

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18228

研究課題名（和文）子宮頸癌におけるctDNA-Liquid Biopsyの有用性の検討

研究課題名（英文）A comprehensive gene mutation profiling of ctDNA-liquid biopsy samples from cervical cancer patients

研究代表者

岩橋 尚幸（Iwahashi, Naoyuki）

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50750907

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）：子宮頸癌の治療における新規個別化医療としての ctDNA-Liquid Biopsyの有用性について検討した。子宮頸癌38例のLiquid Biopsyサンプルから抽出したctDNAを用いた遺伝子変異プロファイリングを行い、ペアとなる子宮頸癌FFPE組織から腫瘍DNAを抽出した解析と比較した。pathogenicなnon-synonymous変異の検出や、EGFR、MET、ERBB2遺伝子のcopy number gainを検出できた。今後の子宮頸癌における個別化治療戦略において、ctDNA-liquid biopsyによる腫瘍遺伝子プロファイリングが重要だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで解明されていなかった、子宮頸癌におけるctDNA-Liquid Biopsyの有用性について検討し、有用性を示せた。個別化医療に対しては今後はctDNA-Liquid Biopsyは必須項目となってくることが考えられ、研究成果の学術的意義や社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Here, we show the usefulness of liquid biopsy in cervical cancer. In this study, we examined the mutation profiles of plasma samples obtained from 38 cervical cancer patients. Gene alterations were detected in 33/38 (87%) cases. Of 38 patients, 24 (63%) showed one or more nonsynonymous pathogenic somatic mutations, and the most frequently mutated genes was PIK3CA [13/38 (34%)], including two PIK3CA double-mutated cases. Copy number gains of EGFR, MET, ERBB2 genes were detected in 9/38 (24%), 4/38 (11%), 2/38 (5%) cases, respectively. In six concurrent chemoradiotherapy (CCRT) treated cervical cancer cases, the change of gene mutation patterns between pre- and post-CCRT liquid biopsy was associated with treatment response. These findings suggest that the characterization of the genetic profiles of independent tumors using liquid biopsy may lead to the development of novel personalized treatment strategies in cervical cancer.

研究分野：産婦人科学

キーワード：リキッドバイオプシー 子宮頸癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における子宮頸癌による死亡数は年間に約 3000 例と言われており、近年では妊娠・出産を控えた 20-30 歳代の若年層の罹患率が急増し、若年女性の癌による死亡率でも子宮頸癌が一番多くなっている。臨床進行期や組織型を考慮して手術療法、化学療法、放射線療法などの集学的治療が選択され、近年初期癌の治療成績は向上しているが、特殊な組織型や進行・再発症例における個々の腫瘍反応性は異なり、治療効果も様々である。同時放射線化学療法(CCRT)の導入により生存率が改善したものの、放射線治療抵抗性であり予後不良な組織型である腺癌が若年層で増えていることもあり、予後改善のためには新規治療戦略の確立が必要である。肺癌や大腸癌などの悪性腫瘍では患者個々の癌の遺伝子プロファイルに合わせた Precision medicine 研究が進められ、多種の分子標的薬が臨床導入されているのに対し、子宮頸癌では bevacizumab (抗 VEGF 抗体) およびマイクロサテライト不安定性(MSI)陽性症例に対する pembrolizumab(抗 PD-1 抗体)が承認されているのみである。しかし、子宮頸癌における MSI 陽性率は高くなく、pembrolizumab を使用できる症例はかなり限定される。

海外の報告では、PD-L1 発現および HPV 感染の有無ならびに全身療法による前治療回数にかかわらず、子宮頸癌患者における pembrolizumab の奏効率は 26.3%といわれており、FDA においても本年これまで肺癌・胃癌組織に限られていた pembrolizumab の適格性コンパニオン診断としての腫瘍組織中の PD-L1 発現解析が子宮頸癌にも適応拡大されることとなった。その一方で、これまで主に肺癌において免疫組織化学染色を用いた腫瘍組織の PD-L1 発現が検討されてきたが、組織採取のタイミングや使用する抗体により染色強度が異なることもあり、一定の見解は定まっていない。他の腫瘍組織を用いたバイオマーカーとして、腫瘍組織の遺伝子変異数の指標である Tumor Mutation Burden (TMB) が高いほどネオアンチゲン数が多く、免疫チェックポイント阻害薬が有効である可能性が報告されているが、腫瘍組織を用いた遺伝子解析の問題点として、腫瘍組織を採取した時点の評価しかできない点や、進行/再発例で腫瘍組織を採取することが困難な場合は解析が難しく、子宮頸癌患者では子宮頸部の小さな生検組織しか採取できない症例も多い。

近年のがんゲノム医療において、腫瘍組織の遺伝子解析のみならず、低侵襲的に採取し得る末梢血中腫瘍循環 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) の Liquid Biopsy による遺伝子解析が注目されている。血液中には僅かながら癌細胞からアポトーシス・ネクローシスなど様々な機序で ctDNA が末梢血に放出されており、ゲノム解析技術の発展により、血液中のわずかな ctDNA から腫瘍の遺伝子変異を検出することが可能となった。侵襲的な処置が必要となる原発巣や転移巣の手術・生検検体に代わり、より簡便で低侵襲に、繰り返し経時的に腫瘍特有の遺伝子異常を解析することができる。Liquid Biopsy で経時的なモニタリングを行うことにより、腫瘍組織に代わるだけでなく、超早期癌のスクリーニング・治療病勢のモニタリング・早期再発診断としての Liquid Biopsy が注目されている。子宮頸癌の Precision medicine 研究を進める上で、新規治療戦略の開発のためには、腫瘍組織解析だけでなく、Liquid Biopsy 研究の導入が求められている。

本年 腫瘍組織を用いた TMB を Liquid Biopsy で検出する、“ Blood Tumor Mutation Burden (bTMB) ” が報告され、腫瘍組織の PD-L1 発現と独立した抗 PD-1/PD-L1 抗体の新規薬剤選択マーカーとして世界的に注目を集めている。肺癌患者において、従来の腫瘍組織からの TMB と血液中の“ bTMB ”の間の相関を示し、“ bTMB ”が腫瘍組織の TMB の代替となる可能性を示した。しかし、現在のところ肺癌に関する報告のみであり、癌治療における“ bTMB ”の有用性は未だ確立されていない。さらに子宮頸癌においては、腫瘍組織を用いた TMB 解析の報告はほとんどなく、Liquid Biopsy を用いた血液中の“ bTMB ”解析に関する報告はない。

本研究課題の核心をなす学術的「問い」として、まず子宮頸癌において血液検体から“ bTMB ”を検出できるか、腫瘍組織の TMB と相関を認めるか、組織型や進行度ごとで“ bTMB ”に差はあるか、遺伝子変異数が多い bTMB-high な症例の頻度について、“ bTMB ”が化学・放射線療法の新規治療バイオマーカーとなるか、治療による腫瘍組織の遺伝子特性の変化である“ Tumor evolution ”をモニタリングできるか、を挙げ、以下の研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、ctDNA の網羅的遺伝子解析技術として、分子バーコード法とエラー抑制法を併用する超高感度次世代シーケンサー法である CAPP-seq (cancer personalized profiling by deep sequencing)を用いる。CAPP-seq では末梢血の ctDNA 中の 197 種類の癌特異的な遺伝子異常(一塩基置換、挿入、欠失、融合、コピー数変異)を 99.99%以上の感度・特異度で検出・定量することができ、これまでの Liquid Biopsy 研究で問題となっていた“検出感度”と“網羅性”を兼ね備えた ctDNA 解析が可能となり、腫瘍特性診断や経時的モニタリングに有用だと言われている。申請者らは以前より同技術を婦人科癌で導入し、婦人科癌における CAPP-seq を用いた Liquid biopsy の有用性について継続して報告してきた (Iwahashi et al., Sci Rep, 2019 / Iwahashi, et al., Oncol Lett, 2018)。子宮頸癌においても CAPP-seq を用いた ctDNA 解析技術を用いることにより、血液採取時のリアルタイムな腫瘍特有の遺伝子異常や“ bTMB ”を解析

することができる。

子宮頸癌は他癌種に比べると Precision medicine 研究が遅れている領域であり、これまでに ctDNA-Liquid Biopsy による網羅的な遺伝子解析研究はほとんどない。結果として新規分子標的薬・免疫チェックポイント阻害薬の臨床応用の遅れをもたらしており、進行子宮頸癌の予後不良症例の治療選択肢が限られ、子宮頸癌における Precision medicine 研究の推進は急務となっている。本研究では、“bTMB”も含めた ctDNA-Liquid Biopsy の解析に最新技術である CAPP-seq を用い、腫瘍組織の解析とも比較しながら、婦人科癌治療における新規治療バイオマーカーとしての“bTMB”の有用性の検討について検討することに独創性かつ創造性がある。

3. 研究の方法

(1) 検体のサンプリングと解析

本研究に関して和歌山県立医科大学及び近畿大学医学部の倫理委員会の承認を得ており、子宮頸癌症例の検体採取を開始している。個別にインフォームドコンセントを行い、文書にて本研究に同意を得られた症例を対象とする。血液検体は ctDNA の品質を保つために cell-free DNA collection tubes を用い採取する。腫瘍組織は、手術および生検で得られた標本の一部を研究用腫瘍組織検体として採取する。子宮頸癌 80 症例の血液および腫瘍組織検体を解析対象とする。血漿、腫瘍組織検体から抽出した ctDNA の遺伝子変異解析は CAPP-seq として AVENIO ctDNA surveillance kit (197 遺伝子) を用いて行う。血液検体の“bTMB”および腫瘍組織検体の TMB は、1Mb 当たりの血液中 ctDNA および腫瘍組織中 tumor DNA から検出される non-synonymous な体細胞変異の数で計算する。

(2) Liquid Biopsy-bTMB と腫瘍組織-TMB との比較検討

Liquid Biopsy と腫瘍組織検体の遺伝子変異解析の結果を比較検討し、従来の腫瘍組織検体を用いた遺伝子変異解析との一致率および Liquid Biopsy でのみ検出された遺伝子変異の有無について検討する。さらに、Liquid Biopsy からの“bTMB”と腫瘍組織からの TMB の比較検討を行い、子宮頸癌においても血液からの“bTMB”が腫瘍の TMB の代替となるか検討する。免疫組織化学染色により腫瘍組織の PD-L1 発現を解析し、腫瘍組織の MSI 検査の結果も含め、“bTMB”との相関を解析し、腫瘍特性解析としての“Liquid Biopsy-bTMB”の有用性を検討する。

(3) 新規治療バイオマーカーとしての Liquid Biopsy-bTMB の検討

Liquid Biopsy から検出した遺伝子変異や“bTMB”と無増悪期間、全生存期間、放射線療法・化学療法の奏効率、病勢コントロール率との相関についても log rank 検定を用い、Kaplan-Meier 法で検討する。経時的に血液検体を採取できた症例に関して、治療感受性や病勢モニタリングバイオマーカーとしての“Liquid Biopsy-bTMB”の有用性を検討する。

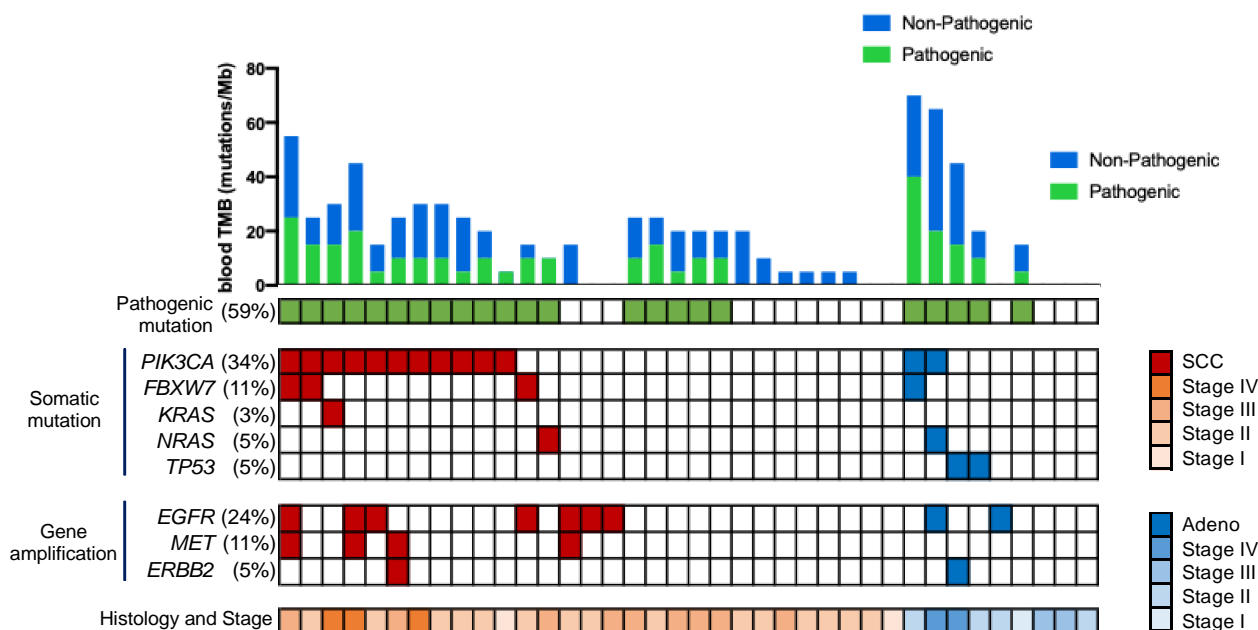


図 子宮頸癌 ctDNA リキッドバイオブシー結果

4. 研究成果

当院倫理委員会の承認のもと、38例の子宮頸癌の血漿検体での検討を行った。33/38 (87%)の症例で何らかの遺伝子異常を認め、23/38 (59%)で1つ以上の pathogenic な non-synonymous 変異が検出され[扁平上皮癌 18/29 (62%)、腺癌 5/9 (56%)], PIK3CA 変異は 13/38 (34%)と最多であった。EGFR, MET, ERBB2 遺伝子の copy number gain をそれぞれ 9/38 (24%), 4/38 (11%), 2/38 (5%)で認め、同症例の腫瘍組織の免疫化学染色でそれぞれの分子が高発現していることを確認した。さらに、同時化学放射線療法(CCRT)を施行した症例の CCRT 前後の ctDNA から、CCRT による腫瘍特性変化をモニタリングできた。CCRT 症例で予後解析を行ったところ、ctDNA 濃度が高い症例で有意に PFS/OS が不良であった($p < 0.001$)。今後の子宮頸癌における個別化治療戦略において、ctDNA-liquid biopsy による腫瘍遺伝子プロファイリングが重要だと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 岩橋 尚幸、井籠 一彦	4. 巻 76
2. 論文標題 今月の臨床 がん遺伝子検査に基づく婦人科がん治療-最前線のレジメン選択法を理解する 今後期待される検査 リキッドバイオプシーの有用性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 380 ~ 386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1409210621	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
---------	---------