

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07223

研究課題名(和文)臓器横断的観察研究による再発形式依存性腫瘍由来血中DNA動態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of relapse type-dependent ctDNA dynamics on multiple tumor origins

研究代表者

西塚 哲(Nishizuka, Satoshi)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・特任教授

研究者番号：50453311

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)：2023年5月で314症例の2年間の追跡期間が終了した。ctDNAモニタリングのための採血タイムポイントの総数は2,500となっている。登録した314例で初期試料パネルシーケンスは完了し、218症例についてはctDNAモニタリングのために147種類のプローブ(症例当たり1-2種類)でデジタルPCRを行った。治療中の臨床情報は96%については入力完了し、CT/MRI画像診断は1500件の構造化された読影情報を得た。これらの情報を統合し、臓器横断的に、薬剤特異的、遺伝子変異特異的、および再発形式特異的なctDNAの動態を解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療後に必要な情報として、(i)早期再発予測、(ii)治療効果判定、(iii)無再発確認、の3つは不可欠である。本課題では独自に開発したdPCRプライブラリー技術をもとに「腫瘍で同定された体細胞変異をctDNAとしてdPCRを用いて追跡する手法」を用いて、がん治療後に必要な情報をどのような悪性腫瘍にも提供できると考えた。一方で、臓器、薬剤、測定する遺伝子、および再発形式によるctDNAの臨床的意義の違いは解明されていない。本研究により、ctDNAの臨床応用がより現実的なものになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study was initiated for elucidating the clinical validity of circulating tumor DNA (ctDNA). In our laboratory, the ctDNA monitoring system has been established by primary sequencing followed by the ctDNA monitoring using originally developed digital PCR (dPCR) primer/probe library. A two-year observation for enrolled 314 patients was completed on May 2023. Total time points for ctDNA monitoring is 2,500. Panel sequencing of primary samples has completed for 314 cases whereas dPCR for ctDNA analysis has carried out for 218 cases. Ninety-six per cent of clinical data input during cancer therapy were completed whereas 1,500 imaging data from CT/MRI were obtained as a categorical format. Upon finalizing data integration, dynamics of ctDNA monitoring will be analyzed in views across organs, drugs, genes, and types of relapse formation.

研究分野：Biomarker

キーワード：ctDNA cancer therapy

## 1. 研究開始当初の背景

血中循環腫瘍由来 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)は腫瘍崩壊とともに血中に遊離される DNA 断片である。我々は、過年度の国際共同研究加速基金(2016-2018)や新学術領域研究(システム癌新次元 2016-2018)、および複数の基盤研究(20K08966、19K09224)の支援を受け、パネルシーケンスで同定される初期試料(がん組織または治療前血液)の遺伝子変異を反映する ctDNA が腫瘍マーカーになりうることを食道、胃、大腸がんで報告してきた(Sato et al, PLoS One, 2016; Sasaki et al, PLoS One, 2020; Iwaya et al, Gastroenterology, 2020)。また、ctDNA は次世代シーケンサー(NGS)では定量測定が困難な 1%以下の変異アリル頻度(variant allele frequency, VAF)で変動するため、特定の遺伝子変異の測定に特化した高感度デジタル PCR(dPCR)で行うパイプラインを確立した(Nishizuka et al, Methods Mol Biol, 2019)。このように、原発腫瘍組織の変異を同定できれば、どの臓器由来のがんであっても迅速に ctDNA で体内腫瘍量を追跡できる体制を構築した。

この体制をもとに、我々は 2019 年より岩手医大附属病院のがん関連 17 診療科が担当する進行がん約 20 種類を対象として ctDNA モニタリングを行う MORIOKA study(Monitoring Recurrence of Individual tumor by serial Observation of Known gene Alterations)を開始した。基本的なコンセプトは非侵襲的で定量性のある腫瘍マーカーの開発である。本課題では、早期再発予測、治療効果判定、無再発状態の確定、を指標として ctDNA によるがん診断における Clinical Validity(臨床的妥当性)の評価を行う。腫瘍マーカーとしての臨床的妥当性は「アウトカムを有意に層別化できる」と定義される(Merker et al, J Clin Oncol, 2018)。今後 ctDNA が臓器横断的腫瘍マーカーとして臨床実装されるためには、再発形式が ctDNA にどのように反映されるかを検証する必要がある。特に、播種性病変では腫瘍量が ctDNA に鋭敏に反映されないとの報告もあり(Parkinson et al, PLoS Med, 2016; Vidal J, et al. Ann Oncol, 2017)、ctDNA 検査の臨床実装に向けては慎重なデータ収集が必要である。本課題では、MORIOKA study を通じて集積される約 20 種類の進行がん 300 例のうち、予想される再発がん約 100 例を対象に再発形式依存性に ctDNA の臨床的妥当性が異なるか、という問いに答える。

## 2. 研究の目的

国内におけるがん死亡の原因のほとんどは治療後の再発である。その形態は局所、リンパ節、他臓器転移、および播種など多様である。胃がんの腹膜播種や大腸がんの肝転移など特定のがんに特徴的な再発形式はあるが、頻度が低いため臓器ごとの解析は難しい。MORIOKA study では 20 種類以上のがんについて「治療開始 2 年以内に 30%程度再発が予想される」症例を対象としている。本課題では「臓器横断的」観察研究を通して再発形式に対応した ctDNA の腫瘍マーカーとしての臨床的妥当性を検証することを目的としている。現在登録開始から 1 年 4 カ月が経過し、分担研究者の岩谷(研究事務局長)のもと、登録 248 例、合計 1,000 タイムポイント以上の血液検体を現有している。248 例の内訳は、大腸(48 症例)、肺(46)、食道(21)、肝臓(19)、胃(14)、前立腺(10)などとなっている(図 2)。腫瘍マーカーとしての ctDNA 計測では、VAF の検出限界が 5%程度である NGS では変動の捕捉が難しく、かつ NGS の利点である探索的な遺伝子解析は不要である。我々の先行研究からは検出限界が 0.01%程度である dPCR が最適技術である確証を得た(図 3)。

本研究の独自性は MORIOKA study による臓器横断的症例集積と現有する多数の dPCR プロブセットによるものである。多様ながんの遺伝子変異に対応するため、研究分担者の開を中心にして我々は COSMIC データベースをもとにヒトがんの遺伝子変異を頻度順にリスト化し、独自の dPCR プロブライブラリーとして特許化した(特許第 6544783 号)。本ライブラリーのプライマープローブは日本遺伝子研究所(仙台市)が独占的に提供する Hypercool Primer&Probe(HPP)技術を用いて設計されており、断片化された血漿中の DNA でも効果的に PCR 産物が得られる。優先して合成した TP53, KRAS, PIK3CA, EGFR, BRAF の変異を対象とする計 155 種類のプロブは高頻度変異に特化しており、ヒトがんにおける大半の変異に対応できる(図 4)。このような実用性に富む dPCR ライブラリーは国際的にも例がなく、我が国のがん研究基盤として、また産業シーズとしても重要である。また、HPP 技術は用いていないが、市販の TERT(C228T, C250T) プロモーター領域、および先行論文による EGFR exon19del(Oskina et al, Mol Diagn Ther, 2017)を用いた dPCR プロブも現存し検証を終えている。

### 3. 研究の方法

はじめに生検組織、手術組織、または治療前血漿から抽出した DNA を用いてパネルシーケンス (CHPv2, Comprehensive Cancer Panel, CancerSCAN, LiquidSCAN, および Oncomine Precision Assay) を行った。パネルは統一していないが、臓器により適したパネルが異なること、対象 DNA が組織・血液由来かで解析工程が異なることなどを考慮した。また、本研究での ctDNA はモニタリングとして使用されるため、一般的な広く変異を捕捉するプロファイリング目的とは異なり、多くとも数個の治療前に存在した体細胞変異を同定できればよい。いずれのシーケンス解析でも変異コールが得られた変異に関しては、ctDNA に適した体細胞変異を同定するプログラムでの遺伝子変異選定の対象とした。この遺伝子変異選定プログラムでは、ライブラリー化したプローブの中にあるものを優先的に選定する。申請時 155 種類であったプローブ数は本課題終了までに 1000 種類以上の選定と 400 種類以上の動作確認を終了した。ctDNA としてモニタリングする遺伝子変異を選定したのち定期採血から得られる ctDNA を dPCR で測定し時系列データを得た。ctDNA の時系列データが得られた一部症例については臨床情報と統合し、治療および治療後再発・再増殖データとの比較を行うことが可能となる。ctDNA の時系列データと臓器横断的な再発形式との比較は観察期間内に撮像された CT について放射線診断医による判定をもとに解析する。

### 4. 研究成果

本課題では 2019 年 5 月に開始した臨床研究「MORIOKA study」を推進し、進行再発がんを対象として臓器横断的かつ再発形式依存性にどのようながん細胞由来血中 DNA(ctDNA) が変動するかを観察することを目的としている。2021 年 5 月までの期間で登録された 314 例に対する時系列採血を継続しており、2023 年 5 月で全症例の 2 年間の追跡期間が終了した。登録されたがんの臓器・種類内訳(症例数)は、肺(57)、大腸(53)、食道(26)、子宮体部(25)、肝(23)、胃(17)、卵巣(13)、脳(12)、胆道(11)、骨軟部(10)、前立腺(10)、上部尿路上皮(9)、腎(8)、乳房(7)、頭頸部(7)、脾(6)、膀胱(5)、皮膚(5)、小児腫瘍(3)、子宮頸部(3)、造血器(2)、原発不明(2)となっている。2024 年 3 月現在、すでに 99% の症例で追跡が完了しており、採血タイムポイントの総数は 2,500 となっている。登録した 314 例のうち、全例で初期試料(治療前の組織または血液)のパネルシーケンスは完了し、デジタル PCR については 65% については対応するプローブを現有しており、現在 218 症例について 147 種類のプローブ(症例当たり 1-2 種類)で解析を行っている。また、対応する CT/MRI 画像診断は 1500 件の構造化された読影情報を得た。治療中の臨床情報は 96% について入力完了している。引き続き臨床情報の集積を集積を行っているが、3 か月に 1 回のがん関連診療科を対象とした MORIOKA study の実務者会議を通して研究事務局と各科臨床医との意思疎通を図っている。すべての情報が揃い次第、臓器横断的に、薬剤特異的、遺伝子変異特異的、および再発形式特異的な ctDNA の動態を解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tamura Daichi, Abe Masakazu, Hiraki Hayato, Sasaki Noriyuki, Yashima Abo Akiko, Ikarashi Daiki, Kato Renpei, Kato Yoichiro, Maekawa Shigekatsu, Kanehira Mitsugu, Takata Ryo, Maejima Kazuhiro, Sasagawa Shota, Fujita Masashi, Suzuki Yutaka, Nakagawa Hidewaki, Iwaya Takeshi, Nishizuka Satoshi S., Obara Wataru	4. 巻 115
2. 論文標題 Postoperative recurrence detection using individualized circulating tumor <scp>DNA</scp> in upper tract urothelial carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 529 ~ 539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16025	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 Abe Masakazu, Hiraki Hayato, Tsuyukubo Takashi, Ono Sadahide, Maekawa Shigekatsu, Tamura Daichi, Yashima-Abo Akiko, Kato Renpei, Fujisawa Hiromitsu, Iwaya Takeshi, Park Woong-Yang, Idogawa Masashi, Tokino Takashi, Obara Wataru, Nishizuka Satoshi S.	4. 巻 26
2. 論文標題 The Clinical Validity of Urinary Pellet DNA Monitoring for the Diagnosis of Recurrent Bladder Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Molecular Diagnostics	6. 最初と最後の頁 278 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmoldx.2024.01.006	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 該当する

〔学会発表〕 計33件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 16件）

1. 発表者名 西塚 哲
2. 発表標題 腫瘍マーカーとしての体細胞変異
3. 学会等名 第94回日本病理学会東北支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西塚 哲
2. 発表標題 腫瘍由来血中循環DNAによる最新の腫瘍再発モニタリング検査
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西塚 哲
2. 発表標題 体細胞変異に基づく新規高感度 腫瘍マーカーの社会実装
3. 学会等名 第42回日本分子マーカー研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西塚 哲
2. 発表標題 腫瘍由来循環DNA(ctDNA)によるデジタルPCRプロブライブラリーを用いたがん治療モニタリング検査
3. 学会等名 第7回Liquid Biopsy研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Nishizuka
2. 発表標題 Integrative proteogenomic analysis for cancer therapeutic biomarker discovery
3. 学会等名 2023 International Cancer Proteogenomics Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西塚 哲
2. 発表標題 腫瘍由来血中循環DNA(ctDNA)による デジタルPCRプロブライブラリーを用いた がん治療モニタリング検査
3. 学会等名 第20回臨床腫瘍学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Satoshi Nishizuka
2. 発表標題 Somatic mutations in blood as tumor marker for cancer treatment monitoring
3. 学会等名 International Conference 2021 on Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Nishizuka
2. 発表標題 Circulating tumor DNA as versatile tumor marker in the treatment of pan-cancer
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishizuka SS, Hiraki H, Abe M, Yashima-Abo A, Iwaya T
2. 発表標題 An introduction of a highly sensitive circulating tumor DNA monitoring system for minimal residual disease detection using a library of 1000 digital PCR probes
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiraki H, Yashima-Abo A, Iwaya T, Nishizuka SS
2. 発表標題 A digital-PCR primer/probe library for pan-cancer ctDNA monitoring established from public databases for somatic mutations
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Abe M, Hiraki H, Tsuyukubo T, Ono S, Maekawa S, Tamura D, Ikarashi D, Kato R, Matsuura T, Kanehira M, Takata R, Fujisawa H, Iwaya T, Idogawa M, Obara W, Nishizuka SS
2. 発表標題 The clinical validity of urinary pellet DNA monitoring of recurrent bladder cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Endo F, Iwaya T, Hiraki H, Abo A, Itamochi1 H, Nishizuka SS
2. 発表標題 Tumor-informed ctDNA monitoring in daily practice for patients with esophageal cancer
3. 学会等名 The 82nd annual meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nishizuka SS
2. 発表標題 OTS-Assay -Tumor-informed highly-sensitive digital PCR for the navigation of advanced cancer treatment
3. 学会等名 The 82nd annual meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiraki H, Iwaya T, Nishizuka S
2. 発表標題 Analysis of the "off-the-shelf" digital-PCR primer/probe library, OTS-1000ex for the evaluation of clinical usability
3. 学会等名 The 82nd annual meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tamura D, Abe M, Kato1 R, Kato1 Y, Maekawa S, Kanehira M, Takata R, Suzuki Y, Nakagawa H, Nishizuka S, Obara W
2. 発表標題 Postoperative recurrence prediction using circulating tumor DNA monitoring in upper tract urothelial carcinoma
3. 学会等名 The 82nd annual meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kogo R, Manako T, Hiraki H, Nishizuka SS, Tange S, Idogawa M, Tokino T, Nakagawa T
2. 発表標題 Prediction of treatment response by ctDNA monitoring in recurrent metastatic head and neck cancer
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakai T, Kitahata Y, Nakamura Y, Motobayashi H, Takemoto N, Ojima T, Hayata K, Iwaya T, Hiraki H, Nishiduka SS, Kawai M
2. 発表標題 The usefulness of ctDNA and exosome DNA as biomarkers in esophageal squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿保 亜紀子, 開 勇人, 岩谷 岳, 西塚 哲
2. 発表標題 OTS-アッセイのための病理学的検討およびその応用
3. 学会等名 第43回日本分子腫瘍マーカー研究会 (国際学会)
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 岩谷 岳, 遠藤 史隆, 八重樫 瑞典, 佐々木 教之, 佐々木 智子, 藤澤 良介, 開 勇人, 阿保 亜紀子, 板持 広明, 西塚 哲
2. 発表標題 がん患者診療におけるCirculatingtumorDNA検査の意義
3. 学会等名 第61回日本癌治療学会総会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩谷 岳, 西塚 哲
2. 発表標題 ゲノムプロファイリング検査の日常診療における個別化ctDNA検査への有効活用
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nishizuka SS, Hiraki H, Yashima-Abo A, Iwaya T
2. 発表標題 The clinical validity of tumor-informed ctDNA monitoring using a library of 1,000 dPCR primer/probe sets
3. 学会等名 European Liquid Biopsy Society General Assembly (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉澤 大輝, 岩谷 岳, 遠藤 史隆, 八重樫 瑞典, 大塚 観喜, 板持 広明, 西塚 哲
2. 発表標題 当院における下部消化癌症例がん遺伝子パネル検査の状況
3. 学会等名 第34回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩谷 岳, 西塚 哲
2. 発表標題 高感度個別化腫瘍マーカーとしてのctDNA検査
3. 学会等名 第34回日本消化器癌発生学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部正和, 開 勇人, 田村大地, 前川滋克, 小原 航, 西塚 哲
2. 発表標題 経尿道的膀胱腫瘍切除術の周術期血漿circulating tumor DNAの動態
3. 学会等名 第8回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 遠藤史隆, 岩谷 岳, 開 勇人, 阿保亜紀子, 板持広明, 西塚 哲
2. 発表標題 食道癌日常診療におけるCGP検査とctDNAモニタリング
3. 学会等名 第8回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩谷 岳
2. 発表標題 「その診断ありますか? ctDNAモニタリングが変えるがん診療」
3. 学会等名 第8回リキッドバイオプシー研究会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西塚 哲
2. 発表標題 個別化デジタルPCRによる超高感度腫瘍由来循環DNAモニタリング
3. 学会等名 第8回リキッドバイオプシー研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大塚歡喜, 八重樫瑞典, 梅邑 晃, 片桐弘勝, 遠藤史隆, 開 勇人, 阿保亜紀子, 岩谷 岳, 西塚 哲, 新田浩幸, 佐々木章
2. 発表標題 Digital PCRを用いた微小な遠隔転移を有する大腸癌のctDNAモニタリング
3. 学会等名 第8回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 開 勇人, 阿保亜紀子, 岩谷 岳, 西塚 哲
2. 発表標題 ヒトがん高頻度変異を対象としたdPCRプライマー・プローブライブラリOTS-1000exの利用可能性と現状
3. 学会等名 第8回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 阿保亜紀子, 開 勇人, 岩谷 岳, 西塚 哲
2. 発表標題 アーカイブ組織を用いたOTS-アッセイのための病理学的検討およびその応用
3. 学会等名 第8回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田村大地, 阿部正和, 五十嵐大樹, 前川滋克, 加藤廉平, 鈴木穰, 中川英刀, 西塚 哲, 小原 航
2. 発表標題 上部尿路上皮がん術後患者における症例特異的ctDNAによる再発予測
3. 学会等名 第8回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Nishizuka SS, Hiraki H, Yashima-Abo A, Sasaki T, Fujiwara R, Sasaki N, Inaba T, Sasaki T, Yaegashi M, Iwaya T
2. 発表標題 Tumor-informed frequent ctDNA monitoring confirms the clinical validity in advanced cancer therapy
3. 学会等名 2024 Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hiraki H, Yashima-Abo A, Iwaya T, Nishizuka SS
2. 発表標題 Development and optimization of the off-the-shelf digital PCR primer/probe library for ctDNA monitoring
3. 学会等名 2024 Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS2024)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 がんの診断のためのプローブ/プライマーライブラリー	発明者 開勇人、西塚哲	権利者 株式会社クオントディテクト
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/043189	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 膀胱癌に関連した変異DNAの分析方法、並びにそのためのデジタルPCR用プライマー及びプローブ	発明者 阿部正和、西塚哲	権利者 株式会社クオントディテクト
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-209854	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

西塚研究室  
nishizukalab.org

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	開 勇人  (Hiraki Hayato)  (50847358)	岩手医科大学・医歯薬総合研究所・助教   (31201)	
研究 分 担 者	岩谷 岳  (Iwaya Takeshi)  (70405801)	岩手医科大学・医学部・特任教授   (31201)	

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