

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461687

研究課題名(和文) 血液循環腫瘍DNAを用いたメラノーマ患者の遺伝子解析

研究課題名(英文) Gene analysis in melanoma patients using circulating tumor DNA

研究代表者

芦田 敦子 (ASHIDA, Atsuko)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：00596786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Circulating tumor DNA(ctDNA)はがん患者において腫瘍の状態を反映する新しいバイオマーカーである。末梢血中のctDNAは微量なので高感度な検出法が必要である。我々はcastPCR法やdroplet digital PCR法を用いて悪性黒色腫患者のBRAF変異やNRAS変異をもつctDNAを定量解析した。ctDNAは進行期の腫瘍量が多い患者で検出され、予後と関係していた。また、抗PD1抗体やBRAF阻害薬の治療前後にctDNAをモニタリングしたところ、ctDNAの変化は画像評価と相関した。以上よりctDNAは治療効果や再発を反映できる有用なマーカーとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor DNA (ctDNA) is a novel biomarker for evaluating the features of tumors in cancer patients. Detection of ctDNA usually requires specialized equipment, because blood includes only a small amount of the tumor-derived DNA. We assessed the utility of BRAF- and NRAS mutated ctDNA levels using competitive allele specific TaqMan PCR (castPCR) or droplet digital PCR. ctDNA was detected in cases with heavy tumor burden as advanced disease. Detection of ctDNA was associated with poor prognosis. Quantification of ctDNA (BRAFmutant or NRASmutant) levels during the treatment course (nivolumab or vemurafenib) showed dynamic changes corresponding to radiologic and clinical alterations. Our finding suggest that ctDNA might be a useful biomarker of clinical response and tumor recurrence while monitoring patients with metastatic melanoma.

研究分野：メラノーマの遺伝子異常

キーワード：ctDNA メラノーマ BRAF NRAS バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫(メラノーマ)はメラノサイト系細胞の癌化によって生じる非常に悪性度が高い皮膚悪性腫瘍である。進行期メラノーマの治療は困難で有効な治療法がなかったが、近年免疫チェックポイント阻害薬や分子標的治療薬の開発が進み、本邦でもニボルマブとイピリムマブ、変異 BRAF 阻害薬であるベムラフェニブが臨床応用できるようになった。これらの薬剤により著しくメラノーマ患者の生存期間が延長された。分子標的薬は高い奏効率を有する一方、その効果は数か月と一時的でありことが多い。また免疫チェックポイント阻害薬は奏効した場合は長期間有効性を示すが、奏効するのは全体の 10~30%である。そのため、漫然と治療を行うのではなく、病勢を正確に評価し、個々の症例にあった的確な治療薬の選択が必要不可欠になっている。具体的には、病勢、予後、治療に対する反応、再発、薬剤耐性などのリアルタイムな評価が必要である。そのようなバイオマーカーとして、私たちは末梢血中の腫瘍細胞由来 DNA (ctDNA : Circulating Tumor DNA) に着目した。ctDNA は癌細胞が崩壊することにより末梢血に現われる。ctDNA の検出は体内のがんの存在を意味する。また、ctDNA を定量解析することでの治療効果や再発、予後と関連していることが様々な癌腫で報告されている。検体を採血で得ることができるので患者への負担が少なく、頻回に検査が可能である。ctDNA は個々人に最適な治療を選択する上で極めて有用と思われる。

## 2. 研究の目的

本研究では、患者末梢血中の BRAF 変異や NRAS 変異を有する ctDNA を経時的に定量測定し、メラノーマの治療効果・再発・薬剤耐性の判定を画像よりも早期に評価しえるシステムの構築を目指す。今後、メラノーマの治療法は遺伝子変異の有無により、分子標的薬、抗体製剤、ダカルバジンなどの中から最適のものを選択するようになると思われる。治療指針の選択が重要になり、進行期メラノーマの治療指針の確立に本研究は大きな貢献を果たすものと考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象患者の選別

手術や生検による腫瘍組織を用いて、Sanger 法にて BRAF、NRAS、KIT の遺伝子変異を調べる。まず BRAF 変異陽性の患者について変異 ctDNA を定量解析する。次に対象遺伝子を NRAS に拡大する。

### (2) サンプリングと検体処理

手術前後、進行期の治療前後と経時的に採血する。患者から採血→血漿の分離→市販キットを用いて DNA 抽出する。

### (3) 高感度検出法による ctDNA の検出

Competitive allele specific TaqMan PCR (castPCR)(図1)と droplet digital PCR (ddPCR)(図2)の2つの方法を使用した。

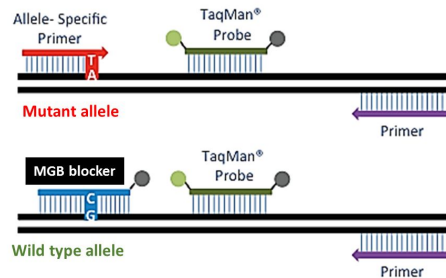


図1 castPCR

MGBブロッカーにより野生型アレルの増幅を抑制する

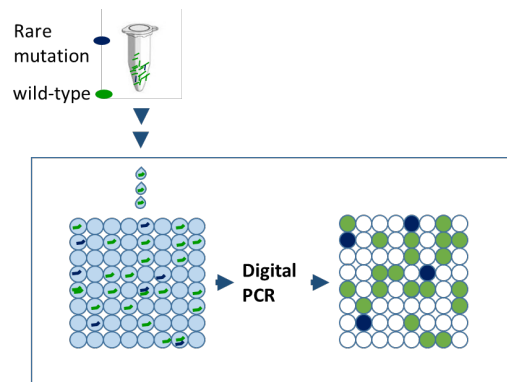


図2 ddPCR

微量サンプル中のrare mutationを検出できる

メラノーマの細胞株 (BRAF 変異型、NRAS 変異型、BRAF/NRAS 野生型) を用いて検出感度を調べた。次に健常人血漿による特異度を解析した。

患者検体について進行度別、全身的治療前後に経時的に定量解析した。

### (4) 患者検体による結果の解析

どのような臨床症状の患者で ctDNA が検出されるか、ctDNA 量の変化が治療への反応、薬剤耐性、再発と相関するか、CT 画像、lactate dehydrogenase (LDH) や、5-S-Cysteinyldoma (5-SCD) と比較し、どのマーカーが鋭敏かなどを評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 検出感度、特異度

メラノーマの培養細胞を用いて検出感度を検討したところ、いずれの方法も検出限界は0.5%から1%だった。健常人血漿による特異度については、castPCRは100%、ddPCRではわずかに偽陽性が検出されたため閾値を設定した。

### (2) 臨床検体によるモニタリング

BRAF 変異もしくは NRAS 変異を有する進行期メラノーマ患者について変異 ctDNA をモニタリングした。

ctDNA は進行期で腫瘍量が多い患者にのみ検出された。ctDNA が検出された患者は予後不良だった。また ctDNA の変化は画像評価と相関し、ニボルマブやベムラフェニブなど治療効果や再発と一致した。さらに、治療開始から2~4週間で ctDNA は変化した。症例によっては LDH、5-SCD よりも鋭敏に変化した(図3)。

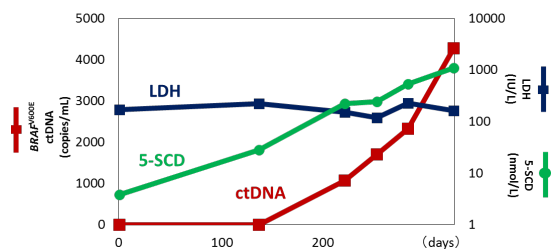


図3 血中バイオマーカーの経時的変化

以上より、ctDNA は、進行期メラノーマ患者について病勢や治療に対する反応・再発を反映する有用なマーカーとなりうると考えた。画像評価は数か月毎にしか行えないが、ctDNA の測定を加えることでより早期に治療効果を予測でき、治療方針の選択に役立つことが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Sakaizawa K, Ashida A, Uhara H, Okuyama R. Detection of BRAFV600K mutant tumor-derived DNA in the pleural effusion from a patient with metastatic melanoma. Clin Chem Lab Med 55(4): e92-e95, 2017, 査読あり
2. Ashida A, Sakaizawa K, Mikoshiba A, Uhara H, Okuyama R. Quantitative analysis of the BRAFV600E mutation in circulating tumor-derived DNA in

melanoma patients using competitive allele-specific TaqMan PCR. Int J Clin Oncol 21(5): 981-988, 2016, 査読あり

3. 芦田敦子, 木庭幸子, 宇原久. カレントセラピー 34(4): 32-37, 2016, 査読なし
4. Ashida A, Uhara H, Mikoshiba A, Sakaizawa K, Kumagai N, Koga H, Okuyama R. Melanoma with BRAF mutation in circulating cell-free DNA despite no mutation in the primary lesion: A case report. Acta Derm Venereol 96(1): 128-129, 2016, 査読あり
5. 芦田敦子, 宇原久. 家族性腫瘍 Familial atypical multiple mole melanoma syndrome. 日本臨床 73(増刊6): 99-102, 2015, 査読なし
6. 芦田敦子, 宇原久. メラノーマ最新情報 日本人における MAPK 系の遺伝子変異率と遺伝子検査の実際. Monthly Book Derma 230: 63-68, 2015, 査読なし
7. Sakaizawa K, Ashida A, Okuyama R, Uhara H (他 12 名), J Dermatol Sci 80(1): 33-37, 2015, 査読あり

[学会発表](計8件)

1. 芦田敦子, 境澤香里, 宇原久, 奥山隆平. 末梢血中の腫瘍由来 DNA を用いた悪性黒色腫に対するニボルマブ治療効果の評価. 第 193 回信州地方会. 2017.3.26, 松本
2. 芦田敦子, 境澤香里, 宇原久, 奥山隆平. Quantitative analysis of the BRAFV600E in circulating tumor-derived DNA using competitive allele-specific TaqMan PCR in melanoma patients. 第 30 回表皮細胞会. 2016.11.12, 弘前
3. 境澤香里, 芦田敦子, 宇原久, 奥山隆平. 胸水中の cell-free DNA より BRAFV600K を検出できた進行期悪性黒色腫の 1 例. 第 80 回東部支部学術大会信州地方会. 2016.10.29-30, 浜松
4. 芦田敦子, 境澤香里, 宇原久, 奥山隆平. Evaluation of response to nivolumab treatment in patients with metastatic melanoma using circulating tumor DNA. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016.10.6-8, 横浜
5. 芦田敦子. メラノーマの遺伝子異常. 第 115 回日本皮膚科学会癌学術総会. 2016.6.3-5, 京都
6. 芦田敦子, 御子柴飛鳥, 境澤香里, 古賀弘志, 熊谷尚美, 宇原久, 奥山隆平. 血液循環腫瘍 DNA により BRAF 変異を検出した進行期悪性黒色腫の 1 例. 第 115 回日本皮膚科学会癌学術総会. 2016.6.3-5, 京都
7. Ashida A, Sakaizawa K, Uhara H,

Okuyama R. Detection of BRAFV600E circulating tumor DNA using castPCR in patients with advanced melanoma. 第74回日本癌学会学術総会. 2015.10.8-10, 名古屋

8. 境澤香里, 芦田敦子, 宇原久, 奥山隆平.(他12名). 日本人の悪性黒色腫のBRAF, NRAS, KIT変異率と臨床所見. 第114回日本皮膚科学会学術総会. 2015.5.29-31, 横浜

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

芦田 敦子 (ASHIDA, Atsuko)  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号: 00596786

### (2)研究分担者

奥山 隆平 (OKUYAMA, Ryuhei)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号: 0080292332

宇原 久 (UHARA, Hisashi)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 0040201355

### (3)連携研究者

なし