

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17029

研究課題名（和文）次世代シーケンサーとデジタルPCRを用いた、肝細胞癌治療モニタリング法の開発

研究課題名（英文）Development of hepatocellular carcinoma treatment monitoring method using next-generation sequencing and digital PCR

研究代表者

鈴木 彰子（Suzuki, Akiko）

岩手医科大学・医学部・任期付助教

研究者番号：70866558

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）：ゲノム解析技術の進歩に伴い、治療に先立って原発腫瘍組織の遺伝情報に基づく分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬などの薬剤選択や腫瘍の再発診断に期待が寄せられている。しかし、切除不能肝細胞癌のように、出血や播種リスクを理由として原発腫瘍組織の採取が避けられている癌種においては、原発腫瘍組織の遺伝情報に基づく薬剤選択や予後層別化を行うことの有効性を検証することが難しかった。そこで我々は、死後の検体から組織を採取しシーケンシング解析を行うことで、生前治療中には生検リスクが高く組織のシーケンシング情報が得られなかった治療対象について後方視的に確認する手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、死後の病理解剖によって得られる腫瘍組織のゲノム解析を起点として、肝細胞癌治療経過中に生じる腫瘍内ヘテロ不均一性、癌の進化、薬剤抵抗性獲得機序を明らかにする試みである。本研究から得られる知見は、これまで合併症リスクを理由に検証が困難であった肝細胞癌に対して、原発腫瘍組織の遺伝情報を基とした治療効果予測および体内腫瘍量評価による個別化治療の実現に向けた基礎的資料となる。また、切除不能肝細胞癌の治療効果予測や体内腫瘍量評価における腫瘍由来血中循環DNAの臨床的妥当性を評価するという点で意義がある。

研究成果の概要（英文）：With the progression of genome analysis technology, there is growing anticipation for drug selection based on the genetic information of primary tumor tissues prior to treatment, such as molecular targeted drugs and immune checkpoint inhibitors, as well as for recurrence diagnosis. However, for cancers like unresectable hepatocellular carcinoma, where the collection of primary tumor tissues is avoided due to the risk of bleeding or seeding, it has been challenging to validate the effectiveness of drug selection and prognostic stratification based on the genetic information of primary tumor tissues. Therefore, we have established a method to retrospectively verify treatment targets that could not obtain tissue sequencing information during life due to high biopsy risks by collecting tissue from post-mortem specimens and conducting sequence analysis.

研究分野：消化器病学

キーワード：バイオマーカー 肝細胞癌 腫瘍生物学 血中腫瘍由来循環DNA

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞から血中に放出される DNA 断片である 血中腫瘍由来循環 DNA(Circulating tumor DNA:ctDNA)は、症例特異的バイオマーカーとして期待されている。追跡対象とする ctDNA を同定するためには、治療対象とする原発組織の生検材料を対象としたシーケンス解析が必要であった。根治的切除が適応外となる進行肝細胞癌に対しては、分子標的治療薬による患者の生命予後の延長を目指す。そのため、切除不能進行肝細胞癌においても、症例特異的バイオマーカーとして ctDNA の活用が期待される。しかしながら、切除不能進行肝細胞癌に対する原発腫瘍組織の生検は、腫瘍播種や腹腔内出血のリスクを理由として避けられているのが現状である。そのため、治療対象腫瘍の遺伝子変異を根拠とする ctDNA を用いた体内腫瘍量の評価や予後層別化等の臨床的有用性の検証を行うためには、患者リスクを回避した代替手段による予備的評価が求められていた。そこで、死後の検体から組織を採取しシーケンス解析を行うことで、生前治療中にシーケンス情報が得られなかった治療対象について後方視的に確認することで、治療前の原発腫瘍組織の生検が避けられてきた切除不能肝細胞癌について、ctDNA による体細胞変異の継時的変化を digital PCR 等で定量することが可能であると着想にいたった。

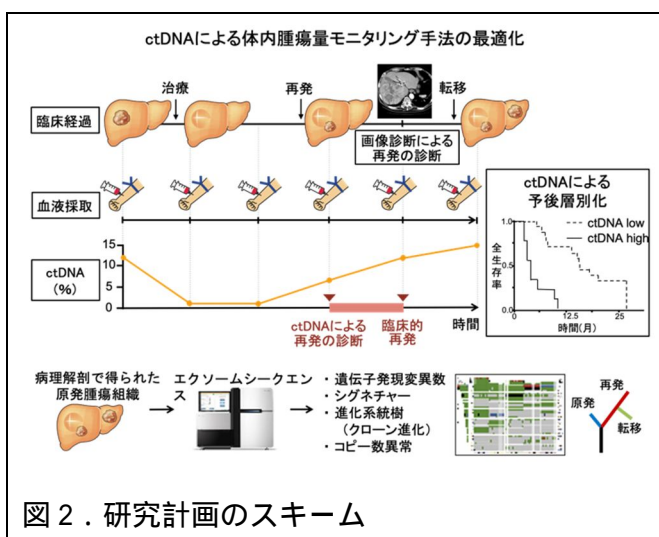


図2. 研究計画のスキーム

2. 研究の目的

治療前の ctDNA および死亡時の病理解剖検体で採取する肝細胞癌組織を対象としたシーケンス情報を統合することで、切除不能肝細胞癌患者に対する ctDNA による体内腫瘍量モニタリング、予後層別化を行うことの臨床的有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

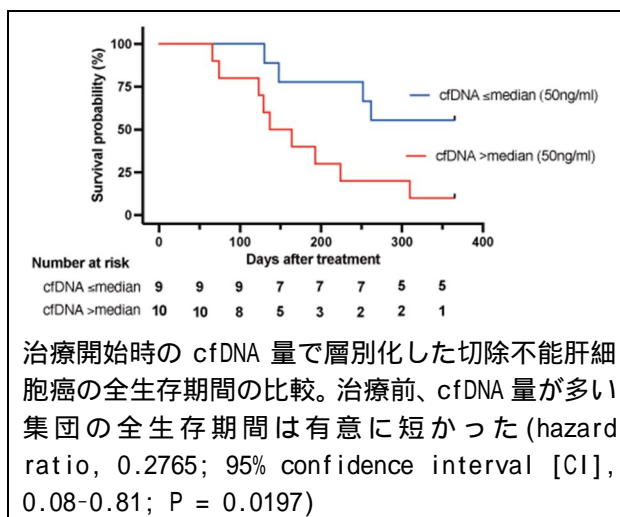
分子標的薬の投与を受ける切除不能肝細胞癌患者 20 例を前向きに登録した。治療開始前および治療経過中の定期的な採血時(例:3 ヶ月ごと)に研究用血液 10cc を採取し、血中遊離 DNA(以下 cell free DNA)を抽出し保存した。研究の Primary endpoint は、治療開始から 2 ヶ月後の CT ならびに MRI 検査で評価する奏効率。Secondary endpoint は無増悪生存期間、全生存期間を設定した。登録症例のうち、死亡時に病理解剖を行った 5 例については、病理解剖時に採取する原発巣ならびに転移巣より DNA を抽出し、エクソーム解析により個々の症例の遺伝子変異を同定した。同定した体細胞変異について、ctDNA の変異アリル頻度(腫瘍由来 DNA の血中全 DNA に対する比率, variant allele

frequency; VAF)を digital PCR で経時的に測定した。ctDNA や血中遊離 DNA の情報と、臨床情報との関連を解析した。

4 . 研究成果

病理解剖を行った 5 例について、原発巣ならびに転移巣から DNA を抽出した。生前に治療対象とした原発巣、転移巣から十分な組織・ゲノム情報が得られるという病理解剖の量的・部位的な優位性を活用し、腫瘍内ヘテロ不均一性、癌の進化、治療抵抗性獲得機序の理解を深めることができるという本研究の利点に着目した。当初の研究計画を発展させ、切除不能肝細胞癌の 腫瘍内、腫瘍間の空間的なゲノム情報による腫瘍内のヘテロ不均一性の理解 分子標的薬による治療が癌に引き起こす時間的なゲノム情報による癌の進化、薬剤抵抗性獲得機序について検証するために、マルチリージョンシーケンスを実施した。このマルチリージョンシーケンスは、2021 年度の文部科学省科学研究費新学術領域「先進ゲノム支援」の支援を受けて実施した。この支援により、当初の研究課題を発展させ、エクソームシーケンスと SNP 解析を並施して、コピー数多型 (copy number variant)/コピー数変化(copy number alteration)で進化系統樹を描くことができ、原発巣ならびに転移巣の多様性のレベルを評価することが可能となった。今後、エクソームシーケンスデータに関して数数学的オミックス解析を実施し、切除不能肝細胞癌の治療経過中に生じる腫瘍の生物学的進化を明らかにしていく計画である。また、研究当初の予定通り、原発巣で同定した遺伝子変異について、生前採取した

ctDNA を digital PCR で追跡することが可能であることを明らかとした。付随研究として、登録した 20 症例の cfDNA 量と体内腫瘍量との相関、また予後との関連を解析した。その結果、cfDNA 量は体内腫瘍量と正の相関を示し、cfDNA 量が高値の群では cfDNA 量が低値の群と比較し、有意に生存期間が短いことが明らかとなった。また、治療開始から 1 ヶ月後の cfDNA の変化量は初回画像検査で評価する奏効



率と関連することが示され、cfDNA は切除不能肝細胞癌の予後予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された (Oncology. In press.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe T, Suzuki Y, Kuroda H, Hiraki H, Suzuki A, Tamura A, Ieko Y, Nishizuka SS, Matsumoto T	4. 巻 -
2. 論文標題 Circulating Cell-Free DNA as a Biomarker for Prognosis and Response to Systemic Therapy in Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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