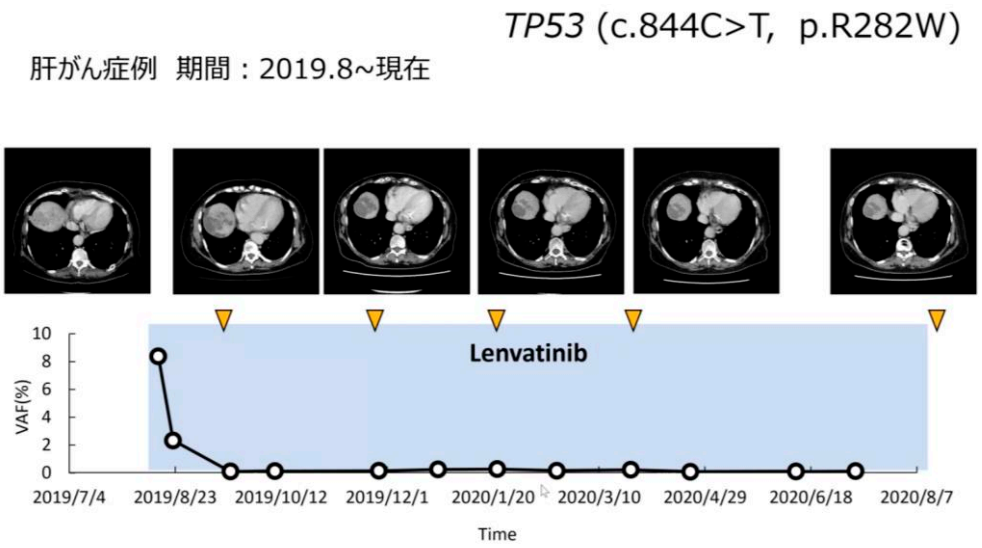
181　肝細胞癌個別バイオマーカーとしてのctDNAの臨床応用	鈴木　悠地

【目的】原発腫瘍組織のパネルシークエンスから同定した遺伝子変異を対象に、腫瘍由来血中循環 DNA（circulating tumor DNA、以下 ctDNA）の変異アリル頻度（腫瘍由来 DNA の血中全 DNA に対する比率、variant allele frequency : VAF）を計測すると、1. 化学療法に連動して VAF が変化する、2. 治療後 VAF の変化量により予後の層別化ができる、3. 画像で確認される再発に先行して VAF が上昇する、ということが示唆されている。ctDNA は、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤を投与する切除不能進行肝細胞癌においても、1. 治療効果や予後予測に活用できる可能性、2. 画像検査よりも早期に増悪や再発を捉える可能性がある。しかしながら、切除不能進行肝細胞癌は出血や播種リスクを理由として原発腫瘍組織の採取が避けられてきた。したがって、切除不能進行肝細胞癌に対する ctDNA の臨床的有用性を検証するためには、生検リスクを回避した代替手段による評価が求められていた。本研究は、治療前の ctDNA を対象に次世代シーケンサー解析（NGS）を行い、追跡すべき遺伝子変異を同定する。同定した遺伝子変異について、超高感度デジタル PCR（dPCR）で追跡することで、切除不能肝細胞癌患者に対する ctDNA による治療効果予測や体内腫瘍量モニタリングを行うことの臨床的有用性を検証することを目的とした。

【方法】分子標的薬の開始前および治療開始後の定期受診時に通常採血と同時に ctDNA 抽出用の血液 10 cc を採取した。キアゲン社の QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて、0.5〜1 ng/μL の最終溶液でトータル 15 ng 以上（溶媒は ddH_2O またはキアゲン社の Elution Buffer を用いる）に調製した。ctDNA のパネルシークエンス解析は、委託アッセイ契約を締結した企業および国内共同研究契約を締結した研究期間で実施した。パネルシークエンスで同定した遺伝子変異について、0.01%の VAF でも安定した測定が可能な超高感度 PCR 機器、digital PCR で測定した。

【結果】切除不能肝細胞癌症例 9 例について、ctDNA を対象としたパネルシークエンスを実施した。その結果、9 例中 8 例（88.9%）について digital PCR での追跡対象となる遺伝子変異を同定した。8 例中 3 例について、digital PCR による治療経過中の経時的な ctDNA の追跡を行い、CT 検査などの臨床情報と対比した。その結果、追跡対象とした遺伝子変異について digital PCR による経時的な追跡が可能であることを確認した。特に、治療奏功が得られた症例では、ctDNA が鋭敏に低下し、その後 ctDNA は持続的に陰性化することが明らかとなった。

切除不能肝細胞癌に対する分子標的薬治療で画像上奏功が得られた症例についての ctDNA モニタリングの 1 例



181. 肝細胞癌個別バイオマーカーとしての ctDNA の臨床応用

鈴木　悠地

岩手医科大学 医学部 内科学講座 消化器内科肝臓分野

Key words：切除不能肝細胞癌，腫瘍由来血中循環 DNA（ctDNA），再発診断，予後

緒　言

腫瘍細胞から血中に遊離した DNA 断片である Circulating tumor DNA（ctDNA）は、症例特異的バイオマーカーとして期待されている。最近我々は、食道癌を対象に、原発腫瘍組織で同定した遺伝子変異を ctDNA で追跡することで、食道癌治療経過中の治療効果判定、無再発状態の確定に有効であるという ctDNA の臨床的有用性（clinical utility）を世界に先駆けて示した［1］。追跡対象とする ctDNA を同定するためには、治療対象とする原発組織の生検材料を対象としたシークエンス解析が必須であった。根治的な切除等が適応外となる進行肝細胞癌に対しては、分子標的治療薬により患者の生命予後延長を目指す。そのため、分子標的薬を導入する切除不能進行肝細胞癌においても、症例特異的バイオマーカーとしての ctDNA の活用が期待される。しかしながら、切除不能進行肝細胞癌に対する原発腫瘍組織の生検は、腫瘍播種や腹腔内出血のリスクを理由として避けられているのが現状である。そのため、治療対象腫瘍の遺伝子変異を根拠とする ctDNA を用いた体内腫瘍量の評価や予後層別化等の臨床的有用性の検証を行うためには、患者リスクを回避した代替手段による予備的評価が求められていた。そこで、末梢血中の ctDNA を対象とした次世代シーケンサー（NGS）解析により追跡すべき遺伝子変異を特定することで、治療前の原発腫瘍組織の生検が避けられてきた切除不能肝細胞癌について、ctDNA による体細胞変異の継時的変化を digital PCR（dPCR）で定量することが可能であると着想にいたった。本研究では、治療前の ctDNA を対象とした NGS 解析によって得られる情報をもとに、切除不能肝細胞癌患者に対する ctDNA による体内腫瘍量モニタリング、予後層別化を行うことの臨床的有用性を検証することを目的とした。

方　法

分子標的薬の開始前および治療開始後の定期受診時に通常採血と同時に ctDNA 抽出用の血液 10 cc を採取した。採血には PBMC および ctDNA の数日間の常温保存が可能な Streck 社の専用採血管を用い、末梢血単核球（PBMC）単離は Streck 社採血管により採取した全血からベクトンディッキンソン社 CPT 採血管を用いた遠藤らの方法を用いた。血漿と末梢血単核球の層を分離し別々に－80℃での凍結保存を行った。血漿 DNA は ctDNA 測定に用い、PBMC は生殖細胞系列の DNA 多型を確認するために使用した。キアゲン社の QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて、0.5～1 ng/μL の最終溶液でトータル 15 ng 以上（溶媒は ddH_2O またはキアゲン社の Elution Buffer を用いた）に調製した。ctDNA のパネルシークエンス解析は、委託アッセイ契約を締結した企業および国内共同研究契約を締結した研究期間で実施した。パネルシークエンスで同定した遺伝子変異について、0.01%の VAF でも安定した測定が可能な超高感度 PCR 機器、digital PCR で測定した。

結果および考察

切除不能肝細胞癌症例 8 例について、ctDNA を対象としたパネルシークエンスを実施した。その結果、9 例中 8 例（88.9%）について digital PCR での追跡対象となる遺伝子変異を同定した（表 1）。

表 1. 各症例の ctDNA のパネルシークエンスの結果同定された遺伝子変異のまとめ

患者番号	検出された遺伝子変異	変異アリル頻度(%)
1	TP53 (610T>C)	1.0%
2	TP53 (844C>T)	6.4%
3	PIK3CA(317G>T)	1.7%
	CDKN2A(247C>T)	0.7%
	ERBB2(863G>A)	0.3%
4	ERBB2(3654C>A)	5.5%
	TP53 (581T>G)	2.8%
5	TP53 (145G>C)	54.1%
6	PIK3CA (3140A>G)	4.6%
	SMARCA4 (4090_4092del)	1.2%
	MET (2835_2837del)	
7	MET(2835_2837del)	8.0%
	CTNNB1	5.1%
8	検出されず	
9	STK11(1151G>A)	20.7%
	TP53(871A>T)	15.1%

8 例中 3 例について、digital PCR による治療経過中の経時的な ctDNA の追跡を行ない、CT 検査などの臨床情報と対比した。その結果、追跡対象とした遺伝子変異について digital PCR による経時的な追跡が可能であることを確認した。特に、治療奏功が得られた症例では、ctDNA が鋭敏に低下し、その後 ctDNA は持続的に陰性化することが明らかとなった（図 1）。

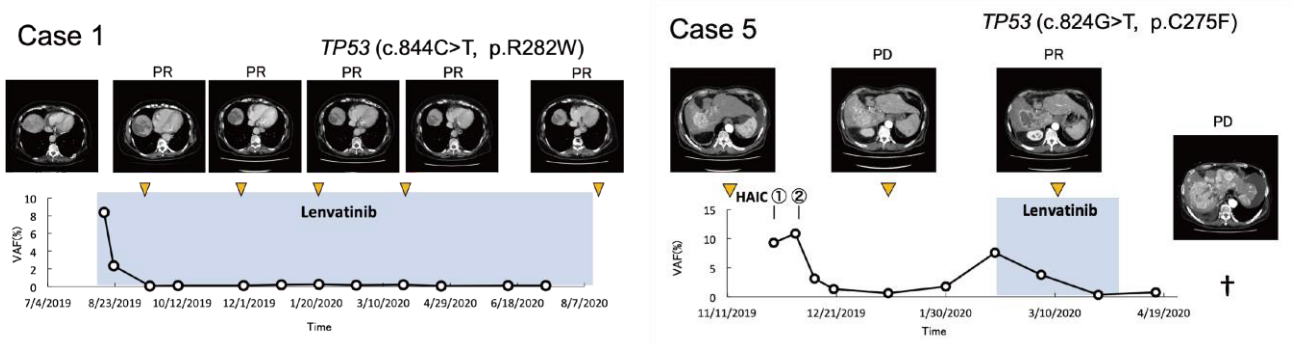


図 1. 切除不能肝細胞癌治療経過中の ctDNA 中の変異アリル頻度の推移

Case 1）全身化学療法後に CT 検査で治療奏効が得られた症例では、治療経過中の ctDNA が検出感度未満で推移していた。

Case 5）全身化学療法後に腫瘍が再発した症例では、ctDNA は持続陽性であり観察期間中に死亡した。

腫瘍から血中に遊離した DNA 断片である ctDNA を用いたがん診断への期待が高まっている。一方、普及が最も進んでいる米国でも、臨床的実用性についての判断は極めて慎重である。米国臨床腫瘍学会および米国病理学会のエキスパートレヴューでは、2018 年 6 月時点で、ctDNA を用いたがん診断において clinical validity（臨床腫瘍学的有用性）と clinical utility（臨床的社会的有用性）の面で確定した根拠はなく、更なる研究開発と臨床ガイダンスが必要であるとしている［2］。ctDNA のがん診断の用途として、ctDNA を個別化腫瘍マーカーとして利用した分子標的薬の選択や

体内腫瘍量の評価がある。これまで我々は、NGS 解析により原発腫瘍で確認された遺伝子変異を ctDNA として dPCR で追跡することで、体内腫瘍量を評価する系を構築してきた［1, 3, 4］。追跡対象とする ctDNA を同定するためには、原発組織の生検材料を対象としたシークエンス解析が必須と考えられていた。消化管癌や呼吸器癌は内視鏡検査などによる原発組織へのアプローチが比較的容易であり、我々が構築した系を再現しやすい癌腫である。一方、切除不能進行肝細胞癌に対する原発腫瘍組織の生検は、腫瘍播種や腹腔内出血のリスクから避けられている。そのため、進行肝細胞癌に対する腫瘍の遺伝子変異を根拠とする分子標的薬の選択や ctDNA を用いた体内腫瘍量のモニタリングの臨床的有用性の検証を行うためには、患者リスクを回避した代替手段による予備的評価が求められていた。本研究の結果、切除不能肝細胞癌のような体内腫瘍量が比較的多い腫瘍については、ctDNA を対象とする NGS 解析により追跡対象とする遺伝子変異を同定できること、NGS で同定した遺伝子変異について dPCR で追跡することが可能であることを確認できた。ctDNA の変化量などの情報により患者予後が推定できるかなど、臨床的有用性の検証のためにはさらなる追加解析が必要である。今後、本研究を発展させ、死後病理解剖で得られる原発腫瘍組織の遺伝情報と生前治療経過中の ctDNA の情報を統合することで、肝細胞癌治療経過中の薬剤抵抗性獲得機序や腫瘍の生物学的進化について評価していく。

本研究により、これまで合併症リスクを理由に検証が困難であった肝細胞癌に対して、原発腫瘍組織の遺伝情報を基とした治療効果予測および体内腫瘍量評価による個別化治療の実現に向けた基礎的資料が得られたといえる。今後、個々の症例の遺伝子変異をマーカーとして、免疫チェックポイント阻害剤および分子標的薬による治療効果を予測するシステムの確立や、ctDNA の情報をもとにした薬剤選択による肝細胞癌治療の予後改善に向けた介入研究などの実施が求められる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岩手医科大学医学部内科学講座消化器内科肝臓分野の黒田英克、滝川康裕、岩手医科大学医歯薬総合研究所医療開発研究部門の西塚哲、開勇人、佐々木教之である。本研究の遂行にあたり、共同研究者の諸先生方には多くのご助言をいただいた。ここに深い感謝の意を表する。

文　献

1) Iwaya T et al. Frequent Tumor Burden Monitoring of Esophageal Squamous Cell Carcinoma With Circulating Tumor DNA Using Individually Designed Digital Polymerase Chain Reaction. Gastroenterology. 2021;160:463-465
2) Merker J et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. J Clin Oncol. 2018;36:1631-1641
3) Sato KA et al. Individualized Mutation Detection in Circulating Tumor DNA for Monitoring Colorectal Tumor Burden Using a Cancer-Associated Gene Sequencing Panel. PLoS One. 2016;11:e0146275
4) Sasaki N et al. Analysis of mutational and proteomic heterogeneity of gastric cancer suggests an effective pipeline to monitor post-treatment tumor burden using circulating tumor DNA. PLoS One. 2020;15:e0239966