

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Detection of *KRAS* mutations in circulating tumour DNA from plasma and urine of patients with colorectal cancer

大腸癌患者の血漿および尿中循環腫瘍 DNA における *KRAS* 遺伝子変異の検出

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 太田 竜
European Journal of Surgical Oncology 掲載予定

リキッドバイオプシーはがん患者の体液から採取したバイオマーカーの総称で、主に血液中の循環腫瘍 DNA（以下、ctDNA）から遺伝情報を獲得する方法である。腫瘍組織採取は不要であり、低侵襲かつリアルタイムで腫瘍の早期発見や予後予測のみならず、化学療法の効果判定や治療効果のモニタリングとして有用である。リキッドバイオプシーは一般に血液が頻用されているが、最近血液以外の体液における解析がすすめられている。尿を用いたリキッドバイオプシーは泌尿器腫瘍から導入され、近年膀胱癌や肺癌等にも応用され始めたが、大腸癌においては少数例の報告が散見されるのみである。本研究では、非侵襲的な尿中 ctDNA を用いた大腸癌における *KRAS* 遺伝子変異の解析を行い、その有用性について検討した。

2018年8月から2020年7月までの期間に当科で原発巣または転移巣切除を行った大腸癌において、血漿、尿、腫瘍組織それぞれから DNA 抽出が可能であった症例を対象とした。血漿 ctDNA および尿中 ctDNA の濃度差を Stage 別に検証した。また抽出した各 DNA の *KRAS* 遺伝子変異を digital PCR を用いて解析し、腫瘍組織 *KRAS* 遺伝子変異例に対する血漿 ctDNA および尿中 ctDNA の感度や特異度とともに Stage 別の差異について比較検討した。

対象症例は 200 例で、男性 119 例、女性 81 例、年齢中央値は 71 歳であった。病期は Stage I: 28 例、Stage II: 52 例、Stage III: 73 例、Stage IV: 47 例であった。

結果は、血漿と比較して有意に尿で ctDNA が低濃度であった(112 ng/ml vs. 29 ng/ml, $P<0.01$)。Stage 別に ctDNA 濃度を比較すると、血漿 ctDNA 濃度は Stage 依存的に上昇したが、尿中 ctDNA では一定の傾向は認められなかった。

exon-2 領域の *KRAS* 遺伝子変異 primer を用いて digital PCR を行ったところ、腫瘍組織 DNA の 84 例 (42.0%) に *KRAS* 遺伝子変異が同定された。腫瘍組織 *KRAS* 遺伝子変異例において、血漿 ctDNA の *KRAS* 遺伝子変異同定感度、特異度、正確度はそれぞれ 29.8%、94.8%、67.5%、尿中 ctDNA は 33.3%、93.1%、68.0%であった。Stage 別に検討すると、Stage I-III での感度

は、血漿 ctDNA 21.3%、尿中 ctDNA 37.7%であり、有意に尿中 ctDNA の感度が良好であった ($P<0.05$)。一方、StageIVでは血漿 ctDNA 52.2%、尿中 ctDNA 21.7%と血漿 ctDNA で感度が良好な傾向を示したが有意差は認められなかった。

血漿 ctDNA と尿中 ctDNA を統合した解析によると、*KRAS* 遺伝子変異同定感度は 53.6% となり有意に上昇した。また腫瘍組織 DNA から *KRAS* 遺伝子変異が同定されなかった 116 例中、12 例 (10.3%) で血漿または尿中 ctDNA で *KRAS* 遺伝子変異が同定され、それぞれ血漿 ctDNA のみ 4 例、尿中 ctDNA のみ 6 例、血漿および尿中 ctDNA 2 例であった。

本研究より新規有用な 3 つの知見を得ることができた。1) 大腸癌における *KRAS* 遺伝子解析において、尿中 ctDNA は血漿 ctDNA と同等の解析が可能であった。尿中 ctDNA は血漿 ctDNA より低濃度であったが、その感度は良好であった。尿を用いたリキッドバイオプシーは血液採取を伴う血漿を用いるよりもさらに低侵襲であり、血液採取が困難な高齢者や貧血患者においても有用な解析法であると考えられた。2) 尿中 ctDNA と血漿 ctDNA の統合解析により *KRAS* 遺伝子変異同定感度が上昇した。尿中 ctDNA 解析を併施することにより、従来問題となっていた血漿 ctDNA 検出感度の低下を改善する手法と考えられた。3) 尿中 ctDNA は血漿 ctDNA とともに腫瘍組織で同定不能な遺伝子変異の検出に有用であった。リキッドバイオプシーは腫瘍組織から同定できない heterogeneity をリアルタイムに反復して取得することが可能であり、さらには本研究において尿中 ctDNA は血漿 ctDNA でも同定できない遺伝子変異が検出可能であり有用と考えられた。

二次審査においては、Stage 別における尿中 ctDNA と血漿 ctDNA 濃度の差に関する質問、StageIV における尿中 ctDNA の感度が低い理由、尿採取のタイミング、尿中 ctDNA の臨床応用に関する質問等があったが、何れの質問に対しても簡潔明瞭的確に回答された。今後は大腸癌以外の悪性腫瘍においても検証する予定であるとの事であった。

本研究は、尿中 ctDNA は非侵襲的に血漿 ctDNA と同等の解析が可能であり、血漿 ctDNA との統合解析にてより感度が上昇し、腫瘍組織では同定不能な heterogeneity を検出することが可能であることを証明した重要な研究であることが確認された。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。