

平成 31 年 3 月 29 日

平成 30 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職
岩手医科大学外科学講座・任期付助教
氏 名 八重樫 瑞典

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 大腸癌 ctDNA に原発巣 heterogeneity が及ぼす影響 (英文名) Impact of intratumor heterogeneity for ctDNA of colon cancer
2. 研究実施期間 平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日
3. 助成金額 1,000,000 円
4. 研究の目的 本研究は H28-29 年度科研費研究課題「変異遺伝子のモニタリングによる大腸癌術後の微小転移及び再発の新たな評価法の検証」に引き続き、大腸癌の術前後、化学療法前後、定期 follow 中の微量な ctDNA の変化について既存の検査法と比較し、有用性の検討を行う。このために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(next generation sequence)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。腫瘍内の genetic heterogeneity の存在を考慮し、heterogeneity が ctDNA へ及ぼす影響を検証する。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。
5. 研究概要と報告 研究の流れとして、「大腸癌手術直後の原発巣からの腫瘍組織の採取(同一腫瘍内からの 3 箇所) → 腫瘍組織 3 箇所に対して NGS による遺伝子解析 → 腫瘍特異的遺伝子変異の選択 → dPCR を用いて血漿 DNA 中の ctDNA をモニタリング」を行い、同時に腫瘍組織の 3 箇所のタンパク解析を行った。H31 年 3 月現在、57 例が登録され腫瘍サンプルは 175 (原発巣 171、転移巣 4)、血液サンプルは約 1500 本保有している。病理学的 StageⅢ以上かつ腫瘍組織の HE 染色切片に対して病理医による Cellularity が 40%以上と確認できた大腸癌を用いて、151 がん関連遺伝子パネルにおける遺伝子解析を行った。Heterogeneity を調査するために、原発巣腫瘍 1 つから 3 カ所サンプルを採取し、14 腫瘍 42 サンプル(内 2 例は多発癌)に対して NGS 解析を行った。同定された遺伝子変異の総数は 84 種類。平均で 1 腫瘍に変異を 12 個認めた。14 腫瘍のうち 12 腫瘍が少なからず 1 つの Founder mutation(同一腫瘍内において 3 カ所のサンプルに共通の mutation をもつ)を持っていた。1 つの腫瘍に対して Founder mutation は平均 3.7 個、non-Founder mutation は平均 8.4 個あった。

42samplesにおいて Founder mutation が同定された部位数は 153、non-Founder mutation が同定された部位数は 147 個であった。これら同定された mutation の VAF(%)を比較すると、Founder mutation の median VAF%(30.0[IQR:22.9-41.4]) は non-founder mutation の median VAF%(22.4[IQR:12.1-38.8]) より明らかに高かった ($p<0.0001$)。

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。作成した Primer/Probe も含めて、25 種類の mutation を用いて dPCR を行った。14 腫瘍中 12 腫瘍 (85.7%) において、術前血漿中から ctDNA を検出することができた。術前血漿において検出できた ctDNA の MAF の平均は 2.14%であったが、StageIV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 モニタリングにおいては、無再発症例は術前検出された ctDNA が術後以降の血漿では検出されなかった。同様に無再発症例 (pStageIIIb) において術前と術後 40 日目の血漿から ctDNA が検出されたが補助化学療法を開始すると感度以下まで低下しその後も感度以下であった。pStageIIIb のリンパ節再発症例においては、術前より検出された ctDNA は低値ではあるものの術後補助化学療法中も感度以下にはならなかった。補助化学療法が終了した 2 ヶ月後より急上昇しその 3 ヶ月後に CT で再発を認めた。ctDNA モニタリングにおいて non-Founder mutation と比べて Founder mutation がより再発及び治療反応に対して鋭敏に反応した。腫瘍マーカーである CEA は経過中一度も基準値を超えなかった。多発肝肺転移の多発癌症例においては、術前血漿から右側および左側大腸癌の ctDNA を検出することができた。しかしながら、術後血漿において右側のみの ctDNA が検出され、多発転移を起こしている原発巣は右側腫瘍と推測された。術後化学療法中の ctDNA の推移においてもその治療効果を反映していたのは右側大腸癌の ctDNA であった。

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 が見られる症例半数以上で認められた。多発遠隔転移を持つ多発大腸癌症例においては、転移を引き起こしていると思われた右側の大腸癌においては、mTOR や glutaminmetabolite などの腫瘍促進プロセスに関わるタンパクが高発現を示し、逆に抗アポトーシス経路のタンパク発現が低下していた。同じようなタンパク発現を有しているサンプルを順次整列させると、Founder mutation を持つ症例であってもその半数が同じタンパク発現を有していなかった。また、遺伝子毎の Wild type と mutant type のタンパク発現量を解析すると、両者には差を認めなかった。したがって、同一腫瘍内で同じ mutation を持っていたにもかかわらず、発現しているタンパクの種類は異なるケースもあり、さらにタンパク発現量は mutant を持つ遺伝子においても特に増加していないことが判明し、遺伝子変異の有無によって単純に分子標的薬の効果が得られる保証はないことが示唆された。

考察として、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。今後は、NGS で多数同定された遺伝子変異の中から、ctDNA としてモニタリングすべき変異の選定方法を見出すこと、検出困難な ctDNA が存在するかどうかの検証を行い、現在使用されている腫瘍マーカーや再発や化学療法の効果判定の補助診断に応用できるかの臨床研究への準備を始めることを課題としたい。

また今後は、現時点での結果をまとめて論文投稿を行う予定である。

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 岩手医科大学外科学講座・任期付助教
氏 名 八重樫 瑞典

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。
また、別刷り2部を必ず添付してください。

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

・ Mizunori Yaegashi

The effect of primary tumor heterogeneity on circulating tumor DNA detection in colorectal cancer patients

第77回 日本癌学会学術総会

2018年9月27日

・ Mizunori Yaegashi

The clinical utility of ctDNA in colorectal cancer validated by multiregional sequencing and protein analysis

American Association for cancer Research Annual meeting 2019

2019年4月1日

○著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。