56　肺癌の遺伝子多様性の解析と分子モニタリングの確立	杉尾　賢二

【目的】原発性肺癌は局所進行肺癌であるⅡ～Ⅲ期では完全切除が行われても再発率は約 50%、5 年生存率も 40～60% と未だ不十分な成績であり、薬物治療を主とする集学的治療が必須である。癌細胞の遺伝子変化は、初期においては単一の変化 (clone) であり、増殖・進展とともに種々の遺伝子変異が加わり遺伝子多様性が増すことになる。本研究では、手術時の標本から早期変異主体の癌細胞と進展変異を有する癌細胞という空間的多様性を検討した。手術後の定期的な血液や再発時腫瘍組織の MRD（minimal residual disease）を検出することは再発早期発見や治療開始に極めて重要であり、遺伝子学的分子モニタリング（molecular monitoring）としての確立にも繋がる。

【方法】病理病期Ⅱ～Ⅲ期の非小細胞肺癌患者の手術摘出検体の原発腫瘍から核酸を抽出し、オンコマイン Dx Target Test 等による網羅的遺伝子解析で遺伝子多様性（空間的多様性）の解析を行い、clone、subclone を同定した。病理病期Ⅱ～Ⅲ期の肺腺癌 4 例について、術後経過観察中の定期的に採血された血漿から cfDNA を調製し、次世代シーケンサー（NGS）による遺伝子解析を施行した。同一症例の原発巣と術後血漿の遺伝子変異の相違点（時間的多様性）を解析した。これらの結果から遺伝子学的分子モニタリング（molecular monitoring）の確立を試みた。

【結果】術後再発を認めた 2 症例に腫瘍由来と考えられる新たな遺伝子変異を認めた。また、再発を認めなかった 2 症例でも、PTEN や MAP2K1 の変異を認め、これらの変異は腫瘍由来である可能性がある。1 症例において、脈絡膜再発後の血漿では手術検体と同じ EGFR 変異が検出されており、眼球摘出した手術検体からも同じ EGFR 変異が検出された。眼球摘出後の血漿では、EGFR 変異は検出されず、再発部の手術により腫瘍由来の ctDNA が消失した可能性が示唆され、分子モニタリングを提示した症例となった。他の症例においては、モニタリングした血漿から腫瘍由来と考えられる同一の変異は検出されず、分子モニタリングは確立できず今後の検討を要する。

切除標本とモニタリング血漿の遺伝子変異

Case	Stage	Recurrence	Primary tumor	Plasma	
				preop (eye)	postop (eye)
No. 4	IVA	+	EGFR L858R	EGFR L858R	−
					BRCA2
					FGFR2
					PDGFRA
					STK11
					TP53

56. 肺癌の遺伝子多様性の解析と分子モニタリングの確立

杉尾　賢二

大分大学 医学部 呼吸器・乳腺外科学講座

Key words：非小細胞肺癌，次世代シークエンサー，時間的多様性，進化系統樹，ctDNA

緒　言

原発性肺癌は局所進行肺癌であるⅡ～Ⅲ期では完全切除が行われても再発率は約 50%あり、5 年生存率も 40～60%と未だ不十分な成績である。手術に加えて薬物治療を必要とする集学的治療が必須であり、正確な適応基準の解明は重要な課題である。腫瘍内の細胞環境や相互作用は、各々の治療効果に大きく関わっている。非小細胞肺癌においては、他癌腫に比較して癌細胞における遺伝子変異量（tumor mutation burden：TMB）が多いことが知られているが、癌細胞の遺伝子変化は、初期においては単一の変化（clone）であり、増殖・進展とともに種々の遺伝子変異が加わり遺伝子多様性（intratumor heterogeneity）が増すことになる［1］。よって、腫瘍内遺伝子多様性（intratumor heterogeneity）は治療の感受性や耐性を規定する重要な因子であり、近年の次世代シーケンサー（NGS）の開発により、その解析が可能となり臨床に導入されるに至った［2］。また、ctDNA の少なさより血液検体での遺伝子解析が困難と考えられた早期肺癌においても、検出感度の上昇により ctDNA の検出が可能となってきている。本研究では、手術時の標本から早期変異（clonal）主体の癌細胞と進展変異（subclonal）を有する癌細胞という空間的多様性を検討した。これで得られたサブクローンの genotype は微小残存病変（minimal residual disease：MRD）の指標となる。手術後の定期的な血液や再発時腫瘍組織の MRD を検出することは再発早期発見や治療開始に極めて重要であり、遺伝子学的分子モニタリング（molecular monitoring）としての確立にも繋がる。本研究の成果により、正確な手術を含めた治療基準の設定、集学的治療、術後補助療法の適応、種々の治療の選択、臨床上再発前の早期治療開始などに結び付くことができる重要な研究課題である。

方　法

1. 腫瘍内遺伝子多様性（intratumor heterogeneity）の解析

術後再発率の高いリンパ節転移を伴う病理病期Ⅱ～Ⅲ期の非小細胞肺癌患者の手術摘出検体の原発腫瘍、リンパ節転移部位を対象に、各々の試料から核酸を抽出し、オンコマイン Dx Target Test 等による網羅的遺伝子解析で遺伝子多様性（空間的多様性）の解析を行い、クローン、サブクローンを同定した。

2. 血漿中のcfDNA解析（liquid biopsy）によるmolecular monitoring

病理病期Ⅱ～Ⅲ期の非小細胞肺癌患者（腺癌）5 名について、術後経過観察中の定期的に採血された血漿から cfDNA を調製し、次世代シーケンサー（NGS）による遺伝子解析を施行した。同一症例の原発巣と術後血漿の遺伝子変異の相違点（時間的多様性）を解析した。これらの結果から遺伝子変異の系統樹（phylogenetic tree）を作成し、遺伝子学的分子モニタリング（molecular monitoring）の確立を試みた。

採血はセルフリーDNA 抽出用採血管で行い血漿のみを抽出し、解析まで－80℃にて保存した。cfDNA 解析は、AVENIO ctDNA Expanded Kit（Roche Diagnostics、Basel、Switzerland）を用いて NextSeq にて実施した。パネルは、single nucleotide variant（SNV）やコピー数の増加を含む 77 の遺伝子変化を検出するために開発された。Exome

Aggregation Consortium、1000 Genomes Project、一塩基多型データベース、またはヒト遺伝子変異データベースで0.01%を超える割合で検出されたSNVのうち、germ lineのpolymorphismと考えられる変異は除外した。

結果および考察

1. 腫瘍内遺伝子多様性（intratumor heterogeneity）の解析

EGFR L858R変異陽性肺癌の蛋白発現の多様性に関して、高発現部位と低発現部位の癌細胞をNGSにより網羅的に単一ヌクレオチド変異（SNV）およびコピー数変化（CNV）を解析し、EGFR L858R高発現部位で、CCNE1、MDM2のコピー数増加を検出し、細胞増殖との関連を見出した［1］。また、EGFR変異陽性肺癌のCDK抑制機構を見出した［3］。時間的多様性の観点から、癌細胞クローンの追跡を血液学的に実現できれば、肺癌再発の早期分子診断や薬剤選択のマーカーとして、癌治療に大きな道が開けると考えた。

2. 血漿中のcfDNA解析（liquid biopsy）によるmolecular monitoring

病理病期Ⅱ～Ⅲ期の非小細胞肺癌患者5症例の全ての術前血液検体および定期的に採取した術後血液検体、計12検体（血漿）をAVENIO ctDNA Expanded Kitを用い解析を行った（表1）。このうち手術検体でEGFR変異を認めた4症例を対象とした。

表1. 切除標本とモニタリング血漿の遺伝子変異

Case	Stage	Recurrence	Primary tumor	Plasma			
				preope	postop		
					6M	12M	15M
1	IIB	+	EGFR Exon19 del	RET C634R	−	−	−
			CTNNB1			ABL1	NFE2L2
			PIK3CA			KDR	
2	IIB	−	EGFR L858R	no sample	MAP2K1		
					IDH1		
					PTEN		
3	IIIA	−	EGFR L858R	EGFR L858R	−		
				BRCA2	−		
				RET L109P	RET L109P		
					MAP2K1		
					preop (eye)	postop (eye)	
4	IVA	+	EGFR L858R	no sample	EGFR L858R	−	
						BRCA2	
						FGFR2	
						PDGFRA	
						STK11	
						TP53	

症例1は、pT3N0M0、StageⅡBであり、手術検体では、オンコマイン Dx Target Testで、EGFR（Exon19 deletion）、CTNNB1、PIK3CAの変異が検出された。術後1年3ヶ月で肺に多発小結節を認め、術前血漿でRET（C634R）のミスセンス変異を認めていたが、術後血漿では同変異を認めなかった。その他、ABL1、KDR、NFE2L2の変異を認めた。症例2は、pT2aN1M0、StageⅡBであり、手術検体は、EGFR（Exon21 L858R）変異陽性であった。術後無再発であるが、術後6ヶ月の血漿からMAP2K1、IDH1、PTEN変異を検出した。症例3は、pT2aN2M0、StageⅢAであり、手術検体および術前血漿からEGFR（Exon21 L858R）、BRCA2、RET変異を認めていたが、術後血漿からはEGFR、BRCA2変異は検出されず、RETが検出された。術後6ヶ月の血漿からはRET、MAP2K1変異を検出した。症例4は、pT2bN2M1a（胸水）、StageⅣAであり、手術検体はEGFR（Exon21 L858R）変異陽性であった。分子標的治療（osimertinib）により胸水は消失した。経過中に脈絡膜再発を認め、放射線治療を施行したが、同病変の再増大

を認め、眼球摘出が行われた。眼球の再発巣から EGFR（Exon21 L858R）に加えて E709K が検出され、osimertinib 耐性変異である可能性が示唆された。眼球摘出前の血漿では EGFR（Exon21 L858R）変異が検出されたが、眼球摘出後の血漿では EGFR（Exon21 L858R）変異は検出されず、BRCA2、FGFR2、PDGFRA、STK11、TP53 の変異が検出された。

以上、結果をまとめると、術前の血漿で、手術検体と同じ EGFR 変異を認めた症例は 4 例中 1 例のみであったが、定期的なモニタリング中に再発を認めた 2 症例に腫瘍由来と考えられる新たな遺伝子変異を認めた。また、再発を認めなかった 2 症例でも、PTEN や MAP2K1 の変異を認め、これらの変異は腫瘍由来である可能性がある。症例 4 では、脈絡膜再発後の血漿では手術検体と同じ EGFR 変異が検出されており、眼球摘出した手術検体からも同じ EGFR 変異が検出された。眼球摘出後の血漿では、EGFR 変異は消失し、他のミスセンス変異が検出されたものの、再発部の手術により腫瘍由来の ctDNA が消失した可能性が示唆され、分子モニタリングを提示した症例となった。他の症例においては、モニタリングした血漿から腫瘍由来と考えられる同一の変異は検出されず、分子モニタリングは確立できず今後の検討を要する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大分大学医学部呼吸器・乳腺外科学講座の小副川敦である。

文　献

1） Hashimoto T, Osoegawa A, Takumi Y, Abe M, Kobayashi R, Miyawaki M, Okamoto T, Sugio K. Intratumoral heterogeneity of copy number variation in lung cancer harboring L858R via immunohistochemical heterogeneous staining. Lung Cancer. 2018 Oct;124:241-247. Epub 2018 Aug 13. PMID: 30268468 DOI: 10.1016/j.lungcan.2018.08.013.

2） Osoegawa A, Yamaguchi M, Nakamura T, Morinaga R, Tanaka K, Kashiwabara K, Miura T, Suetsugu T, Harada T, Asoh T, Taguchi K, Nabeshima K, Kishimoto J, Sakai K, Nishio K, Sugio K. High incidence of C797S mutation in patients with long treatment history of EGFR-TKIs including osimertinib. JTO Clin Res Rep. 2021 May 14;2(7):100191. PMID: 34590037 DOI: 10.1016/j.jtocrr.2021.100191.

3） Osoegawa A, Takumi Y, Hashimoto T, Nakatsuji S, Hori M, Sakai M, Karashima T, Abe M, Miyawaki M, Sugio K. Cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibition in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations. Invest New Drugs. 2023 Feb 15. Online ahead of print. PMID: 36790603 DOI: 10.1007/s10637-023-01337-8.