

論文内容の要旨

**Evaluation of liquid biopsies for detection of emerging
mutated genes in metastatic colorectal cancer**

リキッドバイオプシーを用いた
大腸癌肝転移における新規遺伝子変異の同定

日本医科大学大学院医学研究科 消化器外科学分野

研究生 古木 裕康

European Journal of Surgical Oncology 掲載予定

【背景と目的】

分子標的療法を行うにあたり、その標的となるがんの遺伝子変異を検出し、適応を判断することで治療成績が向上する。分子標的療法は主として転移巣を標的とするが、転移巣から腫瘍検体を採取することは困難であり、通常、原発巣から検体を採取する。遺伝子変異は、原発巣とその転移巣との間でほぼ一致するが、転移巣には原発巣にはない変異（新規遺伝子変異）が同定されることがある。

末梢血内の循環腫瘍 DNA（circulating tumor DNA (以下、ctDNA)）を用いて分子診断を行うリキッドバイプシー（Liquid Biopsy (以下、LB)）は、低侵襲で繰り返し行えることで、診断や治療選択、治療効果判定等に応用されることが期待されている。我々はこれまでに LB を用いて、大腸癌原発巣が *KRAS* 野生型であっても転移巣では *KRAS* 変異していることがあること（空間的 heterogeneity）、*KRAS* 野生型大腸癌に抗 EGFR 抗体を投与することで、転移・再発巣に *KRAS* や *BRAF* 遺伝子変異が生じること（時間的 heterogeneity）を報告してきた。しかし、*KRAS*、*BRAF* 以外の heterogeneity に関する報告はない。

本研究では、大腸癌原発巣と転移巣の空間的 heterogeneity を LB で同定することを試みた。更に空間的 heterogeneity を同定するにあたり、次世代シーケンシング（Next-Generation Sequencing (以下、NGS)）とデジタル PCR（digital PCR (以下、dPCR)）の精度を比較した。

【方法】

対象は同時性または異時性肝転移を有する 22 例の大腸癌患者である。原発巣および肝転移巣の凍結組織から DNA を抽出し、肝切除前に採取した血漿から ctDNA を抽出した。これら 3 種類の検体を用いて、Cancer Hotspot Panel v2 を用いた NGS と dPCR を実施して体細胞変異を検出し、原発巣にはなく、肝転移巣にのみ存在する新規遺伝子変異を同定できるかを検討した。

【結果】

7 例が同時性転移、15 例が異時性転移であった。各症例から中央値 151.0ng/mL の血中遊離 DNA（cell-free DNA）を採取した。

NGS において、22 例から 7 遺伝子 23 種 36 個の体細胞変異を検出した。最も頻度が高かったのは *TP53* であり、次いで *KRAS*、*APC*、*PIK3CA*、*BRAF*、*FBXW7*、*NRAS* の順であった。原発巣で 32 個、肝転移巣で 35 個、ctDNA で 23 個の変異が検出され、このうち 21 個は 3 種類の検体全てから検出したが、13 個の変異は

原発巣と転移巣から検出されたにも関わらず ctDNA からは検出されなかった。2 例から 4 個の原発巣にはなく肝転移巣のみから同定された新規遺伝子変異があり、そのうち 2 個は ctDNA から検出された。

dPCR においても、7 遺伝子 23 種 36 個の体細胞変異を同定した。原発巣で 32 個、肝転移巣で 36 個、ctDNA で 32 個の変異が同定され、このうち 28 個は 3 種類の検体全てから同定されたが、4 個の変異は原発巣と肝転移巣で同定されたにも関わらず ctDNA では同定されなかった。2 例から 4 個の新規遺伝子変異があり、その全てが ctDNA から検出された。

NGS と dPCR を比較すると、肝転移巣に存在した変異の ctDNA による同定率（感度）は NGS が 64%、dPCR が 89% と dPCR で有意に高かった ($P=0.02$)。特異度はともに 100% であり、ctDNA で同定された変異は全て肝転移巣に存在した。

【考察】

本研究では、大腸癌原発巣と肝転移巣の凍結標本と ctDNA を用いて 2 つの重要な点を明らかにした。すなわち、肝転移巣には原発巣にはない新規遺伝子変異が存在し、その変異は LB を用いて検出することができる。また、新規遺伝子変異を LB で検出する時の感度は NGS よりも dPCR の方が良好である。

これまでの多くの研究が原発巣と転移巣の遺伝子プロファイルは相関性が高いことを報告している。しかし、これまでの我々の研究および本研究においても約 10% の症例で転移巣には原発巣にない変異があることが示された。これらの変異は LB で検出可能であり、LB で検出された変異は原発巣から検出されなくても転移巣に存在する可能性が高いことが示された。LB は繰り返し行なえるため、更に感度を向上させられる可能性がある。

本研究は単施設の少数例に、代表的な 50 遺伝子を対象としているという限界がある。一方でこれまでの研究とは異なり、全て凍結標本を用いている（ホルマリン標本では NGS の精度が低下する）点が優れている。

【結論】

大腸癌肝転移巣には原発巣にない新規遺伝子変異が存在し、この変異は LB を用いて検出することができるが NGS と比較すると dPCR の方が感度良好である。