

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09626

研究課題名(和文) 血中腫瘍細胞由来DNAを用いた網羅的遺伝子解析に基づく卵巣癌の新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for ovarian cancer based on the comprehensive gene mutation analysis using circulating tumor DNA

研究代表者

井篁 一彦 (Ino, Kazuhiko)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：60303640

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)：本研究では卵巣癌における血中循環腫瘍DNA (ctDNA) の網羅的遺伝子プロファイリングを行い、臨床病理学的因子・予後との関連を検討した。患者血漿からctDNAを抽出し、腫瘍由来の遺伝子変異を CAPP-seqにて解析した。高異型度漿液性癌ではTP53、明細胞癌ではAPC、類内膜癌ではPIK3CA、粘液性癌ではKRASが最も頻度の高い遺伝子変異であった。ctDNA濃度が高い症例は低い症例に比べて無増悪生存期間(PFS)が短縮し、1つ以上の病的変異検出症例は非検出症例に比べてPFSが短縮した。これらの結果はctDNA遺伝子プロファイリングが卵巣癌の個別化治療戦略に役立つことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、卵巣癌患者の血中循環腫瘍DNA (ctDNA) による遺伝子プロファイリングを実現し、予後予測に有用であるのみでなく、術前化学療法前後のctDNA遺伝子変異のモニタリングによりクローン選択/進化を検出できた。これらの結果は今後の卵巣癌の個別化医療の治療戦略に貢献し、従来の組織DNA解析に勝るctDNAリキッドバイオプシーの有用性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Liquid biopsies using circulating tumor DNA (ctDNA) have been used as non-invasive diagnostic tool for detecting cancer-specific gene mutations. In the present study, we performed the comprehensive gene mutation profiling of ctDNA in patients with ovarian cancer, and investigated their association with clinicopathological and prognostic factors. The ctDNA extracted from patients' plasma were analyzed using CAPP-Seq. The most frequently mutated genes were as follows: TP53 in high-grade serous carcinoma, APC in clear cell carcinoma, PIK3CA in endometrioid carcinoma, and KRAS in mucinous carcinoma. Higher ctDNA concentration significantly correlated with worse progression-free survival (PFS). Further, patients with any pathogenic mutations showed significantly worse PFS. These findings suggest that ctDNA-based gene profiling might help in establishing personalized therapeutic strategies for ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 リキッドバイオプシー 網羅的遺伝子プロファイリング 血中循環腫瘍DNA

## 1. 研究開始当初の背景

癌ゲノム医療の発展により婦人科癌でも腫瘍組織を用いた遺伝子パネル検査に基づくプレシジョンメディシンが期待されている。しかし進行・再発癌では組織採取がリアルタイムで行えない症例があることや、腫瘍内クローン不均一性(heterogeneity)や転移・再発時の癌クローン進化(clonal evolution)により、初回手術時の原発巣の一部の組織検体の解析では全体像や経時変化を反映できず、最適な治療が選択されない課題があった。近年、腫瘍から流出した血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA)を用いたリキッドバイオプシーによる遺伝子解析が注目されてきた。リキッドバイオプシーは簡便・低侵襲に経時的に繰り返し行えるため、リアルタイムな治療病勢モニタリングや早期再発診断としても期待され、クローン不均一性やがんクローン進化の問題の克服も期待されている。申請者は新規超高感度次世代シーケンサー法 CAPP-seqを用いた血中 ctDNA の網羅的遺伝子解析技術を導入することにより、世界に先駆けて婦人科癌のリキッドバイオプシーの Feasibility study を施行し、複数の pathogenic 変異や *EGFR*・*MET* の遺伝子増幅を確認し、その臨床応用の可能性について報告した。しかしながら卵巣癌においては、これまでごく限られた報告のみで、その有用性についての詳細な検討はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、卵巣癌患者の血中 ctDNA を用いた網羅的遺伝子プロファイリングを行い、組織型や予後との関連を示すこと、次に治療前後の ctDNA モニタリングでクローン進化を検出できるか、および腫瘍組織 DNA 解析結果との相違点を明白にすることである。これらの解析から ctDNA-リキッドバイオプシーを用いた卵巣癌の新規の診断・治療戦略の確立を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

治療前・中・後の患者血漿から ctDNA を抽出し、新規超高感度次世代シーケンサーである CAnceR Personalized Profiling by deep sequencing (CAPP-seq; 197 遺伝子を 99.99%以上の感度・特異度で検出可能)を用いた網羅的遺伝子プロファイリングを行い、臨床病理学因子や臨床的アウトカム・予後との相関を検討した。一方腫瘍組織から DNA を抽出し、ターゲットシーケンスを行い、ctDNA リキッドバイオプシー結果と比較した。

## 4. 研究成果

### (1)卵巣癌患者の ctDNA の個別遺伝子プロファイル結果と臨床病理学的因子や予後との相関

本研究において対象とした卵巣癌患者の 94%で 1 つ以上の non-synonymous な体細胞変異を認め、高異型度漿液性癌の 67%で *TP53* の、明細胞癌の 31%で *APC* の、類内膜癌の 40%で *PIK3CA* の、粘液性癌の 67%で *KRAS* の変異を認めた。ctDNA 濃度は Stage IV で有意に高値であり、濃度が高いほど無再発生存期間 (PFS) が短く、また 1 つ以上の pathogenic 変異を有する患者は有意に PFS が不良であった。大腸癌からの転移生卵巣癌症例の ctDNA 解析では、*KRAS*・*APC*・*TP53* 変異や *MET*・*EGFR*・*ERBB2* 増幅など原発巣と一致する変異を検出できた。

### (2)ctDNA 解析を用いた術前化学療法前後におけるモニタリングと癌クローン進化の検討

術前化学療法(NAC)施行例において、NAC 前後の ctDNA プロファイル変化を解析した。NAC 感受性群では ctDNA の *TP53* 変異アレル頻度が低下した。一方、NAC 抵抗性群では *TP53* 変異アレル頻度が上昇し、NAC 後に新たな pathogenic *TP53* 変異の出現が検出され、クローン選択/進化を時系列モニタリングすることができた。

#### (3) 卵巣高異型度漿液性癌における ctDNA と腫瘍組織 DNA との *TP53* 変異の一致率の解析

リキッドバイオプシーによる p53 変異癌の検出の validation のため、血中 ctDNA と腫瘍組織 DNA が共に解析できた高異型度漿液性癌 22 例について、*TP53* 変異の一致率の解析を行ったところ、16/22 例 (72%) で腫瘍組織 DNA から pathogenic な *TP53* 変異を認め、そのうち 13/16 例 (81%) で ctDNA と腫瘍組織 DNA から同一の *TP53* 変異を認め、ctDNA 解析により p53 変異卵巣癌を検出できることが示唆された。

#### (4) 大腸癌卵巣転移症例における ctDNA 遺伝子プロファイル解析

大腸癌からの卵巣転移の症例についても、ctDNA と腫瘍組織の両者を用いて網羅的遺伝子解析を行った。11 症例中 9 症例で *KRAS*・*APC*・*TP 53* の遺伝子変異や *MET* の遺伝子増幅といった大腸癌パターンの腫瘍特性を ctDNA 解析により検出でき、腫瘍組織の遺伝子特性とも一致していた。

#### (5) 子宮頸癌における ctDNA リキッドバイオプシー解析

子宮頸癌についても ctDNA 遺伝子プロファイリングを施行し、その有用性を卵巣癌と比較した。子宮頸癌患者から抽出した血中 ctDNA を用いた解析では、33/38 例 (87%) で何らかの遺伝子異常を、13 例 (34%) で *PIK3CA* の pathogenic な変異を認めた。さらに一部の症例で *EGFR*・*MET*・*ERBB2* の増幅を認め、ペアとなる腫瘍組織を用いた免疫組織化学染色で各タンパクの発現増加を確認した。さらに同時化学放射線療法(CCRT)症例において、治療前後の ctDNA を用いた遺伝子プロファイルを解析比較したところ、子宮頸癌でもリアルタイムな治療によるクローン進化の検出が可能であった。

以上より、本研究において、卵巣癌患者の ctDNA による遺伝子プロファイリングを実現し、予後予測に有用であるのみでなく、化学療法前後の ctDNA 遺伝子プロファイルのモニタリングによりクローン選択/進化を検出できた。これらの結果は今後の卵巣癌のリアルタイムで最適な個別化医療の治療戦略に貢献し、従来の組織 DNA 解析に勝る ctDNA リキッドバイオプシーの有用性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Iwahashi N, Ikezaki M, Komohara Y, Fujiwara Y, Noguchi T, Nishioka K, Sakai K, Nishio K, Ueda M, Ihara Y, Uchimura K, Ino K, Nishitsuji K	4. 巻 1(3)
2. 論文標題 Cytoplasmic p53 aggregates accumulated in p53-mutated cancer correlate with poor prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgac128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgac128	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 Matsukawa H, Ikezaki M, Nishioka K, Iwahashi N, Fujimoto M, Nishitsuji K, Ihara Y, Ino K	4. 巻 12(8)
2. 論文標題 Calnexin is involved in forskolin-induced syncytialization in cytotrophoblast model BeWo cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom12081050	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 Epidemiologic study on gestational trophoblastic diseases in Japan	4. 巻 33(6)
2. 論文標題 Yamamoto E, Nishino K, Niimi K, Ino K	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gynecol Oncol	6. 最初と最後の頁 e72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3802/jgo.2022.33.e72	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 Mabuchi Y, Hamano Y, Minami S, Ota N, Ino K	4. 巻 24(3)
2. 論文標題 HBOC syndrome with an uncharacterized variant in the BRCA1 gene in a patient diagnosed with endometrial cancer after surgery for bilateral breast cancer: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13445	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 Iwahashi N, Ikezaki M, Fujimoto M, Komohara Y, Fujiwara Y, Yamamoto M, Mizoguchi M, Matsubara K, Watanabe Y, Matsuzaki I, Murata S, Ihara Y, Ino K, Nishitsuji K	4. 巻 19
2. 論文標題 Lipid droplet accumulation independently predicts poor clinical prognosis in high-grade serous ovarian carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 5251-5264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13205251	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 Matsukawa H, Ota N, Nishioka K, Noguchi T, Iwahashi N, Mabuchi Y, Yagi S, Minami S, Ino K	4. 巻 15
2. 論文標題 Low-grade endometrial stromal sarcoma in a young woman diagnosed after resection of endometrial polyp-like lesions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 236-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2021.2400	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 Anami Y, Minami S, Kumegawa A, Matsukawa H, Nishioka K, Noguchi T, Iwahashi N, Mizoguchi M, Nanjo S, Ota N, Mabuchi Y, Yagi S, Yamamoto Y, Ino K	4. 巻 15
2. 論文標題 Malignant melanoma treated with pembrolizumab during pregnancy: A case report and review of the literature	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 242-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2021.2404	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 Noguchi T, Iwahashi N, Sakai K, Matsuda K, Matsukawa H, Toujima S, Nishio K, Ino K	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive gene mutation profiling of circulating tumor DNA in ovarian cancer: Its pathological and prognostic impact	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 E3382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12113382	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 Iwahashi N, Ikezaki M, Nishikawa T, Namba N, Ohgita T, Saito H, Ihara Y, Shimanouchi T, Ino K, Uchimura K, Nishitsuji K	4. 巻 117
2. 論文標題 Sulfated glycosaminoglycans mediate prion-like behavior of p53 aggregates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 33225-33234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2009931117	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩橋尚幸、西岡香穂、八幡環、堀内優子、井籠一彦
2. 発表標題 p53凝集体形成に着目したp53変異卵巣癌の病態メカニズムの解明と治療戦略の確立
3. 学会等名 第21回日本婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西岡香穂、岩橋尚幸、南條佐輝子、井籠一彦
2. 発表標題 細胞性栄養膜細胞で小胞体ストレスにより膜移行したカルレティキュリンはeat-meシグナルとして働く
3. 学会等名 第30回日本胎盤学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yahata T, Iwahashi N, Ino K
2. 発表標題 Adeno associated virus-CRISPR/Cas9-mediated ovarian cancer treatment targeting PD-L1 gene in vivo
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南野 有紗, 八幡 環, 平山 純也, 馬淵 泰士, 八木 重孝, 南 佐和子, 井籠 一彦
2. 発表標題 術前MRI検査にて筋層浸潤陰性と診断した推定IA期の子宮体癌の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩橋 尚幸, 野口 智子, 坂井 和子, 西尾 和人, 井籠 一彦
2. 発表標題 婦人科癌におけるcirculating tumor DNAを用いたliquid biopsyの有用性
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口智子, 岩橋尚幸, 馬淵誠士, 八木重孝, 南佐和子, 坂井和子, 西尾和人, 井籠一彦
2. 発表標題 卵巣癌における血中循環腫瘍細胞由来DNAの網羅的遺伝子変異解析とbTMB測定の有用性
3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口智子, 岩橋尚幸, 坂井和子, 西尾和人, 井籠一彦
2. 発表標題 卵巣癌における血中腫瘍細胞由来DNAの網羅的遺伝子変異解析を用いた臨床病理学的検討と予後因子の検討
3. 学会等名 第5回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 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	西尾 和人  (Nishio Kazuto)  (10208134)	近畿大学・医学部・教授   (34419)	
研究 分担者	岩橋 尚幸  (Iwahashi Naoyuki)  (50750907)	和歌山県立医科大学・医学部・助教   (24701)	

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