

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：83802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22861

研究課題名（和文）リキッドバイオブシーを用いた膵癌術前治療のバイオマーカー開発と個別化治療への応用

研究課題名（英文）Development of liquid biopsy biomarker for precision neoadjuvant treatment for pancreatic cancer

研究代表者

今村 泰輔（Imamura, Taisuke）

静岡県立静岡がんセンター（研究所）・その他部局等・研究員

研究者番号：20870489

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：膵癌の周術期の薬物選択の指標となる遺伝子異常や、治療結果を予測できるバイオマーカー開発、それに基づく個別化治療の確立が、膵癌の更なる予後改善に不可欠である。本研究は、周術期の採血により腫瘍由来の遺伝子異常を検出（リキッドバイオブシー）することの臨床的意義を検討した。膵癌患者の術前採血を用いて網羅的に遺伝子異常を解析したところ、ドライバー変異が検出された患者は有意に早期再発が多く、予後不良であることが明らかとなった。さらに、組織検査では同定されなかった薬物選択の指標となる遺伝子異常も検出された。リキッドバイオブシーを用いた網羅的遺伝子解析は個別化治療の実現に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌における血中遊離DNAの研究は、膵癌の主要な遺伝子異常であるKRAS変異の検出が主に試みられてきた。血中遊離DNAにおけるKRAS変異の同定は膵癌の予後を予測し得ることが報告されている。一方で、KRAS変異を標的とした薬物治療は未だ開発されておらず、薬物療法の指標とはなり得なかった。我々は、410遺伝子を対象として網羅的に遺伝子異常を解析した。これまでと同様に血中のDNA異常の解析は予後予測が可能であることに加えて、低頻度ではあるが薬物治療の指標となる遺伝子異常が検出されることを明らかとした。今回の知見がリキッドバイオブシーを指標とした膵癌の個別化医療の実現に貢献し得るものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we performed a comprehensive genetic analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) using pre-operative plasma samples in resectable pancreatic cancer. As a result, somatic driver mutations were detected in 65% of the cases. The detected driver mutations included not only KRAS, but also TP53, CDKN2A, and SMAD4, which are also recognized as major driver genes. In addition, although detected less frequently, other driver mutations, such as ALK, APC, BRAF, EGFR, GNAS, IDH2, KEAP1, KIT, MAP2K1, MTOR, and NRAS were also found; these included actionable mutations. Cases in which positive driver mutations were detected were found to have significantly earlier recurrence and a poorer prognosis. The present comprehensive genomic profiling of ctDNA may serve as a fundamental resource for the development of precision medicine for pancreatic cancer based on liquid biopsy findings.

研究分野：肝胆膵外科 腫瘍生物学

キーワード：膵癌 リキッドバイオブシー 予後予測 個別化医療

1. 研究開始当初の背景

近年、FOLFIRINOX 療法と GEM+ナブパクリタキセル (nab-PTX) 併用療法による切除可能境界膵癌に対する術前治療が、治癒切除率、そして予後を改善し得ることが報告されている。さらに、2019 年に膵周囲の動脈に浸潤のない T1 から T3 の病変を対象に GEM と S-1 を用いた術前補助化学療法の有効性を検討したランダム化第 III 相試験 (Prep-02/JSAP-05) の結果が報告され、術前補助化学療法群 (NAC-GS) で手術先行群 (Up-S) に比し全生存期間が有意に良好 (ハザード比 0.72, $p = 0.015$) であることが示された。この結果は我が国の実地臨床に大きな影響を与え、今後、術前治療が膵癌の標準治療に組み込まれることが予想される。そして膵癌においても研究、開発が進む分子標的治療や免疫チェックポイント阻害薬が周術期でも使用できるように適応が拡大していくことが期待される。これら臨床試験が大きな成果と同時にもたらした課題として、補助化学療法の効果に個人差を認めたことが挙げられる。実際、Prep-02/JSAP-05 試験においては術前補助療法群 182 例のうち 42 例 (23%) は治癒切除を施行できていない。また術前補助化学療法群の全生存期間中央値は、36.7 ヶ月といまだ満足できる成績とはいえない。

以前より、担癌患者の末梢血液など体液中には、腫瘍に由来した核酸断片が存在することが知られており、リキッドバイオプシーを用いた新たな非侵襲的診断・治療バイオマーカーが近年注目されている。我々は今後の膵癌治療のさらなる成績向上には、治療開始前に化学療法に対する感受性、耐性を予測するためのバイオマーカー開発、それに基づく個別化治療の確立が不可欠と考え、リキッドバイオプシーを指標としたバイオマーカー開発、それに基づく個別化治療開発を計画した。

2. 研究の目的

膵癌において血漿遊離 DNA 解析の臨床上の有用性が報告されている [1, 2]。切除可能膵癌においては、術前の血漿遊離腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) の陽性率は 24-68% [3-9] であり、予後マーカーとしての有用性も報告されている。膵癌の主要なドライバー遺伝子のうち、KRAS 変異は組織検査では 90% 以上で検出され、これらの変異の 95% 以上はホットスポットに位置している。そのため、これまでの研究では、ctDNA を検出する方法として、デジタルドロップレットポリメラーゼ連鎖反応 (ddPCR) または KRAS 変異を標的としたターゲットシーケンスが主であった。血中遊離 DNA における KRAS 変異の同定は膵癌の予後を予測し得ることが報告されている。一方で、KRAS 変異を標的とした薬物治療は未だ開発されておらず、標的薬物療法の指標とはなり得なかった。KRAS 変異のみを対象とした解析では、近年報告されている代替ドライバー変異や薬物選択の指標となる遺伝子異常 (アクシオナブル遺伝子異常) を同定する機会を逸することになる。膵癌を対象に血中遊離 DNA において網羅的にパネルを用いて遺伝子異常を探索した研究は未だ報告されていない。本研究では、切除を受けた患者の術前血漿から抽出した遊離 DNA を用いて、410 遺伝子を対象とした包括的なパネルベースの解析を行い、その有用性を検討した。

3. 研究の方法

静岡県立静岡がんセンター病院で膵癌の切除手術を受け、解析に足る十分な量の新鮮ながん組織と術前血漿サンプルを得られた患者を対象とし、切除可能膵癌患者 33 名が本研究に登録された。血液サンプル 20 ミリリットルを EDTA チューブに採取し、速やかに遠心分離して血漿を分離し血漿から血中遊離 DNA を抽出した。ターゲットキャプチャーパネルは、40 の薬物投与の指標となる遺伝子の完全なコード領域と 370 の遺伝子のホットスポット領域を選択し、410 遺伝子をターゲットとして特別に設計した。ライブラリは、NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 (Illumina Inc.) を使用して、NovaSeq 6000 (Illumina Inc.) プラットフォームで配列決定された。Variant Call およびペア解析 (腫瘍対正常) は、DRAGEN Bio-IT Platform (v.4.2, Illumina Inc.) を使用して実施した。検出された変異は複数のデータベースを基に Tier 1 (Driver mutation)、Tier 2 (Likely driver mutation) とドライバー変異を定義した。

4. 研究成果

(1) 患者背景

2014 年 2 月から 2019 年 2 月までに静岡がんセンター病院で外科切除を受けた切除可能膵癌患者 33 名の血漿およびペア腫瘍組織検体を解析した。組織型は全例腺癌であり、腺扁平上皮癌やそ

他の特殊型膵癌は含まれなかった。病理学的病期は IIB 期 (42.4%) が最も多く、次いで III 期 (27.2%) であった。追跡期間の中央値は 38.0 カ月であった。3 年および 5 年の全生存率 (OS) は、それぞれ 54.4% および 32.3% であった。

(2) リキッドバイオプシーにおけるドライバー変異とアクシヨナブル変異

33 例のうち、30 例 (90.9%) において 39 の Tier 1 変異と 94 の Tier 2 変異が検出された。Tier 1 変異は 21 例 (63.6%) で検出され、Tier 2 変異は 29 例 (87.9%) で検出された。Tier 1 変異を有する遺伝子は頻度の高い順に TP53 (27.3%), KRAS (15.2%), KIT (12.1%), APC (9.1%), EGFR (6.1%), SMAD4 (6.1%), CDKN2A (3.0%), CDKN2A-AS1 (3.0%), GNAS (3.0%), IDH2 (3.0%), KEAP1 (3.0%), MAP2K1 (3.0%) 及び MTOR (3.0%) であった。Tier 2 変異を持つ遺伝子は頻度の高い順に TP53 (42.4%), EGFR (9.1%), Cbl (9.1%), JAK1 (9.1%), Kit (6.1%), Cdkn1b (6.1%), CTNNB1 (6.1%), EGFR-AS1 (6.1%), Erbb2 (6.1%), errfi1 (6.1%), EGFR-AS1 (6.1%), EGFR-2 (6.1%), EGFR-AS1 (6.1%), KMT2D (6.1%), KMT2D (6.1%), MSH2 (6.1%), NF2 (6.1%), NOTCH1 (6.1%), PIK3CA (6.1%), PPP2R1A (6.1%), RUNX1 (6.1%), SMARCA4 (6.1%) であった。薬剤選択の指標となる、アクシヨナブル変異は 5 つのエビデンスレベルに分類された。レベル A またはレベル B の実用的な変異は確認されなかった。レベル C の変異は 18 サンプル (54.5%) で 26 個同定され、レベル D の突然変異は 8 サンプル (24.2%) で同定された。レベル C または D 変異を有する遺伝子には KIT (24.2%), KRAS (24.2%), PDGFRA (21.2%), TP53 (15.2%), EGFR (9.1%), ALK (3.0%), IDH2 (3.0%), NRAS (3.0%) であった。

(3) 膵癌の腫瘍組織におけるドライバー変異

切除標本から採取した新線凍結標本を用いて、全エクソンシーケンスとパネルを用いたディープシーケンスを行った。全エクソンシーケンスでは、Tier 1 変異として KRAS (48.5%), TP53 (6.1%), Tier 2 変異として TP53 (21.2%), CDKN2A (6.1%), ARID3A (3.0%), DNMT3A (3.0%), KMT2D (3.0%), PALB2 (3.0%), SF3B1 (3.0%) が同定された。

パネルを用いたディープシーケンスでは、KRAS (66.7%) と TP53 (6.1%) のみが Tier 1 変異として同定され、TP53 (33.3%), KMT2D (9.1%), CDKN2A (6.1%), DNMT3A (3.0%), HNF1A (3.0%) が Tier 1 変異とされました。0%, HNF1A (3.0%), MITF (3.0%), MUTYH (3.0%), PALB2 (3.0%), RECQL4 (3.0%), SF3B1 (3.0%) が Tier 2 変異として同定された。結果を統合すると Tier 1 変異は 22 例 (66.7%) で 25 変異、Tier 2 変異は 19 例 (57.6%) で 30 変異が検出された。

(4) リキッドバイオプシーと腫瘍組織におけるドライバー変異同定の一致率

リキッドバイオプシーと腫瘍組織解析の Tier 1 変異検出の一致率は 42.4% (14/33) であった。さらに、33 例中 2 例 (6.1%) では、腫瘍組織で複数の Tier 1 変異が同定された。一方、ctDNA の解析では 33 例中 9 例 (27.3%) で複数の Tier 1 変異が検出された。KRAS 変異は ctDNA 5 例 (15.2%) と腫瘍組織 22 例 (66.7%) で Tier 1 変異として検出された。KRAS 変異状況の一致率は 30.3% (10/33) であった。TP53 変異状況の一致率は 72.7% (24/33) であった。頻度は低いが、リキッドバイオプシーでは、ALK、APC、BRAF、EGFR、GNAS、IDH2、KEAP1、KIT、MAP2K1、MTOR、NRAS など、腫瘍組織解析で検出されなかった他の多くのドライバー変異を検出することができた。

(5) リキッドバイオプシーでのドライバー変異の同定と臨床病理学的因子の関連

リキッドバイオプシーにおいて Tier 1 変異の同定を ctDNA 陽性と定義した。33 名の患者のうち、21 名 (63.6%) が ctDNA 陽性と分類された。ctDNA 陽性群は ctDNA 陰性群に比べ CA19-9 値が有意に高かった ($P=0.017$)。

(6) 切除可能な PC 患者における ctDNA 陽性の治療成績への影響

ctDNA 陽性群では、OS が ctDNA 陰性群と比較して有意に短かった ($P=0.009$)。無再発生存期間 (RFS) も ctDNA 陽性群は陰性群に比べ有意に不良であった ($P=0.001$)。OS に関する Cox 比例ハザード解析では、ctDNA 陽性が独立した予後因子 ($P=0.019$) であることが明らかとなった。ctDNA 陽性群は ctDNA 陰性群に比べ、肝転移率が高かった ($P=0.007$)。また、ctDNA 陰性群では、再発した患者全員 (100%, 4/4) が局所再発であり、遠隔臓器 (肺や肝臓など) への再発は認められなかった。術後 6 カ月以内の早期再発は、ctDNA 陽性群で有意に多く認められた ($P=0.013$)。

(7) リキッドバイオプシーにおけるドライバー変異同定の数量を評価することの有用性

ctDNA で検出された Tier 1 変異を定量化した。LB では、33 人中 21 人 (63.6%) で少なくとも 1 つの Tier 1 変異が確認された。さらに、33 例中 9 例 (27.3%) で複数の Tier 1 変異が確認され、1 人の患者で最大 5 つの変異が確認された。変異の数によって患者の OS が層別化され、変異の数が増えるほど OS は悪化する傾向にあった (ドライバー変異の数、0 vs. 1, $P=0.054$; 1 vs. 2, $P=0.147$)。変異の数によって RFS も層別化され、変異の数が増えるほど RFS は悪化する傾向を示した (ドライバー変異の数、0 vs. 1, $P=0.004$; 1 vs. ≥ 2 , $P=0.189$)。術後 6 ヶ月以内の早期再発は、1 つの Tier 1 変異群 (1/12, 8.3%) に比べ、複数 Tier 1 変異群 (5/9, 55.6%) で有意に高い頻度で認められた ($P=0.018$)。

(8) まとめ

切除可能膵癌の術前の血漿サンプルを用いてパネルを用いた ctDNA の包括的な遺伝子解析を行った。その結果、65%の症例で体細胞性のドライバー変異が検出された。ドライバー変異が陽性となった症例では、遠隔転移再発が有意に早期かつ高頻度に認められ、予後不良であることが分かった。検出されたドライバー変異には、KRAS だけでなく、膵癌の主要なドライバー遺伝子として認識されている TP53、CDKN2A、SMAD4 以外のドライバー変異やアクショナブル変異も含まれていた。本研究の結果は、リキッドバイオプシーが膵癌患者の予後予測に有用であることに加え、今回の ctDNA の網羅的ゲノムプロファイリングは、リキッドバイオプシーに基づく膵癌の個別化医療を開発するための情報基盤となる可能性があると考えている。

引用文献

1. Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, Morimoto Y, Dohi C, Tsutsumi K, et al. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer*. 2015 Jul 1;121(13):2271-80.
2. Singh N, Gupta S, Pandey RM, Chauhan SS, Saraya A. High levels of cell-free circulating nucleic acids in pancreatic cancer are associated with vascular encasement, metastasis and poor survival. *Cancer investigation*. 2015 Mar;33(3):78-85.
3. Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nature communications*. 2015 Jul 7;6:7686.
4. Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, et al. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *British journal of cancer*. 2016 Jun 28;115(1):59-65.
5. Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, et al. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017 Sep 19;114(38):10202-07.
6. Kim MK, Woo SM, Park B, Yoon KA, Kim YH, Joo J, et al. Prognostic Implications of Multiplex Detection of KRAS Mutations in Cell-Free DNA from Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical chemistry*. 2018 Apr;64(4):726-34.
7. Nakano Y, Kitago M, Matsuda S, Nakamura Y, Fujita Y, Imai S, et al. KRAS mutations in cell-free DNA from preoperative and postoperative sera as a pancreatic cancer marker: a retrospective study. *British journal of cancer*. 2018 Mar 6;118(5):662-69.
8. Groot VP, Mosier S, Javed AA, Teinor JA, Gemenetzi G, Ding D, et al. Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019 Aug 15;25(16):4973-84.
9. Lee B, Lipton L, Cohen J, Tie J, Javed AA, Li L, et al. Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2019 Sep 1;30(9):1472-78.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 今村泰輔 |
| 2. 発表標題 Clinical utility of comprehensive sequencing of circulating tumor DNA in resectable pancreatic cancer |
| 3. 学会等名 第34回日本肝胆膵外科学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今村泰輔 |
| 2. 発表標題 切除可能膵癌における、リキッドバイオプシーによる包括的ゲノムプロファイリングの臨床的意義 |
| 3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|