

## 第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

### *BRAF* V600E mutations in right-side colon cancer: Heterogeneity detected by liquid biopsy

リキッドバイオプシーによる Heterogeneity 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  
大学院生 上田 康二  
European Journal of Surgical Oncology 掲載予定

*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を有する転移性結腸直腸癌患者の予後は通常不良である。*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異は、結腸直腸癌の西洋人患者の 10%以上に存在し、日本人患者の 6.0~6.5%に存在するとされる。しかし、変異頻度が右側結腸癌に多いという報告もあり、その頻度は明らかではない。*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異のある患者の治療戦略は、変異のない患者とは異なることから、腫瘍の特徴を知ることは重要である。リキッドバイオプシーは、血液中の無細胞 DNA (cfDNA) を使用することで Heterogeneity の解析に有用である。リキッドバイオプシーを使用して *RAS* 変異を検出する多くの研究が報告されているが、結腸直腸癌の患者で *BRAF*<sup>V600E</sup> を検出するための研究はほとんどない。本研究では右側結腸癌における *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異頻度を検討し、リキッドバイオプシーを使用して *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異の検出率を決定し、*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異の Heterogeneity について検討した。

2015 年 4 月から 2020 年 3 月に日本医科大学と埼玉医科大学で原発腫瘍が切除された右側結腸癌（盲腸、上行結腸、横行結腸）の患者を対象とした。腫瘍組織より DNA を、術前血漿より cfDNA を抽出した。それぞれの DNA サンプルに *BRAF*<sup>V600E</sup> probe を用いて ddPCR を実施しそれぞれの変異検出率の比較を行った。

右側結腸癌 215 人を対象とし、171 人の患者が治癒的結腸手術を受け、12 人の患者が治癒的結腸手術と肝臓転移切除を受け、32 人の患者が緩和手術を受けた。組織から *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異は、215 例中 35 例（ステージ I:3、ステージ II:19、ステージ III:7、ステージ IV:6）で検出された。また、盲腸癌の患者 58 例中 13 例（22.4%）、上行結腸癌の患者 90 例中 16 例（17.8%）、横行結腸癌の患者 67 例中 6 例（9.0%）で検出された。また、215 例中 10 例（4.7%）の血漿より *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異が検出された。10 例中 8 例（ステージ II:2、ステージ III:1、ステージ IV:5）は、原発腫瘍に *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を認めたが、2 例（両方ともステージ IV）では検出されなかった。*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を検出するためのリキッドバイオプシーの感度は、全症例で 22.8%、ステージ I-III で 10.3% (3/29)、ステージ IV で

83.3% (5/6) であり、ステージ IV の検出率はステージ I-III の検出率よりも有意に高かった。組織で *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異がないステージ I-III 症例は、血漿で *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を認めなかった。一方、組織で *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異がない 38 例中 2 例 (5.3%) のステージ IV 症例で、血漿に *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を認めた。

全症例を対象とすると、組織の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異は Overall survival(OS)に影響を与えなかった一方で、血漿中に *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を有すると、OS が低下した。また、ステージ I-III の患者では、組織の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異は Relapse free survival(RFS)、OS ともに影響を与えなかったが、血漿中の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異は、RFS には影響を与えなかったが、OS を低下させた。ステージ IV の患者では、組織の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異は OS に影響しなかったが、血漿の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異は OS を低下させた。

本研究では、3つの重要な点を明らかにした。第一に、日本人集団における右側結腸癌の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異頻度は低くはなく、腫瘍の位置によって異なった。第二に、血漿中の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異の検出率は、ステージ I-III の患者よりもステージ IV の患者の方が高く、*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を血漿中に有する症例の予後は悪かった。第三に、*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異においても heterogeneity の存在が示された。

血漿中の *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を有する患者の予後は、組織でのみ検出される *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異を有する患者よりも悪く、リキッドバイオプシーを使用した *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異の検出は、結腸直腸癌の患者にとって大きなメリットがあると考えられる。

二次審査において、*BRAF*<sup>V600E</sup> 変異症例に対する実臨床での治療方針や病理学的視点からの *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異の関係性、今後の臨床におけるリキッドバイオプシーの展望について等の質問があったが、何れの質問に対しても簡潔明瞭的確に回答された。現在リキッドバイオプシーは少しずつ臨床応用されてきているが、まだ制限のある中での使用であり、従来の組織を用いた遺伝子検査が主要である。リキッドバイオプシーの重要性を示し、臨床応用されるために、今後も症例を蓄積するとの事であった。

本研究は、右側結腸では予後不良である *BRAF*<sup>V600E</sup> 変異の頻度が高く、リキッドバイオプシーで評価することで予後予測が可能であり、Heterogeneity を検出することも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。