

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 杉森 慎

横浜市立大学大学院医学研究科 消化器内科学

## 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 中島 秀明

副査 横浜市立大学大学院医学研究科准教授 三宅 紀子

副査 横浜市立大学大学院医学研究科講師 仙石 徹

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy

(化学療法施行中の進行膵癌患者における腫瘍由来血中遊離遺伝子の定量的モニタリング)

背景・目的：膵癌は解剖学的な複雑さも相まり、診断時には手術適応のない進行例であるケースが数多く見受けられる。これまでに FOLFIRINOX や GEM + nab-PTX 等の化学療法レジメンが開発されてきたが、生存期間中央値は膵癌で 7-11 か月程度と未だ極めて予後不良の難治癌である。近年、次世代型シーケンサー (Next-generation sequencer, 以後 NGS) 等のゲノム解析技術の進歩によって大規模な癌ゲノム解析が可能となり、さらに今後は症例毎の癌ゲノムデータを基にしたゲノム医療の実践が喫緊の課題となりつつある。

腫瘍由来血中遊離遺伝子 (circulating tumor DNA; 以後 ctDNA) は腫瘍内の変異遺伝子の簡便な入手ソースとして注目されてきたが、化学療法施行中の動態については未だ不明点が多く、バイオマーカーとしての有用性を持つのかどうかは不明である。これまでの大規模なゲノム解析の結果、膵癌の 90%超は *KRAS* codon12, 13 領域の変異を有し、比較的同一のドライバー変異を有する癌種であることが明らかとなっている。そこで本研究では、進行膵癌症例の診断時から化学療法施行過程における ctDNA 中の *KRAS* 変異遺伝子を、digital PCR を用いて経時的に定量的なモニタリングを行い、そのバイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とした。

材料と方法：膵癌 47 症例の超音波内視鏡下生検 (Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration, 以後 EUS-FNA) 検体、および診断時の血清検体より DNA, および ctDNA を抽出し、*KRAS* codon12, 13 変異の有無を digital PCR にて検討を行った。*KRAS* codon12, 13 変異を検出しなかった EUS-FNA 組織由来 DNA 検体に対しては NGS 解析を行った。そのうち化学療法を実施された 21 症例については、 $6 \pm 2$  週毎の血清検体より同様に ctDNA を抽出し、digital PCR を用いて変異検出割合の定量的モニタリングを実施した。

結果：まず EUS-FNA 組織検体の解析では 47 症例中 45 症例では digital PCR による解析で *KRAS* codon12, 13 変異を検出した。続く非検出例 2 症例に対して行った NGS 解析では各々、*KRAS* Q61K 変異と *NRAS* Q61R 変異をドライバー変異として検出した。診断時の血清検体より抽出した ctDNA の解析では、EUS-FNA 組織検体の解析で *KRAS* codon12, 13 変異を検出した 45 症例中 23 症例において *KRAS* codon12, 13 変異を検出し、その内訳は、肺及び肝転

移症例：18/19 症例（変異検出割合：0.1- 31.7%），腹膜播種症例：3/9 症例（変異検出割合：いずれも 0.1%），局所進行症例：2/17 症例（変異検出割合：0.1-0.2%）であり，肺及び肝転移症例は腹膜播種症例及び局所進行症例に比して有意に高い *KRAS* codon12, 13 変異検出割合を示した．化学療法実施中の 6±2 週毎のモニタリングは，*KRAS* codon12, 13 変異症例 20 例と *NRAS* Q61R 変異症例 1 例に対して行われ，いずれの症例も概ね病勢に一致した変異検出割合の推移が観察された．診断時血清由来 ctDNA において *KRAS* codon12, 13 変異を検出しなかった局所進行症例 6 例は，肝転移出現による病勢増悪を認めたタイミングに一致して ctDNA 中の *KRAS* codon12, 13 変異を検出した．診断時血清由来 ctDNA において *KRAS* codon12, 13 変異が検出された肺及び肝転移症例 6 例は，部分奏功ないし安定と判定された期間内においては ctDNA 中の *KRAS* codon12, 13 変異は消失しており，肝転移出現による病勢増悪を認めたタイミングに一致して ctDNA 中の *KRAS* codon12, 13 変異を再度検出した．さらに，診断時血清由来 ctDNA において *KRAS* codon12, 13 変異が検出された症例症例群において，化学療法 1 コース施行後に ctDNA 中の *KRAS* codon12, 13 変異が消失した症例群は，消失しなかった症例群に比して有意に良好な 1 次化学療法の無増悪生存期間を認めた（各中央値：248.5 日 vs. 50 日， $P < 0.001$ ）．

考察：digital PCR と NGS を用いた解析により，症例毎のドライバー変異を効率的に同定可能であった．ctDNA 中のドライバー変異の検出は，肺及び肝臓転移例で高率に検出可能であったが，腹膜播種例や局所進行例では低率であった．同定したドライバー変異の定量的モニタリングは病勢把握に有用で，肺及び肝臓転移出現時や肺及び肝臓転移巣の増大時に ctDNA 中のドライバー変異を検出可能であった．また化学療法中の ctDNA 中のドライバー変異の消失は化学療法の奏功予測因子の一つであると考えられた．

審査にあたり，申請者より上記内容のプレゼンテーションが行われた後，以下の質疑応答がなされた．

まず三宅 紀子先生（副査）より以下の論評と質問がなされた．

- 1) “ctDNA”と表現されている DNA 検体は，血清中の cell free DNA と同義か？
- 2) 化学療法中の血清検体を採取するタイミングでの差異が生じる可能性はないか？

これらの論評と質問に対し，以下の回答がなされた．

- 1) 今回の検討では，血清検体を 15,000rpm で遠心し，エッペンチューブ底に形成された細胞集団のペレットを除去した上清より DNA を抽出した．おそらくは末梢血単核球や正常細胞由来の DNA も含まれており，厳密には，「cell free DNA

中の ctDNA を解析した」，とする表現が的確と考えるが，慣例的に“ctDNA”と記述されている論文も散見されることから，本論文では“ctDNA”と表現した。

- 2) 殺細胞性の抗癌剤であり，おそらくは化学療法実施直後には壊死細胞由来の DNA が増加していることが予想され，実際，肝細胞癌の動注療法の前後では ctDNA が増加することが報告されている．本研究での血清検体のサンプリングのタイミングは，化学療法の各コース開始直前の採血検査のタイミングであった．主に化学療法のレジメンは 4 投 2 休であるが，いずれのサンプリングのタイミングも休薬期間後である．さらに体内を循環する DNA の半減期は数時間とされており，おそらくはプラトーに達したタイミングでのサンプリングがなされていると考えられる．

次に仙石 徹先生（副査）より以下の論評と質問がなされた。

- 1) KRAS は他の RAS 分子に比して膵臓での発現量が高いか？
- 2) KRAS codon 12/13 の各変異のパターンの頻度や悪性度に差はあるか？

これらの論評と質問に対し，以下の回答がなされた。

- 1) 自験例ではなく，公開されているデータベース Human protein atlas(<https://www.proteinatlas.org>)に基づく，KRAS, NRAS, HRAS 共に，消化管組織を初めとして，全身の臓器に広く発現を認めている．膵臓特異的に発現量が高い遺伝子ではない。
- 2) KRAS G12D, G12V, G12R の順に多く，G12V が特に予後不良との報告が存在する．今回の検討では，KRAS codon 12, 13 領域の変異をスクリーニングタイプのプロトコルで検出しており，各変異型での検討は行っていない。

最後に中島 秀明先生（主査）より以下の論評と質問がなされた。

- 1) 実臨床へどのように応用・還元していくか？
- 2) 今後，どのように研究を展開していくか？

これらの論評と質問に対し，以下の回答がなされた。

- 1) 診断時の ctDNA の検討では，他臓器転移を有する症例で高率に KRAS 変異を検出したことから，外科的切除が検討される症例において，ctDNA 中の KRAS 変異の有無を確認し，CT オカルトな転移巣がないかを確認する必要性が挙げられる．また，今回の検討で，化学療法 1 コース施行後の ctDNA 中の KRAS 変異の検出の消失は，化学療法奏功の予測因子であると考えられた．サンプリングのタイミ

ングは、更なる検討を要するが、より早期に化学療法へのレスポンスを判定できる可能性がある。モニタリング中における KRAS 変異の再検出は、他臓器転移の出現予測因子と考えられたが、再検出を認めたタイミングで、早期の CT 撮影・RECIST 判定を行うことにより、早期の PD 判定・レジメン変更が可能になる可能性が挙げられる。ただし、膵癌に対する化学療法のレジメンは限られていることから、早期のレジメン変更が必ずしも OS を改善できるとは限らないと考える。

- 2) 今回の検討では、局所進行例や腹膜播種例においては ctDNA 中の KRAS 変異の検出は困難で、他臓器転移を有する症例でしか十分に ctDNA 中の KRAS 変異を検出出来なかった。この現象は、おそらくは体内での DNA のクリアランスによる影響を考えている。すなわち、血中の DNA は肝及び腎でクリアランスされることが知られており、局所進行例や腹膜播種例において血中へ放出された腫瘍由来 DNA を、肝を経た後の末梢血で検出するのは困難であると予想される。ただし、こうした存在頻度の極めて低い DNA についても、バーコーディングシステムを用いた NGS により検出が可能になる可能性が考えられ、今後、より詳細な ctDNA の動態が明らかになるものと考えている。

また、化学療法施行後の ctDNA を NGS にて解析することで、薬剤耐性や腫瘍増悪に係る progressor 変異を同定出来る可能性が考えられる。今回のコホートにおいて、残検体を用いて検討を開始しているが、一症例では化学療法施行後の ctDNA 中に SMAD4 の病的変異の新規出現を認めた。実臨床において、治療後の組織検体の研究目的の採取は極めて困難であるが、ctDNA 検体を代用することで、研究の進展が期待できる。

本学位論文は膵癌の化学療法施行過程における ctDNA のバイオマーカーとしての有用性を明らかにした点で、学術的価値を有する研究と判断された。

本研究で得られた知見は、当該分野の発展に貢献したと評価し、医学博士を授与されるに相当すると判定した。