

論文内容の要旨

Analysis of colorectal cancer-related mutations by liquid biopsy: utility of circulating cell-free DNA and circulating tumor cells

リキッドバイオプシーを用いた大腸癌関連遺伝子変異の検討：血中循環DNAと血中循環腫瘍細胞の有用性

日本医科大学大学院医学研究科 消化器外科学分野

大学院生 武田幸樹

Cancer Science 掲載予定

Early View (web 掲載) 2019/9/18

【背景】

癌に対する分子標的治療や precision medicine を効果的に行うには癌の遺伝子情報を正確に把握することが重要である。大腸癌を含む固形癌では、生体組織検査が遺伝子情報を得るための標準検査とされてきた。しかし近年、腫瘍組織内の癌細胞の多様性・不均一性が注目されている。また、原発巣に認めない変異が遠隔転移巣には存在することや、抗癌剤治療の経過中に新たな変異が出現することも報告されており、リアルタイムで遺伝子情報を得ることが必要である。

繰り返し施行できるリキッドバイオプシー：血中循環 DNA(circulating cell free DNA: ccfDNA)、血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell : CTC)は癌の多様性・不均一性の解析に有用であると期待されるが、大腸癌において腫瘍組織、ccfDNA、CTC の変異情報を直接比較した報告はない。我々は大腸癌患者の腫瘍組織、血漿、CTC より DNA を抽出 (tumor tissue DNA、ccfDNA、ctcDNA) し、次世代シーケンサー(Next Generation Sequencing: NGS)とデジタル PCR(digital PCR: dPCR)を用いて変異解析を行った。

【方法】

以下の2群を対象とした。

- ① 対象は未治療の大腸癌患者。手術、または内視鏡検査にて腫瘍組織を採取。また、それぞれの患者より全血 10ml を採取し、CTC 回収装置(LiquidBiopsy[®] platform)を用いて血漿、CTC を回収。腫瘍組織、血漿、CTC のそれぞれより DNA を抽出 (tumor tissue DNA、ccfDNA、ctcDNA) した後に NGS を施行。3 検体の癌関連遺伝子変異を比較検討した。
- ② 対象は stage IV 大腸癌患者で原発巣に RAS 遺伝子変異を有するもの。全ての患者は抗癌剤治療中または治療後であった。①と同様に全血液 10ml より ccfDNA、ctcDNA を抽出。その後、dPCR を用いて ccfDNA、ctcDNA より RAS 変異が同定できるか検証した。

【結果】

- ① 対象は 34 症例(stage II: n=4, stage III: n=7, stage IV: n=23)。Tumor tissue DNA からは中央値で各患者より 1 箇所 (範囲 0-4 箇所)、計 53 箇所の変異が検出された。ccfDNA からは中央値で各患者より 1 箇所 (範囲 0-5 箇所)、計 47 箇所の変異が検出された。ctcDNA からは中央値で各患者より 0 箇所 (範囲 0-3 箇所)、計 16 箇所の変異が検出された。Tumor tissue DNA、ccfDNA、ctcDNA の 3 検体、全てで共通に検出された変異は 10 箇所であった。Tumor tissue DNA から検出さ

れた 53 箇所の変異のうち、ccfDNA からは 27 箇所(50.9%)、ctcDNA からは 11 箇所(20.8%)、同じ変異が検出できた。Tumor tissue DNA では検出されなかった変異が ccfDNA から 20 箇所、ctcDNA から 5 箇所検出された。34 例中、12 症例(35.3%)で腫瘍組織では検出されない遺伝子変異が、リキッドバイオプシーで検出された: ccfDNA から 9 症例(26.5%)、ctcDNA から 3 症例(8.8%)。

② 対象は 22 症例。全ての症例が stage IV で原発巣に *RAS* 遺伝子変異を有していた。22 症例中、ccfDNA から 14 症例(63.6%)、ctcDNA から 8 症例(36.4%)で *RAS* 変異が同定できた。ctcDNA から *RAS* 変異が同定できた 8 症例全てで ccfDNA からも *RAS* 変異が同定でき、変異率は ctcDNA に比べ ccfDNA で高かった。ccfDNA においては、CEA 高値の症例で有意差を持って *RAS* 変異の同定率が高かった ($P=0.046$)。ctcDNA においては、末期癌症例、CEA 高値の症例、CTC が多く採取できた症例、採取された CTC 数の WBC 数に対する比率が高かった症例で有意差を持って *RAS* 変異の同定率が高かった ($P=0.03$, $P=0.008$, $P=0.005$, $P=0.01$)。

【考察】

本研究により、腫瘍組織からは検出されない変異でもリキッドバイオプシーからは検出でき、リキッドバイオプシーが癌の多様性・不均一性の解析に有用であることが証明された。また、ccfDNA と ctcDNA を同時に解析することでその精度が向上することも示された。我々は CTC の採取において最も一般的な EpCAM 抗体のみを用いる方法でなく、Her2 抗体、Trop2 抗体も追加しており CTC の回収率の向上、ctcDNA からの遺伝子解析の精度向上につながったと考える。しかしながら、遺伝子解析においては、ccfDNA の方が ctcDNA より適していることが示され、CTC の回収率をより向上させる技術の発展が望まれる。