

大腸癌に対するリキッドバイオプシーを用いた個別化医療の実現

大阪急性期・総合医療センター 消化器外科

井上 彬

1. 諸言

本邦における大腸癌の罹患率・死亡率は依然として高く、その予防や早期診断・治療法の開発は極めて重要な課題である。

大腸癌に対する標準治療は、Stage I～III は外科的切除である。術後は、病理組織学的にリンパ節転移を有さない Stage I/II では経過観察が原則であり、リンパ節転移を有する Stage III は術後補助化学療法が推奨される。一方、遠隔転移を有する Stage IV 及び再発例では、外科的根治切除が可能な場合は転移巣の外科的切除が推奨され、オプションとしてリスクに応じた周術期化学療法が併用される。一方で、外科的根治切除が困難な場合は全身化学療法が行われる。

肝転移は大腸癌の遠隔転移巣として最も頻度が高い。根治切除が可能な肝転移に対する標準治療は外科的切除である。しかし、遠隔転移巣の切除後の再発率は 50～70%と高く、治療成績の向上のために術後補助化学療法の実施が議論されてきた^{1,2)}。ただし、肝転移切除後に再発する患者と再発しない患者が存在し、どの患者に積極的に術後補助化学療法を行うべきかについては明らかになっていない。近年の研究結果から、再発する患者は血液中に微小残存病変 (Minimal Residual Disease : MRD) が存在することが明らかとなり、肝転移切除後の MRD を検出し再発リスクの評価に有用であったとする研究報告がある^{3,4)}。しかし、この技術は実臨床においては未だ確立していない。以上より、個々の大腸癌患者の再発リスクに応じた術後補助化学療法の実施が臨床上的大きな課題と言える。

大腸癌の発生・進展には、遺伝子異常が大きく関与していることが明らかとなっている。The Cancer Genome Atlas Network (TCGA) プロジェクト研究において、大腸癌 276 例の臨床サンプルを用いた全ゲノム解析が行われた⁵⁾。その結果、大腸癌では遺伝子バリエーション (変異) の多い Hypermutated type と、多くない Non-hypermuted type に分かれることが明らかになった。前者では ACVR2A (63%)、APC (51%)、TGFB2 (51%)、BRAF (46%) などが高頻度の遺伝子異常として検出され、後者では APC (81%)、TP53 (60%)、KRAS (43%)、TTN (31%) が認められた。また、大腸癌の治療標的となり得るような遺伝子異常として、MYC を活性化する WNT シグナル経路や Transforming growth factor (TGF) - β シ

グナル経路に関わる遺伝子の重要性が明らかとなった。これらのドライバー遺伝子変異を標的とした治療薬の開発が期待されている。

近年の研究結果で、腫瘍組織から血液中に漏れ出て循環する腫瘍由来 DNA (circulating tumor DNA : ctDNA) の存在が明らかとなった。リキッドバイオプシーとは、主に血液から ctDNA を検出し、がんの診断に役立てる新しい技術であり、現在臨床開発が急速に進んでいる。リキッドバイオプシーの利点は、採血のみで行えるため、従来の腫瘍組織を用いた方法よりも簡便かつ低侵襲である。さらに、腫瘍組織の採取が困難な場合でも検査が可能なこと、繰り返し採取が可能なこと、がん関連遺伝子異常の変化が分かること、組織検査より短時間で解析できること、腫瘍の遺伝子異常の全体像が捉えられることなど、多くのメリットがある⁶⁾。

大腸癌におけるリキッドバイオプシーの臨床応用として、①予後予測/化学療法 of 早期効果判定、②分子標的薬の効果予測/獲得耐性変異の検出、③外科的治療切除後の MRD の検出と再発リスクの評価、④がん関連遺伝子異常のプロファイリングと適切な分子標的薬の選択などがある。現在、これらを目的とした次世代シーケンサー (Next Generation Sequence : NGS) による遺伝子解析の研究開発が行われている。

Plasma-Safe-Seq (PSS) 技術は、医療機器メーカーであるシスメックス株式会社 (兵庫県神戸市) が開発し、血漿中から ctDNA を検出する新しい検査システムである。DNA 分子バーコード法を用いることで、NGS の読み取りエラーを防ぐことが可能であり、NGS による検出感度を従来の方法よりも 10 倍以上改善し、変異頻度 (Mutant Allele Frequency : MAF) 0.05% までの検出を可能にした。この技術を用いた臨床開発は進んでおり、230 名のステージ II 大腸癌患者において根治切除後の ctDNA 検出の有無が再発リスクを高い精度で予測することが報告されている⁷⁾。さらに、局所進行直腸癌や stage III 結腸癌において根治切除後および術後補助化学療法後の ctDNA 検出の有無が再発リスクの評価に有用であったと報告されている^{8,9)}。

個別化モニタリング (Pick & Seq 法) とは、個々の患者毎の腫瘍組織検体を用いて PSS 法による遺伝子パネル検査を行いベースラインの遺伝子変異を測定し、この腫瘍特異的な遺伝子変異をベースに血液検体から ctDNA を抽出し NGS により腫瘍由来の遺伝子変異の有無を検出する検査システムである。検証実験では、この技術を用いることで高い感度と特異度で ctDNA を検出し、個々の患者の臨床経過とも有意に相関したモニタリングに成功している。

本研究では、今後計画しているパイロット研究の実現可能性を評価する。すなわち、今後計画しているパイロット研究では、根治切除可能な肝転移のみを有する大腸癌患者を対象に、リキッドバイオプシーを用いて ctDNA を検出することが、肝転移の根治切除後の再発の早期診断に有用かを探索的に検討する。しかし、このパイロット研究で使用する PSS 法を用いた遺伝子パネル検査で、肝転移の組織の遺伝子変異を実際に測定したデータがこ

れまでに存在しないため、パイロット研究を実施する前に本研究で検討する必要があると考えた（図1）。以上より、本研究の目的は肝転移巣の組織を用いた PSS 法による遺伝子パネル検査で、ベースラインの遺伝子変異を実際に同定できるかどうかを検討することである。

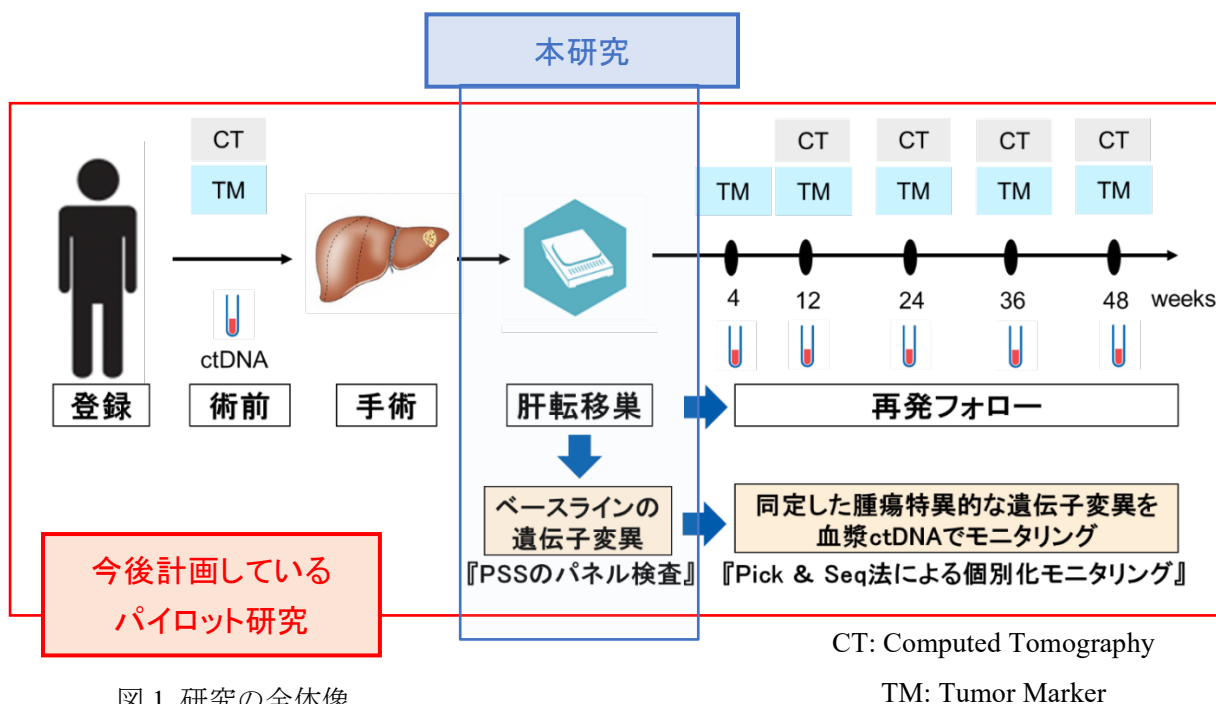


図1 研究の全体像

2.方法

本研究は介入を行わない後ろ向きの観察研究である。当センターにおける大腸癌の肝転移切除後の症例で、肝転移巣の組織検体（ホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin Fixed Paraffin Embedded：FFPE））4例を用いて、肝転移巣の組織検体（FFPE）からDNAを抽出し、PSS法による遺伝子パネル検査を行い、ベースラインの遺伝子変異を測定・解析した。

今後計画しているパイロット研究では、根治切除可能な肝転移のみを有する大腸癌患者を登録し、肝転移切除前に ctDNA を測定する。次に、肝転移切除後に切除組織を用いて PSS 法による遺伝子パネル検査を行いベースラインの遺伝子変異を測定する。そして、検出された遺伝子変異を有する癌関連遺伝子を Pick&Seq 法によるリキッドバイオプシーで前向きにサンプル採取し、追跡期間終了後に後ろ向きにサンプルをまとめて測定・解析する。最終目的は、このリキッドバイオプシーで ctDNA を測定することが再発の早期発見に有用であるかを検討することである。

本研究では、パイロット研究に先立ち、肝転移巣の組織検体（FFPE）を用いて PSS 法による遺伝子パネル検査を行い、ベースラインの遺伝子変異を測定し、遺伝子変異を有する癌関連遺伝子を実際に同定できるかどうかを検討した。シスメックス社の PSS 法による遺伝子パネル検査とは、大腸癌で変異頻度の高い 14 個の遺伝子に対する Target Sequence（ターゲットシーケンス解析）を行う検査法である（図 2）。本研究では、個々の患者の腫瘍組織（肝転移巣）を用いて、腫瘍特異的かつクロールな体細胞変異について遺伝子変異を測定した。

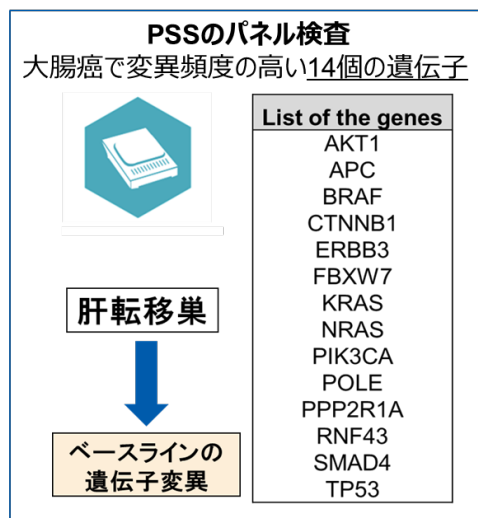


図 2 PSS の遺伝子パネル検査

3.結果

肝転移巣の組織検体（FFPE）を用いて PSS 法による遺伝子パネル検査を行い、ベースラインの遺伝子変異を測定し、遺伝子変異を有する癌関連遺伝子を 4 例すべてにおいて実際に同定することに成功した（表 1）。APC 遺伝子変異は 4 例中 3 例に認め、最も高頻度であった。その他、TP53 遺伝子変異を 4 例中 2 例に認め、PIK3CA 遺伝子変異と NRAS 遺伝子変異と SMAD4 遺伝子変異をそれぞれ 4 例中 1 例ずつに認めた。

表 1 肝転移巣の遺伝子変異

患者情報	遺伝子名 塩基配列変異 変異頻度
67 歳 男性 横行結腸癌 異時性肝転移	APC c.4037C>G 13.699% APC c.847C>T 23.37% TP53 c.742C>T 30.832%
70 歳 男性 直腸癌 同時性肝転移	APC c.4057G>T 5.515% APC c.637C>T 5.283%
78 歳 男性 直腸癌 同時性肝転移	APC c.4135G>T 16.292% APC c.904C>T 37.215% PIK3CA c.1633G>A 17.922%
45 歳 女性 S 状結腸癌 異時性肝転移	NRAS c.182A>T 42.024% SMAD4 c.1082G>A 68.634% TP53 c.422G>A 70.527%

4.考察

大腸癌の肝転移巣の組織検体を用いて PSS 法による遺伝子パネル検査を行い、ベースラインの遺伝子変異を測定し、遺伝子変異を有する癌関連遺伝子を 4 例すべてにおいて実際に同定することができた。これらの遺伝子変異は、大腸癌において高頻度に認められる変異であった。

今後計画しているパイロット研究では、根治切除可能な肝転移のみを有する大腸癌患者を対象に、リキッドバイオプシーを用いて ctDNA を検出することが、肝転移の根治切除後の再発の早期診断に有用かを探索的に検討する。

この検査システムの有用性が認められれば、今後は医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency : PMDA) への承認申請を行うための臨床試験を立案する。将来的には、個々の患者の再発リスクに応じた術後補助療法の選択的实施を評価するための臨床試験の立案も可能となる。更なる展開として、腫瘍組織検体および血液検体におけるがん関連遺伝子異常のプロファイリングをリアルタイムに明らかにすることで、個々の患者に適切な分子標的治療薬を選択できることが期待される。以上より、研究全体を通じて新しい診断・治療開発を行うことで、肝転移を有する個々の大腸癌患者に対する最適な治療方針を決定する個別化医療の実現に繋がることが期待される。

5.結語

大腸癌の肝転移巣の組織検体を用いて PSS 法による遺伝子パネル検査を行い、遺伝子変異を有する癌関連遺伝子を同定できることが明らかとなった。今後の研究計画が完遂できれば、大腸癌に対するリキッドバイオプシーを用いた個別化医療の実現に繋がることを期待できる。

6.文献

- 1) Hasegawa K, Saiura A, Takayama T, Miyagawa S, Yamamoto J, Ijichi M et al. Adjuvant Oral Uracil-Tegafur with Leucovorin for Colorectal Cancer Liver Metastases: A Randomized Controlled Trial. PLoS One. 2016; 11(9): e0162400.
- 2) Portier G, Elias D, Bouche O, Rougier P, Bosset JF, Saric J et al. Multicenter randomized trial of adjuvant fluorouracil and folinic acid compared with surgery alone after resection of colorectal liver metastases: FFCD ACHBTH AURC 9002 trial. J Clin Oncol. 2006; 24(31): 4976-4982.
- 3) Benešová L, Hálková T, Ptáčková R, Semyakina A, Menclová K, Pudil J et al. Significance of postoperative follow-up of patients with metastatic colorectal cancer using circulating tumor DNA. World J Gastroenterol. 2019; 25(48): 6939-6948.
- 4) Narayan RR, Goldman DA, Gonen M, Reichel J, Huberman KH, Raj S et al. Peripheral Circulating Tumor DNA Detection Predicts Poor Outcomes After Liver Resection for Metastatic Colorectal

Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2019; 26(6): 1824-1832.

5) Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond JA, Fowler G et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487(7407): 330-337.

6) Nakamura Y, Taniguchi H, Ikeda M, Bando H, Kato K, Morizane C et al. Clinical utility of circulating tumor DNA sequencing in advanced gastrointestinal cancer: SCRUM-Japan GI-SCREEN and GOZILA studies. *Nature Medicine*. 2020.

7) Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016; 8(346): 346ra392.

8) Tie J, Cohen JD, Wang Y, Christie M, Simons K, Lee M et al. Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol*. 2019; 5(12): 1710-1717.

9) Tie J, Cohen JD, Wang Y, Li L, Christie M, Simons K et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut*. 2019; 68(4): 663-671.