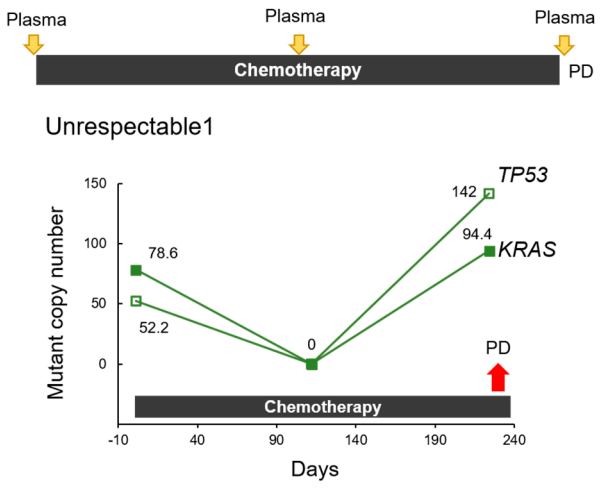
90　CAPP-Seqを用いた膵癌化学療法耐性メカニズムの解明	廣野　誠子

【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与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クエンスし、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与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 でシークエンスし、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 *TP 53* 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



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

和歌山県立医科大学 第２外科

Key words：膵癌，化学療法，cell-free tumor DNA，CAPP-Seq

緒　言

難治癌である膵癌の根治可能な治療法は、外科的切除のみであるが、膵癌患者の 60%は切除不能な状態で診断される。また、外科的切除を施行しても、術後早期に再発・転移を生じ得、膵癌患者の生存期間は他臓器消化器癌と比べ、極めて不良である。膵癌は、画像的診断において、その進行程度により切除可能膵癌、borderline resectable（BR）膵癌、切除不能膵癌に分類され（膵癌取り扱い規約第 7 版）、切除可能膵癌に対しては、外科的切除＋補助化学療法、BR 膵癌に対しては術前化学（放射線）療法後に外科的切除＋補助化学療法、切除不能膵癌に対しては化学療法という治療方針が推奨されている（膵癌診療ガイドライン）。また、切除不能膵癌に対し、gemcitabin（GEM）・nab-paclitaxel（nab-PTX）や FOLFIRINOX といった強い抗腫瘍効果をもつ化学療法が開発された。

われわれは、膵癌患者の生存期間延長を目指し、新規治療薬を開発する目的で、膵癌特異的に発現を認める分子マーカー*KIF20A*、*MUC16*、*mesothelin*、*MUC17* を同定し［1，2］、ペプチドカクテルワクチンを開発した。さらに、*KIF20A*、*VEGFR1*、*VEGFR2* ペプチドカクテルワクチンと S-1 とを併用した術後補助療法により、膵癌患者の再発が制御され、生存期間延長につながることを報告した［3］。また、切除不能膵癌症例であっても、化学療法が著名に奏功した場合、その時点で外科的切除（conversion surgery）を行うことで、生存期間の延長が期待できることを多施設共同研究により証明した［4］。このように、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与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）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クエンスし、cell-free tumor DNA の 4 種類の変異（一塩基多型、挿入欠失、コピー数多型、融合領域）を高効率に検出できる超高感度な cell-free tumor DNA 定量法として開発された［5，6］。さらに、CAPP-Seq を用いて、非小細胞肺癌患者の治療効果の評価、治療薬あるいは放射線治療に対する耐性のメカニズムが解明された［7］。

本研究では、CAPP-Seq を用いて、膵癌患者の cell-free tumor DNA 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、GEM・nab-PTX 併用療法を受ける膵癌症例の cell-free tumor DNA 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与する変異の同定を行うことを目的とする。

方　法

1.　膵癌患者からの血液採取

切除可能膵癌、BR 膵癌、切除不能膵癌患者を対象に、血液を採取した。切除可能膵癌に対しては、術前に採血を行い、BR 膵癌に対しては、術前治療前と術前治療後の 2 回で、切除不能膵癌に対しては、化学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 ポイントで血液を採取した。

2.　血液サンプルから cell-free DNA の抽出

血液サンプルを 1,800 g で 5 分間遠心し、分離した血漿から、AVENIO cfDNA Isolation Kit を用いて cell-free DNA を抽出した。Qubit Assay による cell-free DNA の定量と Agilent Bioanalyzer による cell-free DNA の quality の確認を行い、CAPP-Seq による cell-free tumor DNA 変異解析に使用するまで−80℃の超低温フリーザーに保管した。

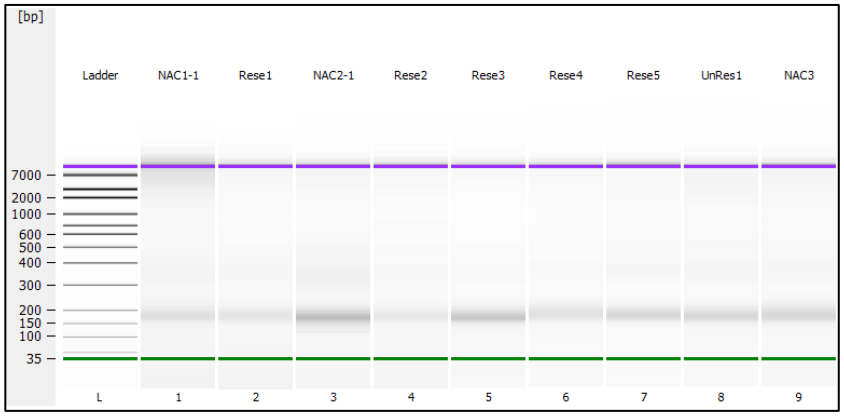


図 1.　Cell-free DNA の抽出

膵癌患者の血液から cell-free DNA の抽出を行い、DNA 量の定量と質の確認を行った。

3.　CAPP-Seq による cell-free tumor DNA の変異頻度の定量化

ctDNA Library Prep Kit を用いて、膵癌患者の cell-free DNA に adaptor を ligation し、PCR にて増幅した。

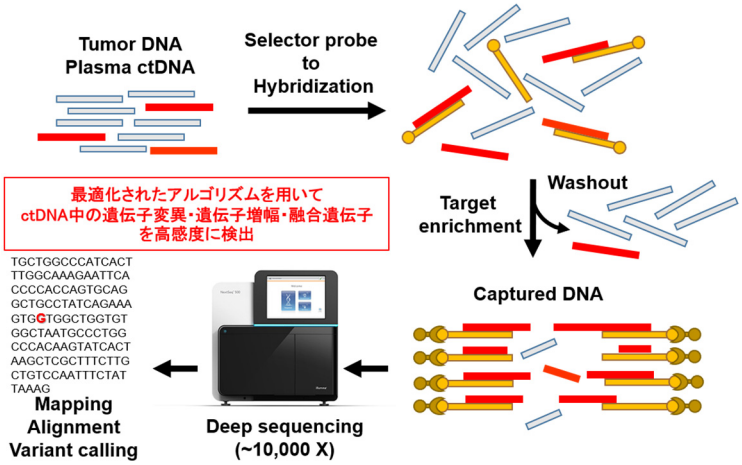


図 2.　CAPP-Seq workflow ctDNA Surveillance Panel にて 197 の標的領域の一塩基多型、挿入欠失、コピー数多型、融合領域の 4 種類の cell-free tumor DNA の変異頻度を定量化した

ctDNA Surveillance Panel（197 遺伝子）を用いて、標的領域を hybridization し、DNA 断片を回収（target enrichment）した。回収した DNA 断片の配列を NextSeq sequencer でシークエンスし、標的領域の一塩基多型、挿入、欠失、コピー数多型、融合領域の 4 種類の cell-free tumor DNA の変異頻度を定量化した。

4. Cell-free tumor DNA の変異解析

治療前の切除可能膵癌、BR 膵癌、切除不能膵癌の cell-free tumor 変異の頻度と変異量を評価した。次に、BR 膵癌、切除不能膵癌に対しては、化学療法（GEM・nab-PTX 併用療法）の前後で、cell-free tumor DNA 変異の量をモニタリングすることにより、治療効果を評価した。

結果および考察

1. CAPP-Seq により同定した膵癌患者の cell-free tumor DNA 変異

膵癌患者症例 13 例（切除可能膵癌 4 例、BR 膵癌 7 例、切除不能膵癌 2 例）に対して、治療前の血液を採取し、CAPP-Seq を用いて、cell-free tumor DNA 変異解析を施行した。全ての症例において cell-free tumor DNA 変異を認め、計 42 種類の標的領域に変異を同定した。変異を認めた遺伝子数は、最も多いサンプルで 6 種類、最も少ないサンプルで 2 種類であった。13 例中 4 例（30.8%）の cell-free tumor DNA において *KRAS* mutation、*TP53* mutation を認め、2 例（15.4%）の cell-free tumor DNA において *ERBB2* mutation、*BRAF* mutation、*GRM5* mutation、*LRRTM4* mutation、*BRCA2* mutation を認めた。

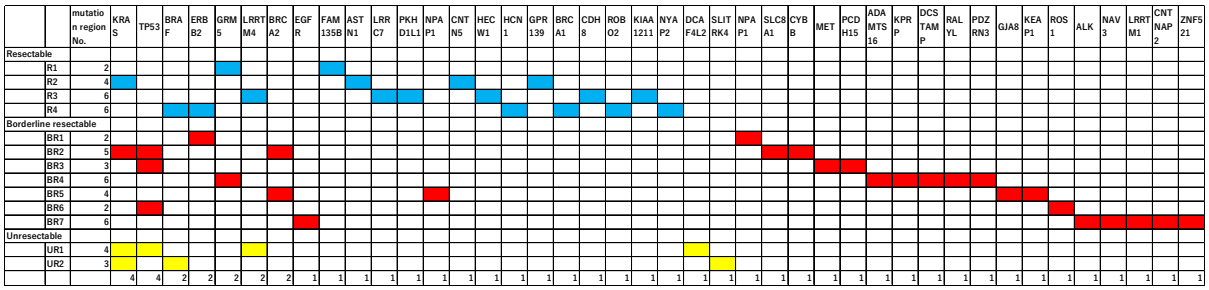


図 3. 膵癌症例の cell-free tumor DNA 変異頻度

全てのサンプルの cell-free tumor DNA において mutation を認め、*KRAS* と *TP53* で最も高頻度に mutation を認めた。

2. 切除不能膵癌症例の化学療法中の cell-free tumor DNA 変異解析のモニタリング

切除不能膵癌症例（UR1）に対して、GEM・nab-PTX 併用療法を施行し、治療前、治療開始後 3 ヶ月目、PD になった時点の 3 ポイントで cell-free tumor DNA 変異をモニタリングした。その結果、*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 94.4 copy に増量した。また *TP53* mutation においても、同様に、治療前には 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 142 copy に増量した。この結果から、CAPP-Seq による cell-free tumor DNA 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。

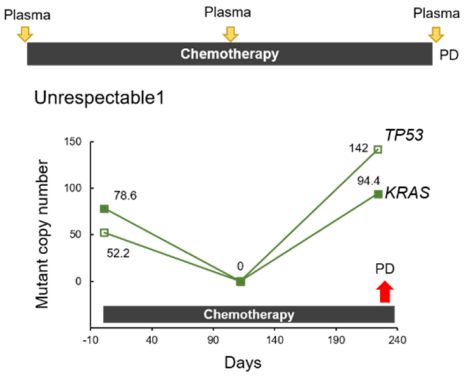


図 4. 切除不能膵癌症例の cell-free tumor DNA 変異量の推移

3. BR 膵癌症例の術前化学療法前後の cell-free tumor DNA 変異解析のモニタリング

BR 膵癌 7 例に対して、術前に GEM・nab-PTX 併用療法を 2 コース施行した。術前治療前と治療後に血液を採取し、CAPP-Seq を用いて、cell-free tumor DNA 変異解析のモニタリングを行った。膵癌に高頻度に変異を認める *KRAS* mutation、*TP53* mutation、*BRAF* mutation を認めた 6 例（BR 2、3、4、5、6、7）を対象に評価した。6 例中 3 例（BR 4、5、7）で、術前化学療法前には認めなかった cell-free tumor DNA 変異が、治療後に検出された。

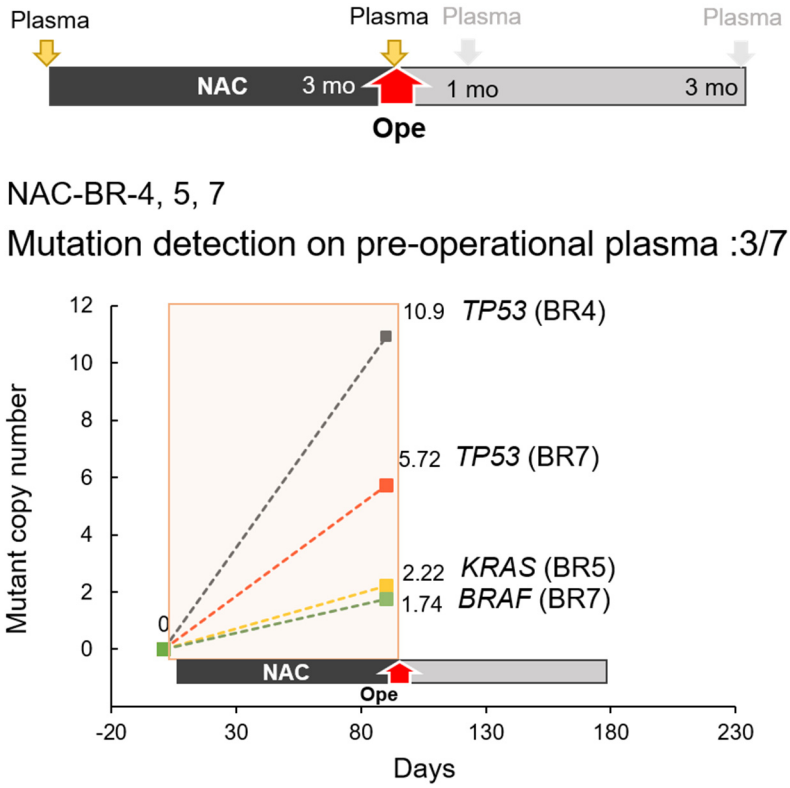


図 5. BR 膵癌症例の術前治療前後の cell-free tumor DNA 変異解析

BR 4、5、7 症例では、cell-free tumor DNA 変異量が術前治療前に比べ、治療後に増加した。

BR 4 では、治療前に検出されなかった *TP53* mutation が治療後に検出され、BR 5 では、治療前に検出されなかった *KRAS* mutation が治療後に検出され、BR 7 では、治療前に検出されなかった *TP53* mutation と *BRAF* mutation が治療後に認めた。臨床データと統合させると、BR 4 では、術前治療施行後、画像上 PD（他臓器浸潤の出現）と判断し、切除不能膵癌として化学療法を継続する方針となり、手術にいたらなかった。BR 5 は、GEM・nab-PTX 併用療法を 2 コース施行後、画像上では stable disease（SD）であったので外科的切除を行った。摘出標本における病理診断において 60%の腫瘍消失を認めたが、術後 3 ヶ月目に肝転移を認めた。BR 7 は、GEM・nab-PTX 併用療法を 2 コース施行後、画像診断において、腫瘍サイズは縮小を認め partial response（PR）と判断し、外科的切除を行った。摘出標本における病理診断では 35%の腫瘍消失を認めたのみであった。

一方、6 例中 3 例（BR 2、3、6）で、術前化学療法前に認めた cell-free tumor DNA 変異量が、治療後に減少した。BR 2 では、治療前に *TP53* mutation を 245 copy 認めたが、治療後には検出されず、BR 3 では、治療前には *TP53* mutation 8.37 copy 認めたが、治療後には 5.16 copy に減少した。BR 6 では、治療前に *TP53* mutation を 397 copy 認めたが、治療後には 12.4 copy まで減少した。臨床データと統合させると、BR 2 では、GEM・nab-PTX 併用療法 2 コース施行後、画像上 SD であったので外科的切除を行った。摘出標本の病理診断において、60%の腫瘍消失を認めた。BR 3 は、GEM・nab-PTX 併用療法 2 コース施行後、画像上 SD で外科的切除を行った。病理診断において、40%の腫瘍消失を認めた。BR 6 は、GEM・nab-PTX 併用療法 2 コース施行後、画像上 SD であったので外科的切除を行った。病理診断においては、50%の腫瘍消失を認めた。

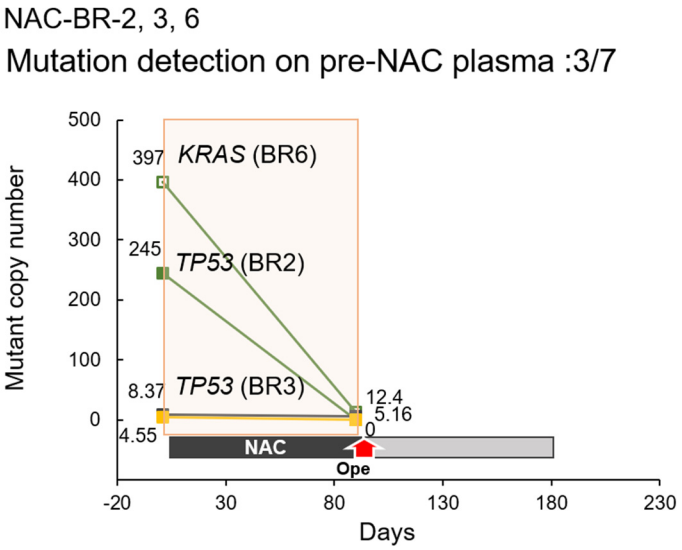


図 6. BR 膵癌症例の術前治療前後の cell-free tumor DNA 変異解析

BR 2、3、6 症例では、術前治療開始前に比べて、治療後の cell-free tumor DNA 変異量が減少した。

4. 考察

今回、CAPP-Seq により膵癌患者の血液サンプルから、cell-free tumor DNA 変異を同定することができた。さらに、GEM・nab-PTX 併用療法による治療の前後で cell-free tumor DNA 変異をモニタリングすることにより、治療効果が予測できることが示唆できた。

切除可能膵癌症例の外科的切除前の cell-free tumor DNA 変異に関しては、切除後の無再発生存期間ならびに全生存期間との相関を検討することで、予後不良となる cell-free tumor DNA 変異の同定と、再発部位との関係について、今後の検討が必要である。

切除不能膵癌症例に対する、化学療法中の cell-free tumor DNA 変異モニタリングに関しては、さらなるサンプル数を増やし、GEM・nab-PTX 併用療法耐性の原因となる cell-free tumor DNA 変異を同定する予定である。また、治療前の cell-free tumor DNA 変異が、無増悪生存期間や全生存期間に寄与するのかの検討も必要で、今後の課題とする。さらに、GEM・nab-PTX 併用療法が不応・不耐になった時点で、別の化学療法である FOLFIRINOX や S-1 に変更されるが、これらの効果予測ならびに耐性メカニズムに関しても、今後 CAPP-Seq を用いた cell-free tumor DNA 変異解析のモニタリングにより解明していく。

BR 膵癌に対しては、さらなるフォローアップ期間を延長し、術前治療前・術前治療後・手術後それぞれの時点での cell-free tumor DNA 変異と無再発生存期間ならびに全生存期間との相関を検討し、どの時点の cell-free tumor DNA 変異が予後と最も相関するかを同定する。また、術前治療前・術前治療後・手術後で cell-free tumor DNA 変異をモニタリングすることで、再発リスクとなる cell-free tumor DNA 変異の同定を行う。

今後は、さらなる症例数の増加、観察期間の延長を行い、本研究を完遂する予定である。本研究の成果は、膵癌患者の生存期間延長に大いに貢献できると考える。

文 献

1) Hirono S, Yamaue H, Hoshikawa Y, Ina S, Tani M, Kawai M, Ushijima M, Matsuura M, Saiki Y, Saiura A, Yamamoto J, Miki Y, Noda T. Molecular makers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling. Cancer Sci. 2010 Jan;101 (1):259-66. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01359.x.

2) Shimizu A, Hirono S, Tani M, Kawai M, Okada K, Miyzawa M, Kitahata Y, Nakamura Y, Noda T, Yokoyama S, Yamaue H. Coexpression of MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Sci. 2012 Apr;103 (4):739-46. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02214.x.

3) Miyazawa M, Katsuda M, Maguchi H, Katanuma A, Ishii H, Ozaka M, Yamao K, Imaoka H, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Yamaue H. Phase II clinical trial using novel peptide cocktail vaccine as a postoperative adjuvant treatment for surgically resected pancreatic cancer patients. Int J Cancer. 2017 Feb 15;140 (4):973-982. doi: 10.1002/ijc.30510.

4) Satoi S, Yamaue H, Kato K, Takahashi S, Hirono S, Takeda S, Eguchi H, Sho M, Wada K, Shinchi H, Kwon AH, Hirano S, Kinoshita T, Nakao A, Nagano H, Nakajima Y, Sano K, Miyazaki M, Takada T. Role of adjuvant surgery for patients with initially unresectable pancreatic cancer with a long-term favorable response to non-surgical anti-cancer treatments: results of a project study for pancreatic surgery by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2013 Aug;20 (6):590-600. doi: 10.1007/s00534-013-0616-0.

5) Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE, Shrager JB, Loo BW Jr, Alizadeh AA, Diehn M. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. Nat Med. 2014 May;20 (5):548-54. doi: 10.1038/nm.3519.

6) Bratman SV, Newman AM, Alizadeh AA, Diehn M. Potential clinical utility of ultrasensitive circulating tumor DNA detection with CAPP-Seq. Expert Rev Mol Diagn. 2015 Jun;15 (6):715-9. doi: 10.1586/14737159.2015.1019476.

7) Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, Kurtz DM, Stehr H, Scherer F, Karlovich CA, Harding TC, Durkin KA, Otterson GA, Thomas Purcell W, Ross Camidge D, Goldman JW, Sequist LV, Piotrowska Z, Wakelee HA, Neal JW, Alizadeh AA, Diehn M. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. Nat Commun. 2016 Nov 14;7:13513. doi: 10.1038/ncomms13513.