

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20794

研究課題名（和文）肝細胞癌におけるカスタム遺伝子パネルを用いた循環腫瘍DNAの検出と有用性の探求

研究課題名（英文）The utility of detecting circulating tumor DNA using a custom gene panel in hepatocellular carcinoma

研究代表者

藤井 康智（Fujii, Yasutoshi）

広島大学・消化器内科・医科診療医

研究者番号：80964478

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）：肝細胞癌の手術症例、術前腫瘍径3cm以上、AFP and PIVKA II negativeであった30症例の、凍結組織サンプル、cfDNAサンプル、PBMC DNAサンプル（合計90サンプル）をカスタムパネルを用いてバーコードシーケンスにかけ、次世代シーケンサーに提出した。しかし、血液からのctDNAの検出感度自体が低く、組織とctDNAと一致した変異が検出された症例は、全体では15.6%にとどまっていた。症例数は少ないが、ステージが上がるにつれ、腫瘍個数が増えるにつれ、腫瘍最大径が大きくなるにつれ、ctDNA検出率は高くなることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

安定したctDNAの検出には腫瘍量を要することが分かった。今後全身薬物療法の適応となる患者を対象にし研究を継続する予定である。低コストで安定したctDNAの検出は、腫瘍マーカーとしての解析、奏効に関するバイオマーカー解析、また免疫療法では欠かせない腫瘍微小環境解析において重要な情報を提供するツールとなりうる。

研究成果の概要（英文）：Frozen tissue samples, cfDNA samples, and PBMC DNA samples (90 samples in total) from 30 surgical cases of hepatocellular carcinoma with preoperative tumor diameter >3 cm, AFP and PIVKA II negative, were subjected to barcode sequencing using a custom panel. However, the sensitivity of detecting ctDNA was low, and mutations consistent with tissue and ctDNA were detected in only 15.6% of the cases overall. Although the number of cases was small, the ctDNA detection rate was found to increase as the stage increased, as the number of tumors increased, and as the maximum tumor diameter increased.

研究分野：肝胆膵

キーワード：循環腫瘍DNA 肝細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

循環腫瘍 DNA (ctDNA) は腫瘍細胞から放出され血中を遊離する DNA 断片であり、ctDNA から得られる遺伝学的情報はリキッドバイオプシーとして利用されるが、肝細胞癌 (HCC) における有用性の報告は少ない。申請者らは、切除不能進行 HCC において、Guardant360 (米国で FDA 承認されているリキッドバイオプシーとして ctDNA を検出する網羅的がん遺伝子パネル) で検出される ctDNA の体細胞変異アレル頻度の平均値は病勢を反映していることを明らかにした。本研究では、費用対効果のバランスを鑑み、HCC で検出頻度の高い 3 遺伝子 (*TERT*、*TP53*、*CTNNB1*) をターゲットとして遺伝子パネルを設計した。このパネルを用いた分子バーコードシーケンスを行い、HCC における腫瘍マーカーや遺伝子変異解析ツールとしての、ctDNA の有用性の確立を目的とする。3 遺伝子パネルは、予備的実験により、検出の正確性や具体的なコストについては既に検証が終了しており、本研究により有用性が明らかになれば、新規腫瘍マーカーとして臨床応用に繋げることができると期待される。

2. 研究の目的

当院のデータでは、TNM stage II で 53% (929 例中 496 例)、stage III でも 41% (670 例中 274 例) の症例で AFP は 20ng/ml 未満であった。AFP 陰性の HCC においても ctDNA が腫瘍マーカーとなりうるということが分かれば、臨床的にも大きな役割を担うツールの一つとなると考えられる。一方、Guardant360 の様な網羅的がんパネル検査は高コストであり、1 検体あたり数十万円程度の費用がかかるのがネックである。申請者らは、先行研究で変異頻度の高かった、Top3 遺伝子 (*TERT* 54%、*TP53* 42%、*CTNNB1* 42%) を標的とした次世代シーケンサー (NGS) 用パネルを作製し、コストや変異解読の両面でパネルの妥当性を検討してきた。変異頻度の高い遺伝子に絞ることで、コスト削減と診断や検出を助ける新規腫瘍マーカーや薬剤の奏功や耐性に関する遺伝子変異の解析ツールとして有用性を両立できるか、という点を明らかにすることを目的とし本研究を立案した。

3. 研究の方法

本研究では 2 つの独立したコホートにおいて、TOP3 遺伝子パネルの腫瘍マーカーとしての有用性を検討する study1、同パネルで検出された変異と治療奏効性および腫瘍微小環境を解析する study2 を行う。

Study1 では、2014 年～2021 年に申請者らの施設にて外科的に切除された、腫瘍径 1cm 以上の HCC 60 症例、および、非担癌症例 30 例から構成されるコホート 1 において、手術前後の血漿 2mL から抽出した DNA (cfDNA)、末梢単核細胞から抽出した DNA (生殖細胞系変異の解読のため) から、Top3 遺伝子パネルを用いてライブラリー作製を行い、NGS による分子バーコードシーケンスを行う。HCC 症例では、癌凍結組織から抽出した DNA も同様に解析する。組織 DNA も cfDNA と同様にライブラリー作製を行い、分子バーコードシーケンスを行うことで、設計したパネルで検出された ctDNA の妥当性の検証が可能となる。臨床経過を含めて以下の検討を行う。① ctDNA と組織 DNA の変異がどの程度一致しているかを比較し、検出された ctDNA の意義を検証する。② HCC の検出における ctDNA の診断感度と診断特異度を算出し、AFP との比較を行う。③ 経時的な ctDNA の推移と、術後の早期再発や転移との関連を解析する。以上より、検出された ctDNA の妥当性と、ctDNA の腫瘍マーカーとしての有用性を明らかにする。

Study2 では、Atezolizumab + Bevacizumab 併用療法の HCC 患者 50 症例から構成されるコホート 2 において、治療開始前後の血漿 2mL から抽出した DNA から、Study1 と同様に分子バーコードシーケンスを行い、以下のことを明らかにする。① TOP3 遺伝子パネルにより同定された変異と奏効や耐性との関連について。② 治療開始前の 30 症例の腫瘍生検 FFPE 検体を用いて CD3、CD8、PD1、PD-L1 の免疫染色を行い、Top3 遺伝子パネルにより検出された CTNNB1 変異の有無と、腫瘍免疫微小環境との関連についての検証を行う。以上より、薬物治療における腫瘍マーカーとしておよび遺伝子変異解析ツールとしての有用性、また ctDNA の CTNNB1 変異陽性と cold tumor との関連を明らかにする。

TOP3 遺伝子 (*TERT*、*TP53*、*CTNNB1*) をターゲットとしたパネル (xGen™ Custom Hyb Panel) を作製し、上述の先行研究で使用したサンプルと同症例の血漿を用いた予備的実験の結果、標的とする 3 遺伝子上の変異については Guardant360 での結果と 90% 以上一致しており、検出系の妥当性は確認できている。また、1 万 3000 円/サンプルという、日常的に使用する場合も実現的な費用で、抽出からシーケンス結果を得ることができた。腫瘍組織からの DNA 抽出を Qiamp DNA Mini Kit を用いて行い、一致する症例の切除前の血漿から Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit を用いて cfDNA を抽出する。

4. 研究成果

2022 年度に手術検体の組織 DNA と血液からの ctDNA を、カスタムパネルにて変異の検出を行い (Study1) 解析を行なった。2014 年 3 月から 2021 年 5 月の期間で、手術症例、術前腫瘍径

3cm 以上、AFP and PIVKA II negative であった 30 症例の、凍結組織サンプル、cfDNA サンプル、PBMC DNA サンプル(合計 90 サンプル)を設計したバーコードシーケンスにかけ、次世代シーケンサーに提出した。しかし、血液からの ctDNA の検出感度自体が低かった。その影響で、組織 DNA で検出され、ctDNA でも一致した変異が検出された症例は、全体では 15.6%にとどまっていた。症例数は少ないが、ステージが上がるにつれ、腫瘍個数が増えるにつれ、腫瘍最大径が大きくなるにつれ、ctDNA 検出率は高くなることがわかった(ステージ 2 or 3 : 33%、ステージ 4 : 100%)。そのため、全身薬物療法の適応となる患者を対象にして検討を行う方針とした。2023 年 2 月に、デュルバルマブ+トレメリムマブ併用療法が、切除不能な肝細胞がんに対し保険適用された実臨床の流れをふまえ、Study2 の症例対象をデュルバルマブ+トレメリムマブ併用療法を受けた症例へ変更する方針とした。現在、導入患者の血漿を用いて、cfDNA の抽出、PMBC の回収を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------