

90	CAPP-Seqを用いた膵癌化学療法耐性メカニズムの解明	廣野 誠子
----	-------------------------------------	-------

【目的】 難治癌である膵癌患者の生存期間延長に向けた研究成果が徐々に明らかになってきた一方、化学療法に対して十分な治療効果が認められない膵癌や、外科的切除後補助化学療法を施行しても再発・転移が生じる膵癌症例も多い。すなわち、膵癌に対する化学療法の感受性と耐性メカニズムの解明に関する分子マーカーの開発が急務である。膵癌は腫瘍不均一性をもつため、生検組織の遺伝子異常解析では薬剤に対する感受性を評価することはできず、また治療に対する反応性・耐性を評価するためには、治療中繰り返し遺伝子解析を行う必要があり、高侵襲な組織生検を繰り返すことは不可能である。近年、原発巣の腫瘍から血中に循環する腫瘍細胞の DNA (circulating cell-free tumor DNA : ctDNA) を用いた非侵襲的な遺伝子解析が注目され、癌の診断・治療予測への応用が期待されている。とくに、Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq) は、197 種類の遺伝子の癌特異的に変異を認める領域を同時にシーケンスし、ctDNA の変異を高効率に検出できる超高感度な ctDNA 定量法として開発された。本研究では、CAPP-Seq を用いて、膵癌患者の ctDNA 変異解析を行い、治療効果予測可能となる変異の同定を行う。さらに、切除不能膵癌患者の化学療法である gemcitabine (GEM)・nab-paclitaxel (nab-PTX) 併用療法を受ける膵癌症例の ctDNA 変異解析をモニタリングし、治療効果予測ならびに耐性予測に関する変異の同定を行うことを目的とする。

【方法】 切除可能膵癌症例は術前に採血を行い、BR 膵癌は術前治療 (GEM・nab-PTX 併用療法) 前と術前治療後の 2 回に、切除不能膵癌は化学療法 (GEM・nab-PTX 併用療法) 開始前と化学療法開始後 3 ヶ月目、progression disease (PD) になった時点の 3 回で血液を採取する。膵癌患者の血液サンプルから分離した血漿を用いて cell-free DNA を抽出し、CAPP-Seq の遺伝子変異解析に用いる。膵癌患者の cell-free DNA に adaptor を ligation し、PCR にて増幅し、ctDNA Surveillance Panel (197 遺伝子) を用いて、標的領域を hybridization し、DNA 断片を回収する。回収した DNA 断片の配列を NextSeq sequencer でシーケンスし、ctDNA の変異頻度を定量化する。

【結果】 膵癌患者症例 13 例に対して、治療前の血液を採取し、CAPP-Seq を用いて、ctDNA 変異解析を施行した。全ての症例において ctDNA 変異を認め、計 42 種類の標的領域に変異を同定した。13 例中 4 例 (30.8%) の ctDNA において *KRAS* mutation、*TP53* mutation を認めた。切除不能膵癌症例 (UR1) に対して、GEM・nab-PTX の化学療法を施行し、治療前、治療開始後 3 ヶ月、PD になった時点の 3 ポイントで ctDNA 変異をモニタリングした結果、*KRAS* mutation は、治療前 78.6 copy 認めたが、化学療法開始後 3 ヶ月目では検出不能となり、PD になった時点では 94.4 copy に増量した。また *TP53* mutation においても、治療前 52.2 copy 認めたが、化学療法開始後 3 ヶ月目では検出不能となり、PD になった時点では 142 copy に増量した (図)。この結果から、CAPP-Seq による ctDNA 変異をモニタリングすることで、治療の効果判定が可能であることが示唆された。

切除不能膵癌患者の ctDNA 変異解析のモニタリング

