

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19951

研究課題名(和文) 変異遺伝子のモニタリングによる大腸癌術後の微少転移及び再発の新たな評価法の検証

研究課題名(英文) The new estimation method of recurrence and metastasis on circulating tumor DNA detection in colorectal cancer patients

研究代表者

八重樫 瑞典 (Yaegashi, Mizunori)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80767484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌では遠隔転移症例でも転移巣切除により予後改善が得られるため早期発見が重要である。現在、大腸癌の再発・転移の診断はCEAといった腫瘍マーカーやCT/PETのような画像診断に委ねられているが、微小病変や炎症性変化との鑑別に苦慮することが多い。癌患者の血中には癌細胞由来の遊離DNA(ctDNA)が存在し、既存の腫瘍マーカーよりも特異性が優れている。本研究においてctDNAを用い少量の血液から大腸癌術後の再発転移や微小病変の存在、化学療法の効果をより鋭敏に捉えることができ、大腸癌の再発転移等の診断ツールとして応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：An early detection of metastasis or recurrence is important in the colorectal cancer, because a prognostic improves by metastatic-focus resection. The detection of metastasis and recurrence of the colorectal cancer is diagnosed by the tumor marker like CEA and the image diagnosis like CT/PET at present. However, it is difficult to discriminate micro lesion and an inflammatory change in many cases. Circulating tumor DNA (ctDNA) derived from the cancer exists in a patient's blood with cancer, and the specificity of ctDNA is superior to the existing tumor marker. In this study, it was able to acutely catch the effect of the chemotherapy and postoperative recurrence of the colorectal cancer by a small amount of blood. There is a possibility that ctDNA is able to apply as a tool of the detection of metastasis and recurrence of the colorectal cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：ctDNA NGS digital PCR heterogeneity バイオマーカー 大腸がん

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は主要五大癌の一つであり、2017年がん罹患数予測は149,500例・第1位、死亡数予測は53,000例・第2位(国立がん研究センターがん情報サービス)といずれも上位を占める。大腸癌では遠隔転移症例でも転移巣切除により予後改善が得られるため微小転移病巣の検出や follow up が重要であるが、既存の画像診断や腫瘍マーカー検査では再発病変の切除率は上昇させるものの、生存率向上に寄与しないことが報告されている(Primrose et al, JAMA, 2014)。また、近年分子標的薬を含む多くの化学療法が導入され治療手段が増えているが、効果のない化学療法は不要な有害事象をきたすだけでなく、治療レジメの切り替えのタイミングを逸し有効な治療の機会を奪う可能性もあり、時間的・経済的口スも大きい。したがって、大腸癌治療成績の向上にはより頻回の化学療法中の効果判定検査、follow up 期間の再発の有無の検査が必要である。しかし、CT/PET等の画像評価は頻回な施行は困難で、また病巣の軽度な変化や浮腫、炎症などの混在がある場合の治療効果の判断は難しい。さらに現在の大腸癌患者数を考慮すると、診察・検査の大幅な増加は現実的ではないと思われる。

癌患者の血漿中には癌細胞由来の遊離 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) が含まれ、ctDNA は原発巣と同じ変異を持ち、その症例特異性の高さから優れた癌診断マーカーとして注目されている。ctDNA を用いた Liquid biopsy は侵襲が少なく頻回に施行可能であり、体内腫瘍量を客観的に繰り返し評価可能な検査法であり、近年多くの癌腫でその有用性が報告されている。次世代シーケンサー (next generation sequence: NGS) を用いた癌ゲノム解析により病巣に集積する多数の遺伝子変異を同定可能であるが、血中の Wild type cfDNA に対する ctDNA の割合 (Mutant allele frequency [MAF]) は多くの症例で 1% 以下であり、検出困難な場合が多い。また Digital PCR (dPCR) は感度が高いものの、網羅的な遺伝子解析には不向きである。そのため岩手医科大学外科学講座では、「原発巣腫瘍組織における NGS を用いた遺伝子変異スクリーニング 血中遊離 DNA における当該遺伝子変異の dPCR による定量」システムを構築し、ctDNA が微量な癌の存在診断や治療効果判定に有用であるかを検証している。

### 2. 研究の目的

1) 本研究課題では、大腸癌症例を対象とし原発巣や転移巣組織より NGS により個々の症例に生じている複数の遺伝子変異を同定し、ctDNA 量の変化を digital PCR 技術を用いて定量モニタリングを行う。術前後も含めて補助化学療法中や follow up 中にも同システムを導入し、ctDNA モニタリングが遺残や再発の早期診断マーカーとなるかを検証する。

2) 腫瘍内の heterogeneity は癌の診断・治

療の障壁となっていると考えられるため NGS と digital PCR を用いた新たな評価法を構築するとともに、heterogeneity が ctDNA 診断に与える影響について検証する。

3) また、原発巣より得られた遺伝子変異と大腸癌関連分子 pathway のタンパク発現の比較、大腸癌の Actionable mutation の探索とを行い、個別化精密医療 (Precision medicine) における新たな薬剤選択の指標となる変異の発見やそれらの原発巣・血漿 DNA 両者からの変異確認による確実な判定法を見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

対象：術前診断で腫瘍組織採取可能な Stage 以上の進行大腸癌患者とした。

#### ・腫瘍組織の採取

ホルマリン固定前の原発巣組織を 3 か所より採取する(図 1)。それぞれ検体は半分に分割し、NGS 解析およびタンパク解析 (Reverse phase protein array: RPA) に用いる。

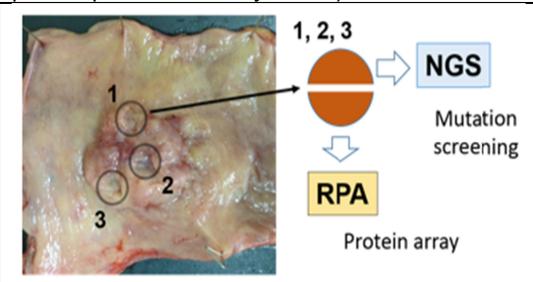


図1.腫瘍組織の採取

大腸癌切除組織より 3ヶ所より別々に組織を採取、それぞれ半分を NGS 解析と RPA 解析に用いた。

#### ・血漿検体採取

術前後と術後の定期的 follow up 期間や化学療法中の検査に合わせて採取、遠心分離後血漿のみを凍結保存。

#### ・遺伝子解析

151 のがん関連遺伝子を標的とした ClearSeq SS Comprehensive Cancer キャプチャーライブラリを使用した。

#### ・ctDNA のモニタリング

QuantStudio™ 3D Digital PCR System を使用し、NGS で同定された遺伝子変異を血漿中より検出した。

#### ・タンパク解析

変異解析を行った各腫瘍 3ヶ所それぞれで 281 個のタンパクを標的とした逆相タンパクアレイ法 (reverse-phase protein arrays ; RPPA) で解析を行った。

### 4. 研究成果

#### ・患者背景

H30年4月現在、50例が登録され腫瘍サンプルは154(原発巣150、転移巣4)、血液サンプルは938本保有している。登録症例：年齢の中央値は72歳[40-84]、女性31人(62%)であった。腫瘍部位と Stage の内訳を図2に示した。H30年4月現在観察期間中における再発率は、Stage を除く45例中4例(8.9%)であった。

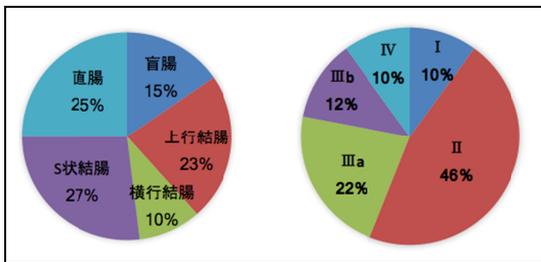


図2. 腫瘍部位と Stage の内訳

左：大腸癌原発巣部位

右：術後確定診断後の Stage

・大腸癌 151 がん関連遺伝子パネルにおける網羅的遺伝子解析

12 症例 42 サンプル(多発癌 2 例含)を用いて NGS 解析を行なった。これらサンプルは解析前に腫瘍組織の HE 染色切片において、病理医によって Cellularity が 40%以上であることを確認した。解析結果は図 3 に示した。

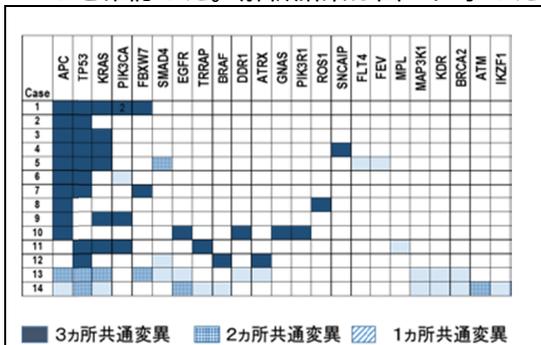


図3. NGS 解析による採取部位別変異状況

NGS 解析による 14 症例の遺伝子変異の一覧。変異遺伝子と変異を有する部位数を示す。Hyper mutation 症例について省略。

同定された遺伝子変異の総数は 76 種類。平均で 1 腫瘍に変異を 9 つ認めた。Case13, 14 を除く 12 腫瘍に 3 ヶ所同一変異(clonal mutation)を認め、同一遺伝子変異数は 1 腫瘍平均で 3 つであった。78.6%(11/14 腫瘍)に 3 ヶ所で一致しない変異(subclonal mutation)を認めた。また、TP53/APC/KRAS/PIK3CA の遺伝子のうち、全 14 腫瘍でいずれかの遺伝子変異を認めた。Case13, 14 においては clonal mutation を認めず、さらに同定された変異数が 30 以上と hyper mutation を持った腫瘍の可能性が示唆された。

NGS で同定された変異において mutant allele frequency(MAF)% は clonal mutation(32.7% [23.4-43.8])より subclonal mutation(20.9% [9.6-35.9])で低値(p<0.01)であった。

・dPCR を行うための Primer/Probe の作成

NGS で同定された変異 76 種類のうち、KRAS/BRAF/PIK3CA の Hot Spot 変異については市販の dPCR assay kit を使用し、症例特異的変異 20 種については独自に Primer/Probe を作成した。変異の選定は NGS で同定された変異の MAF% が 10% 以上かつ Total read 数が 100 を超えるものとした。

・dPCR による Primer/Probe の動作確認

作成した 20 種類の Primer/Probe に対して 原発巣組織を用いて動作確認をした(図 4)。

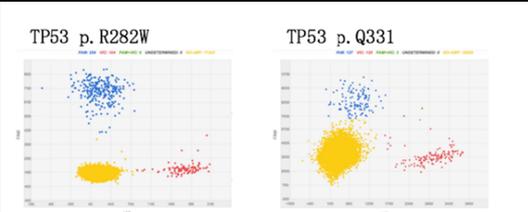


図4. dPCR による Primer/Probe の動作確認の一例

X 軸は Wild を検出する VIC 標識(赤点)

Y 軸は Mutant を検出するための FAM 標識(青点)

黄点は反応なしを示す。

20 種類中 16 変異(80%)が dPCR で動作確認可能であった。その内訳として clonal mutation は 10 種類中 10 変異、subclonal mutation は 10 種類中 6 変異(60%)が確認可能であった。(表 1)

Mutation	動作確認
TP53 p. R175H	○
TP53 p. Q192X	○
TP53 p. R282W	○
TP53 p. Q331del	○
APC p. E1345X	○
APC p. R405X	○
APC p. Q412X	○
APC p. Q1338X	○
APC p. R876X	○
PIK3CA p. R88Q	○
EGFR p. G671S	○
DDR2 p. N148Y	○
SMAD4 p. S474X	○
SMAD4 p. Y353C	○
MPL p. R456P	○
NELL2 p. D133Y	○
PDGFRA p. S851L	×
TP53 p. T125M	×
FLT4 p. R659S	×
SMARCB1 p. R331C	×

表1. 20種類の作成した遺伝子変異

全ての 3 ヶ所のサンプルに対して dPCR を用いて NGS で同定された subclonal mutation を検索すると、NGS では検出されなかった採取部位から 50%(5/10 箇所)検出された(図 5)。さらに、14 腫瘍 42 サンプルから同定された遺伝子変異のうち保有または作成した Primer/Probe 26 種類を使用し NGS と dPCR の MAF の相関を調べた。NGS と dPCR の MAF を比較できたのは 57 個、相関係数は 0.75 であった。

腫瘍採取部位	NGS	dPCR
1	APC ○	APC ○
2	APC ×	APC ○
3	APC ×	APC ×

図5. 同一サンプルに対する NGS と dPCR の結果(事例)

NGS では検出されなかったサンプルより dPCR では検出される腫瘍が存在する。

・dPCR による治療前血漿の ctDNA の検出率

動作確認できた変異を用いて NGS で同定された数種類の変異を各症例の術前血漿より ctDNA を測定した。14 腫瘍中 12 腫瘍(85.7%)で ctDNA を検出できた。検出できた ctDNA の MAF の平均は 2.14% であったが、Stage を除いたサンプルの MAF の平均は

0.47%であった。

・dPCRによる血漿中のctDNAモニタリング

術前後及び定期 Follow 中の ctDNA をモニタリングすると術後より ctDNA が検出感度以下になった。Case1 及び Case12 両症例とも無再発症例である(図6)。

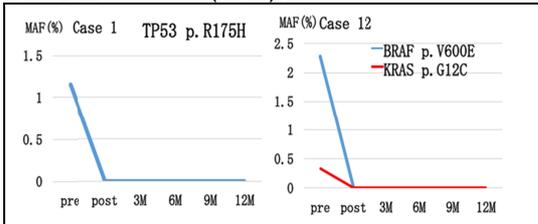


図6. ctDNA モニタリング(無再発例)

Case1, Case12 において術前血漿からは ctDNA が検出されたが、術後以降は検出されなかった。

Case5 においては2種類の ctDNA が術前より同定可能であった。しかしながら補助化学療法を行う前の術後 71 日目に TP53 p.R175H が検出された。その後補助化学療法を行うことで再び ctDNA は検出感度以下となった。補助化学療法の効果を示唆する可能性がある(図7)。また腫瘍マーカーである CEA, CA19-9 は観察期間中基準値内であった。

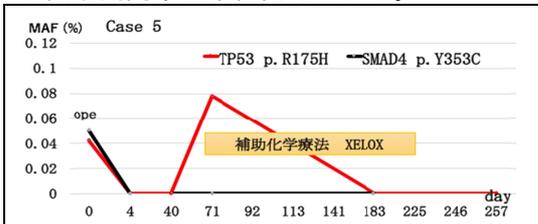


図7. ctDNA モニタリング(補助化学療法の効果)

TP53(clonal mutation). SMAD4(subclonal mutation) が術前血漿より検出された。術後 71 日目の術後補助化学療法開始前血漿から TP53 のみが検出され、その後は検出されなかった。

Case8(図8)においては術前より2種類の ctDNA が検出され、さらに TP53 p.R175H の変異は術後も検出されており、術後微小な癌の残存の可能性を示唆した。その後は術後補助療法により検出感度以下に低下するも術後補助療法途中(術後 209 日目)で MAF 0.05% と低頻度ではあるが検出された。その約7ヶ月後の CT でリンパ節再発を認めた。腫瘍マーカーである CEA, CA19-9 はいずれも観察期間中基準値内であった。

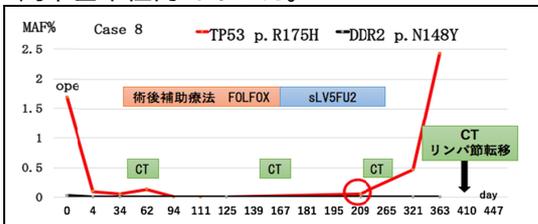


図8. ctDNA モニタリング(再発例)

TP53(clonal mutation)、DDR2(subclonal mutation) が術前血漿より検出された。術後は TP53 のみ検出され術後補助療法開始とともに検出不能になるも、術後補助療法の終了頃より再び検出されるようになり、その7ヶ月後に CT で明らかな大動脈周囲のリンパ節転移として再発診断となった。

Case3 と Case4 は同一患者の多発癌症例である。両腫瘍とも TP53/APC/KRAS 遺伝子に変異を持つが、変異部位が異なり両腫瘍は全く違う遺伝子異常にて発生した腫瘍と考えられた。多発肝肺転移を認め stage であるが、Case4 では術後 ctDNA が検出されず Case3 では3種類の ctDNA が高頻度で検出されたことを考慮すると肝肺転移の原発巣は Case3 の腫瘍と推測される(図9)。

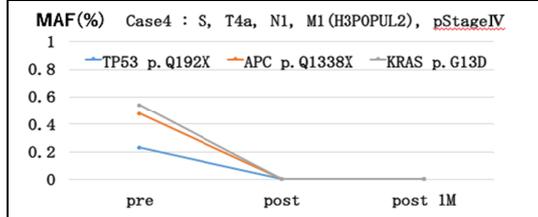
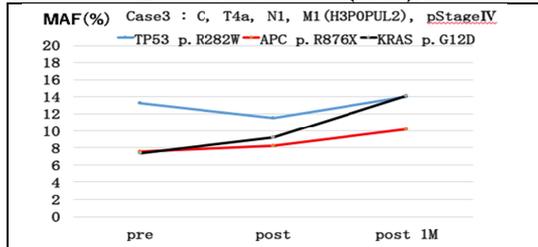


図9. 多発癌症例(上図:Case3、下図:Case4)

両腫瘍から検出された TP53/APC/KRAS 遺伝子は変異部位が全く異なっていた。また術前より両腫瘍より変異が検出されているが、case3 においては術後も高い MAF% で ctDNA が検出された。

・原発巣 RPPA 解析

NGS 解析した 14 腫瘍の 42 サンプルに対して RPPA を用いて網羅的タンパク発現解析を行なった。同一腫瘍内の遺伝子変異における heterogeneity と同様、タンパク発現も部位により heterogeneity が見られる症例があった。現在、同一腫瘍内の原発巣変異およびタンパク発現状況における heterogeneity と ctDNA の関連について解析中である。(図10)。

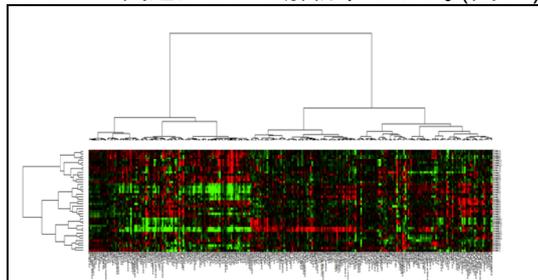


図10. 原発腫瘍のタンパクのクラスター解析

横軸はタンパクの種類、縦軸はサンプル部位  
赤: タンパク高発現、緑は低発現を示す。

考察

1) 8割以上の症例で、原発巣 NGS により検出された症例特異的遺伝子変異について、術前血漿サンプルで dPCR を用いて ctDNA を検出可能であった。また ctDNA モニタリングでは、腫瘍マーカーや画像で遺残・再発病巣が確認できない症例や腫瘍量変化を検出できない症例で、ctDNA の推移から術後の残存腫瘍細胞の有無の判定、補助化学療法の有効性、

早期再発診断を可能とする所見が見出された。

2) CEAなどの既存のタンパクバイオマーカーと異なり、ctDNAは個々の腫瘍に特異的であり、画像診断で炎症性変化や他癌腫等の鑑別に有用な可能性がある。また多発癌の症例においては、再発転移巣がどちらの原発巣由来であるかが判別可能であり、抗EGFR抗体薬などの分子標的薬を使用する際のバイオマーカーとしても有効な可能性がある。またCEAやCA19-9より鋭敏な反応を示すため、画像診断の補助診断目的や評価不能な病変への効果判定の他、化学療法の継続・中止・変更の指標になる可能性が示唆された。

3) 本研究で注目した腫瘍内 genetic heterogeneity の検索で、同一腫瘍内3か所のNGS解析で変異なしと判定された subclonal mutation の多くは、dPCRでは5%以下の変異アリル頻度で検出可能であった。したがって原発巣変異スクリーニングの際に変異アリル頻度のcut offで clonal mutation と判定されるものも増加するものと思われる。しかし、変異アリル頻度の高い Clonal mutation 程 ctDNA 検出率が高く、subclonal mutation や変異アリル頻度の低い変異は有効な ctDNA モニタリングができていない症例も見られたことから、一定の変異選定基準は示せたものとおもわれる。現在も血漿サンプルの集積は続いており、長期観察データの評価による ctDNA monitoring の意義を明らかにしていけるものと思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

1. 八重樫 瑞典、大塚 幸喜、吉田 徹、遠野 千尋、皆川 幸洋、高橋 正統、石岡 秀基、木村 聡元、箱崎 将規、松尾 鉄平、佐藤 慧、高清水 清治、畑中 智樹、佐々木 章. 進行痔瘻癌に対して集学的療法後に根治手術施行した長期生存の1例. 癌と化学療法. 2017 44 巻(12): 1754-1756
2. 木村 聡元、大塚 幸喜、八重樫 瑞典、箱崎 将規、松尾 鉄平、佐藤 慧、高清水 清治、畑中 智樹、佐々木 章. 大腸癌における漢方薬の応用. 臨床外科. 2017 72 巻(8): 952-957
3. 大塚 幸喜、木村 聡元、箱崎 将規、八重樫 瑞典、上嶋 徳、三宅 孝典、高清水 清治、畑中 智樹、松尾 鉄平、佐藤 慧、藤井 仁志、吉楽 拓哉、里吉 梨香、佐々木 章. 腹腔鏡下直腸癌手術 超音波凝固切開装置の活用法. 臨床外科 72 巻(5):569-577
4. Yaegashi Mizunori, Otsuka Koki, Kimura Toshimoto, Hakozaiki Masanori, Kamishima Megumu, Hatanaka Tomoki,

Sato Kei, Fujii Hitoshi, Matsuo Teppei, Sasaki Akira. Transumbilical abdominal incision for laparoscopic colorectal surgery does not increase the risk of postoperative surgical site infection. Int J Colorectal Dis. 2017 May; 32(5): 715-722. doi:10.1007/s00384-017-2753-4.

5. Koki Otsuka, Toshimoto Kimura, Masanori Hakozaiki, Mizunori Yaegashi, Teppei Matsuo, Hitoshi Fijii, Kei Sato, Tomoki Hatanaka, Akia Sasaki. Comparative benefits of laparoscopic surgery for colorectal cancer in octogenarians: a case-matched comparison of short- and long-term outcomes with middle-aged patients. Surg Today. 2017 May;47(5):587-594. doi: 10.1007/s00595-016-1410-9

[学会発表](計 4件)

1. 第76回日本癌学会学術総会 2017/9/30. Exploitation of a liquid biopsy system using circulating tumor DNA in esophageal cancer patients. Takeshi Iwaya, Fumitaka Endo, Yasushi Sasaki, Mizunori Yaegashi, Takehiro Chiba, Yuji Akiyama, Mari Masuda, Tesshi Yamada, Takashi Tokino, Satoshi Nishizuka
2. AACR 2017(American Association for Cancer Research) 2017/4/5. Evaluation of the utilization of blood collection tubes for cell-free DNA research. Fumitaka Endo, Takeshi Iwaya, Takehiro Chiba, Mizunori Yaegashi, Kohei Kume, Kei Sato, Atsuhiko Arisue, Yutaka Nishinari, Ryoko Kawagishi, Takenori Segawa, Nishizuka Satoshi, Akira Sasaki
3. 第50回制癌剤適応研究会 2017/3/17. 食道癌パネルを用いた食堂扁平上皮癌症例の遺伝子解析. 岩谷 岳、遠藤 史隆、西塚 哲、八重樫 瑞典、千葉 文広、川岸 涼子、有末 篤弘、秋山 有史、高原 武志、大塚 幸喜、肥田 圭介、水野 大、佐々木 章
4. 第75回日本癌学会学術総会 2016/10/8. Evaluation of the utility of blood collection tubes for cell-free DNA research 遠藤史隆、岩谷 岳、千葉 文広、八重樫 瑞典、佐藤 慧、久米 浩平、西塚 哲

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

八重樫 瑞典 (Yaegashi Mizunori)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80767484