

授与番号	甲第 1938 号
------	-----------

#### 論文内容の要旨

Circulating cell-free DNA as a biomarker for prognosis and response to systemic therapy in patients with unresectable hepatocellular carcinoma  
(切除不能肝細胞癌患者に対する治療効果予測バイオマーカーとしての血中遊離DNAの有  
用性の検証)  
(渡辺拓也, 鈴木悠地, 黒田英克, 開勇人, 鈴木彰子, 田村明生, 家子義朗, 西塚哲, 松本主  
之)  
(Oncology 10 巻, 1159 号, 令和 5 年 6 月掲載)

#### I. 研究目的

全身薬物療法(分子標的薬および免疫複合療法)を行う切除不能進行肝細胞癌の予後や治療効果を予測する有効なバイオマーカーは存在しない。リキッドバイオプシーの一つとして着目される血中遊離DNA(cell-free DNA: cfDNA)は、細胞がアポトーシスなどの細胞死を起こす際に血中に放出された細胞外遊離DNA断片である。健常者では、主に血球系細胞の死滅に由来するDNA断片が微量に存在する一方で、がん患者においてはがん細胞由来のDNA断片である血中腫瘍由来DNA(circulating tumor DNA)が混在する結果として、cfDNA濃度が増加することが知られている。肝細胞癌患者では進行度が進むにつれて、cfDNA濃度が増加することが報告されている。しかしながら、切除不能進行肝細胞癌に対する全身薬物療法中のcfDNA濃度の情報が、生命予後および治療効果の予測に活用できるかという点については明らかとなっていない。本研究は、全身薬物療法を新規に導入する切除不能肝細胞癌患者の血漿中のcfDNA量を経時的に測定し、cfDNA濃度およびその変化量が生命予後および治療効果の予測に有用かというcfDNAの臨床的妥当性(clinical validity)を検証した。

#### II. 研究対象ならび方法

切除不能肝細胞癌治療経過中の血中遊離DNAを用いた肝細胞癌体内腫瘍量モニタリングのパイロット研究(HG-2019-015, jRCT1020200017)に登録された、新規に全身薬物療法を導入する切除不能進行肝細胞癌患者、20例を対象とした。治療前、治療開始からの定期受診時(例: 14日, 28日, 42日, 56日, その後28日毎)にCell-Free DNA BCT採血管(Streck社)で採取した血液について血漿を分離した。cfDNAはQIAamp Circulating Nucleic Acid Kit(Qiagen社)を用いて抽出し、Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit for the Qubit 2.0

Fluorometer(Thermo Fisher Scientific 社)で 血漿 1ml 当たりの cfDNA 量を算出した。cfDNA 濃度と腫瘍体積との相関を解析した。腫瘍体積は 3D-slicer(<https://www.slicer.org>)を用いて計測した。治療開始前の cfDNA 濃度と全生存期, 無増悪生存期間との関連を解析した。また, cfDNA の変化率( $\Delta$ cfDNA=post/pre-cfDNA)と奏効率, 病勢制御率との関係を明らかにするため, ROC 曲線を作成し, Youden index を算出し, カットオフポイントを求めた。群間比較は, 連続変数については Mann-Whitney U 検定を行い, カテゴリー変数は Fisher の正確検定を行った。生存期間は Kaplan-Meier 法にて評価し, 群間差は Log-rank test で評価した。

### III. 研究結果

1. 治療開始時 cfDNA 濃度の中央値は 50.34 ng/ml (四分位範囲: 23.3-128.3) であった。
2. cfDNA と体内腫瘍量の相関を解析した結果, 治療開始時 cfDNA 濃度と体内腫瘍量には正の相関を認め( $R^2=0.28, P<0.0231$ ), 治療開始後初回の画像評価時ではより強い相関を認めた( $R^2=0.6039, P<0.001$ )。
3. cfDNA 濃度が中央値以上の群, 中央値以下の群で全生存期間を比較検討した。結果, cfDNA 濃度が中央値以下の群では全生存期間が有意に長かった (HR 0.2765, 95% 信頼区間 0.08-0.81,  $P=0.0197$ )。
4. 治療開始時 cfDNA と治療開始1ヶ月後の cfDNA の変化率を  $\Delta$ cfDNA ( $\Delta$ cfDNA= post/pre-cfDNA とした)。 $\Delta$ cfDNA 比のカットオフ値は 0.9857 と算出され,  $\Delta$ cfDNA $\geq 1.0$  群と  $\Delta$ cfDNA $<1.0$  の群で全身化学療法に対する治療予測精度を検討した。結果,  $\Delta$ cfDNA $\geq 1.0$  群では病勢制御率 (Disease control rate) が 15.3% (2/13),  $\Delta$ cfDNA $<1.0$  群では 66.7%(4/6)で,  $\Delta$ cfDNA $\geq 1.0$  群では有意に病勢制御率が低かった ( $P=0.046$ )。
5. 治療前と治療開始から1ヶ月後の cfDNA 濃度を比較解析した結果, 病勢制御 (complete response, partial response, stable disease)が得られた集団では cfDNA 量に有意な変化を認めなかったのに対して ( $P=0.9375$ ), progressive disease 群では cfDNA 濃度が増加していた ( $P=0.00245$ )。

### IV. 結 語

治療前 cfDNA 濃度により, 分子標的薬および免疫複合療法を新規に導入する切除不能肝細胞癌の生命予後を層別化できることが明らかとなった。また, 治療開始から1ヶ月後の cfDNA の変化率は病勢制御率と関連すること, 特に progressive disease となる集団では cfDNA 濃度が有意に増加することが示された。cfDNA は切除不能進行肝細胞癌患者の生命予後および治療効果を予測するバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 齋野 朝幸 (解剖学講座：細胞生物学分野)  
副査 特任准教授 柿坂 啓介 (内科学講座：消化器内科肝臓分野)  
副査 准教授 片桐 弘勝 (外科学講座)

リキッドバイオプシーは、循環腫瘍 DNA や循環腫瘍細胞などを体液中に検出するための低侵襲検査である。このうち血中遊離 DNA (cfDNA) は、細胞がアポトーシスなどの細胞死を起こす際に血中に放出された細胞外遊離 DNA 断片である。本研究は、全身薬物療法を新規に導入する切除不能肝細胞癌患者の血漿中の cfDNA 量を経時的に測定し、cfDNA 濃度およびその変化量が生命予後および治療効果予測に有用かどうか検証したものである。

新規に全身薬物療法を導入する切除不能進行肝細胞癌患者 20 例を対象とした。血漿 cfDNA を抽出し、cfDNA と腫瘍体積との相関の解析、治療開始前の cfDNA 濃度と全生存率、無増悪生存期間との関連性を解析した。その結果、治療開始時 cfDNA と体内腫瘍量との間に正の相関を認めた。また、cfDNA 濃度が中央値以下の群では全生存期間が有意に長かった。治療前と治療開始から 1 ヶ月後の cfDNA 濃度を解析した結果、progressive disease 群では cfDNA 濃度の増加が認められた。本研究によって、治療前の cfDNA 濃度の解析により切除不能肝細胞癌の生命予後を層別化できることが明らかとなった。

これまで cfDNA は、他のリキッドバイオプシーと同様に効果予測、予後予測、診断、治療モニタリングなどの低侵襲検査として大きな期待が寄せられている。肝癌患者に対してもの実臨床への展開が期待される。cfDNA は切除不能進行肝細胞癌患者の生命予後および治療効果を予測するバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。NGS による低頻度変異アレルの検出技術の進歩は、cfDNA などのリキッドバイオプシーによるプレジジョンメディシンを可能にすると期待されており大変興味深い。切除不能肝細胞癌の治療に寄与する上で大変興味深い有益な知見を示した研究と言える。学位に値する研究である。

## 試験・試問の結果の要旨

研究の手法と結果の詳細を質問するとともに、統計学的解析に関する諮問を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

## 参考論文

- 1) Lemierre Syndrome in an Elderly Patient with Dementia (高齢認知症患者に発症したレミエール症候群) (渡辺拓也, 他 1 名と共著) International Journal of Gerontology, 15 巻, 2 号 (2021):p185.
- 2) Early identification using the referral system prolonged the time to onset for hepatic encephalopathy after diagnosing severe acute liver injury (紹介システムを利用した早期診断が重症急性肝障害診断後の肝性脳症発症までの時間を延長させた) (柿坂啓介, 他 6 名と共著) Scientific Reports, 14 巻, 10 号 (2020):17280.