽出された。また、cell-free DNA 量のカットオフ値を 70.7 ng/mL とし、それよりも cell-free DNA 量が多い群と少ない群に層別化すると、確かにいずれのステージにおいても cell-free DNA 量の多い群の生存率が悪かった。(右図の右)



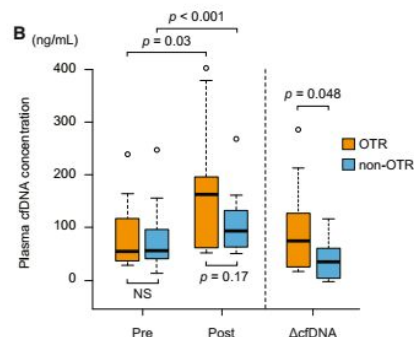
Child-pugh スコア、BCLC ステージ C、フェトプロテイン値、cell-free DNA 量が抽出された。また、cell-free DNA 量のカットオフ値を 70.7 ng/mL とし、それよりも cell-free DNA 量が多い群と少ない群に層別化すると、確かにいずれのステージにおいても cell-free DNA 量の多い群の生存率が悪かった。(右図の右)

治療奏功性との関係

治療前と治療翌日の cell-free DNA 量を比較すると、RFA (39.2 96.2)、TACE (48.7 248.7)、MTA (54.4 116.2) のいずれも治療翌日に cell-free DNA 量が有意に増加した。(右図) これは焼灼、塞栓、薬物療法などによって腫瘍細胞を含む肝細胞が壊れたためと考えられた。

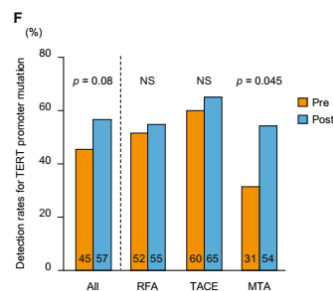


cell-free DNA 量の変化と治療奏功性を比較するため、MTA 投与 2 か月後の画像評価で完全奏功 (CR) または部分奏効 (PR) が得られた症例を治療奏功例 (objective tumor response, OTR) とし、それ以外を非奏功例 (non-OTR) と分類したところ、OTR 群では non-OTR 群に比較して、cell-free DNA 量の上昇幅が大きいことが明らかとなった。(右図) すなわち薬物療法導入後短期間で cell-free DNA 量が上昇する症例は治療反応性が良好な可能性が示唆された。



(2) ctDNA 検出法の確立

治療前と翌日の cell-free DNA から ddPCR で TERT promoter 変異を検出したところ、治療前: 45 例 (45%)、治療翌日: 55 例 (55%) と、治療翌日の cell-free DNA を用いると検出率が向上した。上述の通り、壊れた腫瘍細胞由来の cell-free DNA が多く含まれているためと考えられた。



(3) ctDNA と肝癌進行度・予後・治療奏功性の関連

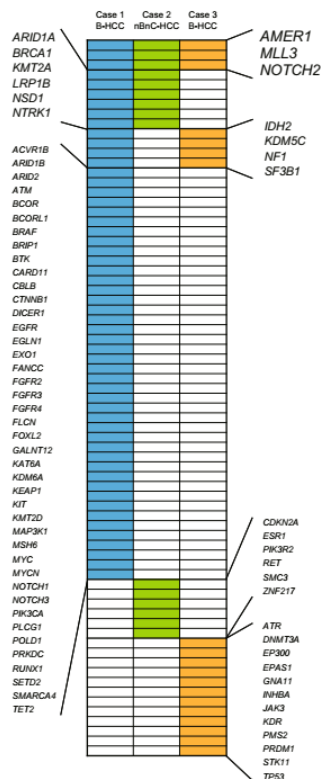
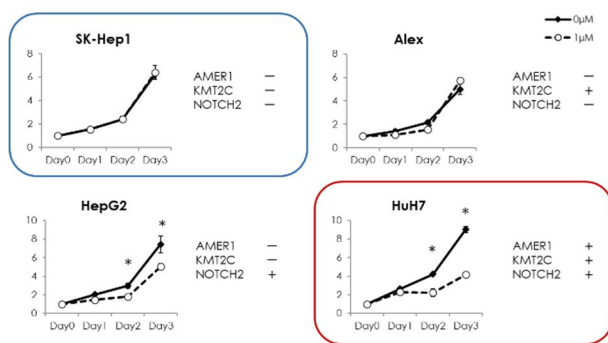
肝癌ステージや予後との関係

ctDNA (TERT promoter 変異) が陽性の症例と陰性の症例を比較したが、臨床パラメータには有意な差は見られなかった。また ctDNA 陽性症例の予後を調査したが、陰性症例との差は見られなかった。

治療奏功性との関係

ctDNA の網羅的遺伝子変異解析の可能性を探索するため、治療後血漿より抽出した ctDNA で、275 の癌関連遺伝子が解析できるパネルを用いた targeted ultra-deep sequencing (カバ

レッジ 22,000 倍) を実施した。特にレンパチニブの効果が著明であった進行肝癌 3 症例を対象に実施したところ、右図に示す通り 73 の遺伝子変異が検出できた。中でも AMER1、MLL3、NOTCH2 の 3 つの遺伝子は 3 症例に共通して変異が見られた。レンパチニブが奏功した患者の治療後 ct DNA は、レンパチニブに感受性のある腫瘍細胞から放出されたと考えられるため、これら 3 つの遺伝子変異はレンパチニブの感受性と関連している可能性があると考えられた。実際、これら遺伝子変異を有する肝癌細胞株である HuH-7 はレンパチニブも感受性が高く、3 つの遺伝子変異がない SK-Hep-1 にはレンパチニブが全く効果がないことが確認できた。



【まとめ】

cell-free DNA 解析はまだ発展途上の技術であるが、治療翌日～数日後の血漿を用いることで変異検出感度の向上が期待できると考えられた。分子標的薬導入直後の血漿に豊富に含まれる ctDNA は薬剤感受性の肝癌由来と推測されるため、著効例の解析から薬剤効果予測バイオマーカーを構築できる可能性がある。また cell-free DNA 量の変化も分子標的薬の奏功性を判断マーカーとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 Minami Tatsuya, Tateishi Ryosuke, Nakatsuka Takuma, Nakagawa Hayato, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of Obesity and Heavy Alcohol Consumption on Hepatocellular Carcinoma Development after HCV Eradication with Antivirals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Liver Cancer	6. 最初と最後の頁 309 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000513705	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 Tateishi Ryosuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Prognosis prediction or treatment allocation?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology International	6. 最初と最後の頁 852 ~ 854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12072-021-10201-x	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 Nakatsuka Takuma, Tateishi Ryosuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Changing clinical management of NAFLD in Asia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Liver International	6. 最初と最後の頁 15046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/liv.15046	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 Yamada Tomoharu, Minami Tatsuya, Tateishi Ryosuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 41
2. 論文標題 Limited efficacy of atezolizumab and bevacizumab for hepatocellular carcinoma previously treated with tyrosine kinase inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Liver International	6. 最初と最後の頁 2233 ~ 2234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/liv.15010	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 Nakagomi Ryo, Tateishi Ryosuke, Mikami Shintaro, Wake Taijiro, Kinoshita Mizuki Nishibatake, Nakatsuka Takuma, Minami Tatsuya, Sato Masaya, Uchino Koji, Enooku Kenichiro, Nakagawa Hayato, Asaoka Yoshinari, Shiina Shuichiro, Koike Kazuhiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Infectious complications related to radiofrequency ablation of liver tumors: The role of antibiotics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0259641 ~ 0259641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259641	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 Nakatsuka Takuma, Tateishi Ryosuke, Nakagomi Ryo, Minami Tatsuya, Koike Kazuhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Risk stratification of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication in patients with compensated advanced chronic liver disease in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2022.03.002	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 Nakatsuka T, Nakagawa H, Hayata Y, Wake T, Yamada T, Nishibatake Kinoshita M, Nakagami R, Sato M, Minami T, Uchino K, Enooku K, Kudo Y, Tanaka Y, Kishikawa T, Otsuka M, Tateishi R, Koike K	4. 巻 -
2. 論文標題 Post-treatment cell-free DNA as a predictive biomarker in molecular-targeted therapy of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01773-4	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 Uchino Koji, Tateishi Ryosuke, Wake Taijiro, Kinoshita Mizuki Nishibatake, Nakagomi Ryo, Nakatsuka Takuma, Minami Tatsuya, Sato Masaya, Enooku Kenichiro, Nakagawa Hayato, Shiina Shuichiro, Koike Kazuhiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Radiofrequency Ablation of Liver Tumors in Patients on Antithrombotic Therapy: A Case-Control Analysis of over 10,000 Treatments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Vascular and Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvir.2021.02.021	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 Tateishi R, Matsumura T, Okanoue T, Shima T, Uchino K, Fujiwara N, Senokuchi T, Kon K, Sasako T, Tani ai M, Kawaguchi T, Inoue H, Watada H, Kubota N, Shimano H, Kaneko S, Hashimoto E, Watanabe S, Shiota G, Ueki K, Kashiwabara K, Matsuyama Y, Tanaka H, Kasuga M, Araki E, Koike K	4. 巻 56
2. 論文標題 Hepatocellular carcinoma development in diabetic patients: a nationwide survey in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 261 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01754-z	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 Yamada Tomoharu, Tateishi Ryosuke, Iwai Miwako, Koike Kazuhiko, Todo Tomoki	4. 巻 18
2. 論文標題 Neoadjuvant Use of Oncolytic Herpes Virus G47 Enhances the Antitumor Efficacy of Radiofrequency Ablation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 535 ~ 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2020.08.010	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 Wake Taijiro, Tateishi Ryosuke, Fukumoto Tsuyoshi, Nakagomi Ryo, Kinoshita Mizuki Nishibatake, Nakatsuka Takuma, Sato Masaya, Minami Tatsuya, Uchino Koji, Enooku Kenichiro, Nakagawa Hayato, Fujinaga Hidetaka, Asaoka Yoshinari, Tanaka Yasuo, Otsuka Motoyuki, Koike Kazuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Improved liver function in patients with cirrhosis due to chronic hepatitis C virus who achieve sustained virologic response is not accompanied by increased liver volume	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e231836 ~ 231836
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231836	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Takuma Nakatsuka, Hayato Nakagawa, Yuki Hayata, Taijiro Wake, Tomoharu Yamada, Ryo Nakagomi, Masaya Sato, Tatsuya Minami, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Yotaro Kudo, Yasuo Tanaka, Motoyuki Otsuka, Ryosuke Tateishi, Kazuhiko Koike
2. 発表標題 Post-treatment cell-free DNA as a predictive biomarker in molecular-targeted therapy of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Takuma Nakatsuka, Hayato Nakagawa, Taijiro Wake, Tomoharu Yamada, Masaya Sato, Tatsuya Minami, Yotaro Kudo, Yasuo Tanaka, Motoyuki Otsuka, Ryosuke Tateishi, Kazuhiko Koike
2. 発表標題 Post-treatment cell-free DNA as a predictive biomarker in systemic therapy for HCC
3. 学会等名 APASL Oncology 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 中塚拓馬、中川勇人、小池和彦
2. 発表標題 Circulating tumor DNA 解析による肝癌層別化治療に向けた試み
3. 学会等名 第56回肝臓学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 中塚拓馬、中川勇人、小池和彦
2. 発表標題 治療後cell-free DNA解析による肝癌ゲノム医療に向けた試み
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2020)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 中塚拓馬、中川勇人、早田有希、和氣泰次郎、山田友春、木下瑞希、中込良、佐藤雅哉、南達也、榎奥健一郎、工藤洋太郎、田中康雄、大塚基之、建石良介、小池和彦
2. 発表標題 治療後 cell-free DNA 解析による分子標的薬の治療効果予測
3. 学会等名 第23回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2020年～2021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	中川 勇人 (Nakagawa Hayato) (00555609)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員 (12601)	
研究分担者	田中 康雄 (Tanaka Yasuo) (40422290)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員 (12601)	
研究分担者	中塚 拓馬 (Nakatsuka Takuma) (50772042)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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
---------	---------