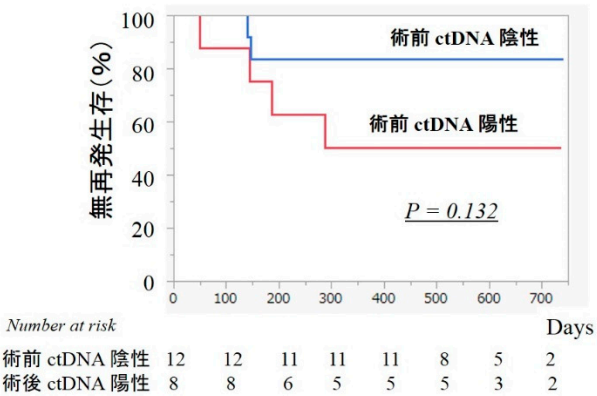
175　早期肺癌治療へのliquid biopsyの応用	須田　健一

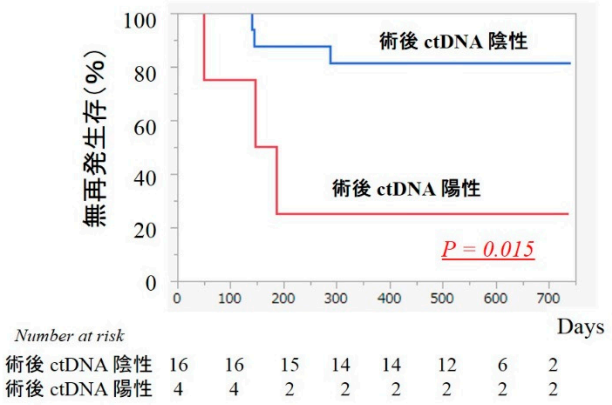
【目的】がん患者の血漿中には腫瘍由来の可溶性 DNA（ctDNA）が含まれており、ctDNA を用いた分子診断（liquid biopsy）は、比較的低侵襲ながん遺伝子検査法として注目されている。進行・再発肺がんでは、ctDNA を用いた liquid biopsy は、治療効果の予測（バイオマーカー）や治療効果の早期判定、薬剤耐性出現の予測などに有用であることが数多く報告されている。一方、外科切除の対象となるような早期肺がんにおいては、ctDNA の総量が比較的少ないことより、ctDNA の検出感度が飛躍的に向上した近年、ようやく解析が可能となった。今回我々は、外科切除を予定している早期肺がん患者において、術前・術後に liquid biopsy を用いて ctDNA を検出することで、術後再発リスクの高い患者を同定することが可能であると仮定して本研究をおこなった。

【方法】当科にて根治的切除をおこなった臨床病期ⅡA～ⅢA 期肺がん患者計 20 名について、検討をおこなった。切除検体（がん部）、術前血漿サンプル（術前 2 日前～手術当日）、および術後血漿サンプル（手術後 3～12 日目）を採取・保存した。切除検体（がん部）の遺伝子異常は Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel（CCP パネル）を用いて解析し、血漿サンプルの遺伝子異常は Cancer personalized profiling by deep sequencing（CAPP-Seq）法を用いて解析した。

【結果】術前の liquid biopsy では 8 名（40%）に ctDNA が検出され、術後（3～12 日）の liquid biopsy では 4 名（20%）に ctDNA が検出された。術後の ctDNA 陽性患者 4 名のうち 3 名は術前の ctDNA も陽性であったが、残りの 1 名は術後に ctDNA が陽性化した。切除検体（がん部）で検出された遺伝子異常の多くが、liquid biopsy でも検出された。術前の ctDNA 陽性は腫瘍径（5.0 cm 以上）と関連しており（p＝0.018）、術後の ctDNA 陽性は組織学的分化度（grade 3）と関連していた（p＝0.032）。術後に ctDNA が検出された患者では無再発生存期間が有意に短く（下図右、p＝0.015）、術前の ctDNA 陽性（下図左、p＝0.132）や術後の CEA 高値（p＝0.533）よりも有用な術後再発予測因子であると考えられた。

術前または術後 ctDNA 陽性と無再発生存の関連





175. 早期肺癌治療への liquid biopsy の応用

須田　健一

近畿大学 医学部 外科学講座 呼吸器外科部門

Key words：肺がん，外科治療，術後再発予測，ctDNA，パネル検査

緒　言

がん患者の血漿中には腫瘍由来の可溶性 DNA（ctDNA）が含まれており、ctDNA を用いた分子診断（liquid biopsy）は、進行・再発肺がん治療において、*EGFR* 遺伝子変異を検出する liquid biopsy 検査として既に本邦でも臨床応用されている。また進行・再発肺がんにおいては、*EGFR* 遺伝子変異以外のさまざまな遺伝子異常も ctDNA を用いて検出可能であること、ctDNA を用いた liquid biopsy は、治療効果の早期判定や薬剤耐性出現の予測などに有用であることも報告されている［1］。一方、外科切除の対象となるような早期肺がんにおいては、ctDNA の総量が比較的少ないことより、liquid biopsy を用いた遺伝子変異解析は難しいと考えられてきた。しかし近年、ctDNA の検出感度が飛躍的に高くなり、早期肺がんにおいても ctDNA の検出が可能となりつつある［2〜4］。

肺がんは、早期で発見され標準治療である外科切除がおこなわれたとしても、再発率の高いがんのひとつである。早期肺がん（I〜IIIA 期）の治療成績向上のため、定期的な手術後のフォローに加え、術前補助化学療法や術後補助化学療法が実臨床でおこなわれているが、その治療成績は十分とは言えない。このため、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤などの新規薬剤を用いた臨床試験も多数進行中である。しかし、早期肺がん患者の予後改善のためには、これらの集学的治療法の発展に加え、適切な患者に適切な治療をおこなう precision medicine の適応も不可欠と考えられる［5］。

今回我々は、外科切除を予定している早期肺がん患者において、術前・術後に liquid biopsy を用いて ctDNA を検出することで、再発リスクの高い患者を同定することが可能であると仮定して本研究をおこなった。計 20 名の患者について検討をおこなったところ、術前の liquid biopsy では 8 名（40%）で ctDNA が検出され、術後（3〜12 日）の liquid biopsy では 4 名（20%）で ctDNA が検出された。術後に ctDNA が検出された患者では無再発生存期間が有意に短く（p＝0.015）、術前の ctDNA 陽性（p＝0.132）や術後の CEA 高値（p＝0.533）よりも有用な再発予測因子であると考えられた。

方　法

1.　患者および検体

2018 年 1 月〜2019 年 5 月に完全切除が施行された臨床病期ⅡA〜IIIA 期肺がん患者 20 名を本研究に登録した。手術検体（がん部）、術前血漿サンプル（術前 2 日前〜手術当日）、および術後血漿サンプル（手術後 3〜12 日目）を採取・保存した。術後の血漿サンプル採取の時期としては、術後 3 日〜1 ヶ月での採血が術後のベースラインとして妥当であることが報告されており［4］、本研究での術後採血もその範疇であった。これらの採血は、術前検査のための採血や手術後の臨床上必要とされる定期採血とともに採取した。採血はセルフリーDNA 抽出用採血管を用いておこない、遠心分離ののち血漿のみを抽出し、解析まで−80℃で保管した。

本研究は、研究課題「Next-generation sequencing（NGS）を用いた血漿中の癌関連遺伝子変異の解析：外科切除症例における再発予測因子としての意義」として、近畿大学医学部の倫理委員会の承認を得て実施した。

2. 切除検体の遺伝子異常解析

切除検体の遺伝子異常の解析は、切除検体のがん部より gDNA を抽出したのち、409 個のがん関連遺伝子の変異を検出可能な Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel（CCP パネル）（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA）を用いておこなった。

3. Liquid biopsy 検体を用いた ctDNA 検出

血漿中の可溶性 DNA（cell free DNA、cfDNA）は、AVENIO ctDNA isolation kit（Roche Diagnostics、Mannheim、Germany）を用いて抽出した。197 個のがん関連遺伝子の変異を検出可能な cancer personalized profiling by deep sequencing（CAPP-Seq）法（Roche Diagnostics）を用いて cfDNA を解析し、ctDNA を検出した。得られた SNV（single nucleotide variant）のうち、COSMIC（Catalogue of Somatic Mutations in Cancer）データベースにて肺がんで報告のあるものについて、ctDNA と定義した。

4. 統計学的検討

ctDNA 陽性と関連のある臨床病理学的因子の検討は、Fisher の正確確率検定を用いておこなった。無再発生存期間の比較は、Kaplan-Meier 法を用いておこない、log rank 法にて両群間の差異を統計学的に検定した。

結果および考察

1. がん部の遺伝子異常と ctDNA の関連

術前または術後に ctDNA が検出されたのは 9 例（術前のみ検出：5 例、術前・術後ともに検出：3 例、術後のみ検出：1 例）であった。検出された遺伝子変異の詳細を表 1 にまとめた。がん部で検出された遺伝子変異の多く（全ての *TP53* 変異およびひとつの *KRAS*G12C 変異など）が liquid biopsy でも検出可能であったが、ctDNA の一部はがん部では検出されず、腫瘍内 heterogeneity がその原因と考えられた。

表 1. 主腫瘍の遺伝子変異および検出された ctDNA のまとめ

患者番号	がん部の遺伝子変異	術前ctDNA	術後ctDNA
1	TP53 (Y234C) TP53 (V157F) PIK3CA(E545K) NF1(Q1235Ter)	TP53(Y234C) TP53(V157F)	TP53(Y234C) TP53(H193R)
7	CEBPA(P196fs)	検出されず	PDGFRA(V193I)
8	NFE2L2(R34Q) NFE2L2(G31_V32delinsAL)	NFE2L2(D29G)	検出されず
10	検出されず	TP53(C238P)	検出されず
11	TP53(C238P) PALB2(G514Ter) ARIDIA(E778Ter) ARIDIA(E1776Ter)	TP53(C238P)	検出されず
12	KRAS(G12C)	KRAS(G12C)	検出されず
14	TP53(G105V) WT1(Q332Ter)	TP53(G105V)	検出されず
16	検体なし	HCN1(G824R)	HCN1(G824R)
20	TP53(splice site mutation) NF1(Q684Ter)	TP53(splice site mutation)	LRRTM4(Y349N)

がん部で検出された遺伝子異常と、liquid biopsyで検出されたctDNAを患者毎にまとめた。

両者は解析方法が異なり、*HCN1*および*LRRTM4* はがん部の検査ではカバーされていない。

2. ctDNA 陽性と関連する臨床病理学的因子の探索

術前および術後の ctDNA 陽性と関連する臨床病理学的因子について、Fisher の正確確率検定を用いて探索し、術前の ctDNA 陽性は腫瘍径 5.0 cm 以上 と関連しており（p＝0.018）、術後の ctDNA 陽性は組織学的分化度 grade 3 と関連していることを同定した（p＝0.032）。術前 ctDNA 陽性と腫瘍径との関連は、複数の既報でも報告されており［4，6］、同様の結果であった。

3. ctDNA 陽性の術後再発予測因子としての役割（図１）

術前および術後の ctDNA 陽性の再発予測因子としての役割を Kaplan-Meier 法を用いて検討したところ、術後の ctDNA 陽性が有意な予後不良因子であった（p＝0.015）。一方、術前 ctDNA 陽性群は予後不良な傾向を示したが（p＝0.132）、上述の通り術前 ctDNA 陽性は、術前の進行度（病期）とより関連したものと考えられた。このため、術後の ctDNA 陽性が、再発予測因子としてより有用であると考えられた。既報では、肺がんで頻度の高い少数のがん関連遺伝子に絞って限って解析したものが多いが［4，7］、本研究で用いたような、解析遺伝子数の多いパネルでしか検出されない ctDNA（*PDGFRA* や *HCN1*、*LRRTM4* など）も、予後予測に有用である可能性が示された。また再発予測因子として腫瘍マーカーのひとつである CEA 値についても検討したが、術前 CEA（p＝0.339）および術後 CEA（p＝0.533）ともに有意な予後予測因子とはならなかった。

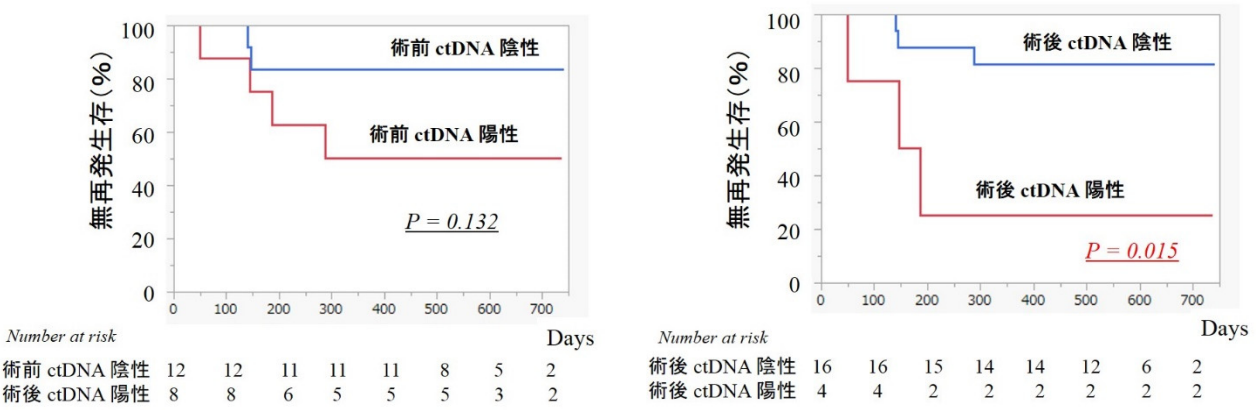


図 1. 術前または術後 ctDNA 陽性と無再発生存の関連
左）術前 ctDNA と無再発生存（log rank 法、p＝0.132）
右）術後 ctDNA と無再発生存（log rank 法、p＝0.015）

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、近畿大学医学部外科学教室呼吸器外科部門の小原秀太助教、光冨徹哉教授、近畿大学医学部ゲノム生物学教室の坂井和子講師、西尾和人教授である。

文　献

1） Chaudhuri AA, Chabon JJ, Lovejoy AF, Newman AM, Stehr H, Azad TD, et al. Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. Cancer Discov. 2017 Dec;7(12):1394-403. PMID: 28899864. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0716.

2） Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. Nature. 2017 Apr 26;545(7655):446-51. PMID: 28445469. DOI: 10.1038/nature22364.

3) Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. Sci Transl Med. 2017 Aug 16;9(403). PMID: 28814544. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan2415
4) Chen K, Zhao H, Shi Y, Yang F, Wang LT, Kang G, et al. Perioperative Dynamic Changes in Circulating Tumor DNA in Patients with Lung Cancer (DYNAMIC). Clin Cancer Res. 2019 Dec 1;25(23):7058-67. PMID: 31439586. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-121.
5) [Suda K. Personalized post-surgical care? - Possible strategies for NSCLCs with EGFR mutation. Transl Lung Cancer Res. 2020: PMID: not assigned yet. DOI: 10.21037/tlcr.2020.03.32 (in press).
6) Ohira T, Sakai K, Matsubayashi J, Kajiwara N, Kakihana M, Hagiwara M, et al. Tumor volume determines the feasibility of cell-free DNA sequencing for mutation detection in non-small cell lung cancer. Cancer Sci. 2016 Nov;107(11):1660-6. PMID: 27575703. DOI: 10.1111/cas.13068.
7) Hu W, Yang Y, Zhang L, Yin J, Huang J, Huang L, et al. Post surgery circulating free tumor DNA is a predictive biomarker for relapse of lung cancer. Cancer Med. 2017 May;6(5):962-74. PMID: 28382702. DOI: 10.1002/cam4.980.