

# 血中遊離遺伝子を用いた膵癌化学療法中の遺伝子変化の解析

横浜市立大学附属市民総合医療センター  
がんゲノム診療科・ゲノム検査部・消化器病センター内科

杉 森 慎

## I 要 旨

膵癌の大多数は、ドライバー変異として *KRAS* 変異 (頻度約 91%) を有することが知られ、その体細胞変異の背景は比較的均一な癌種であると言える。しかしながら、患者毎で化学療法に対する薬剤感受性は大きく異なるとともに、化学療法が不応となるターニングポイントの変化は劇的で、その耐性化機序の解明と検出は極めて重要であると考えられる。本研究課題では、診断時の生検組織検体、化学療法施行中の経時的な血液検体を用いて膵癌化学療法中に生じる遺伝子変化を解明し、治療効果予測マーカーの同定や、薬剤耐性化機序の解明を試みた。cf-DNA 中の *KRAS* 変異の MAF 値が上昇を示したタイミングの 20 検体 (8 症例) に対して NGS 解析を行った結果、digital PCR での *KRAS* 変異の変異検出値が 0.7% 以上であった 14/20 検体については NGS での変異検出が可能で、変異検出値は概ねの相関を示した。3 症例では、最終レジメンに不応となったタイミングで新規の病的変異の出現を認めた。

## II 目 的

膵癌は、解剖学的な複雑さも相まって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。進行膵癌に対して FOLFIRNOX (FFX) 療法や Gemcitabine + nab-Paclitaxel (GnP) 療法等の化学療法レジメンが開発され、一定の成果を上げつつある

が、その生存期間中央値は 7-11 ヶ月程度で、未だ極めて予後不良な難治癌である。これまでに膵癌の大規模な網羅的遺伝子解析の結果、その遺伝子変異は *KRAS* (頻度約 91%)、*TP53* (約 60%)、*SMAD4* (約 22%)、*CDKN2A* (約 14%) に集約され、大多数において Driver 変異として *KRAS* 変異を有することが示されてきた。*KRAS* G12C 変異例に対しては新規阻害薬の有用性が期待されているものの、多勢を占める *KRAS* 変異症例に対して未だ有効な分子標的薬は存在せず、進行膵癌に対する治療は困難を極めている。

将来的には *KRAS* 変異を標的とした新規分子標的薬の開発が必要不可欠であるが、既存の化学療法レジメンの有効活用を図ることが実臨床上で早急に求められる責務であり、より効果的な治療効果を予測する因子の同定、及び、薬剤耐性化機序の解明は極めて重要である。本研究課題では、診断時の生検組織検体、化学療法施行中の経時的な腫瘍由来血中遊離遺伝子 (circulating tumor DNA: ct-DNA) に対して、遺伝子変異解析を実施し、治療効果予測マーカーの同定や、薬剤耐性化機序の解明を試みることを目的とした。

## III 方 法

### (1) 対象症例・検体収集

横浜市立大学附属市民総合医療センターにて、生検組織診断にて膵癌と病理診断され、後述の digital PCR による *KRAS* 変異検出解析で

*KRAS* 変異が確認された 20 症例（男性 14 例、女性 6 例）を対象に、化学療法施行中の約 6 週毎の経時的な血液検体を収集した。なお、血液検体は通常の診療内での採血検査機会に、末梢血約 10ml を収集した。なお、本学倫理委員会の承認を得た観察研究に基づき、説明・同意取得を得て実施された。

## (2) 試料の保存及び DNA の抽出

生検検体は採取後、RNAlater<sup>®</sup> (#AM7021, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 中でクライオチューブにて -80 度で凍結保存されたものを QIAamp DNA Mini Kit (#51304, Qiagen, Hilden, Germany) を用いて同キットの推奨プロトコールに従って DNA を抽出した。簡単には、組織検体をプロテインキナーゼ K を添加した溶解バッファ中で 56 度にてインキュベート、溶解した後にカラム精製を行い、Low TE バッファにて溶出を行った。

血清検体は、通常の生化学項目の臨床検査に用いられる採血管 (Venoject II, VP-AS109K50, テルモ、Japan) に回収された血液検体を約 30 分間室温に静置し、3000rpm にて 10 分間遠心分離を行い、血清分画を分離したものを -80 度にて保存した。血中遊離遺伝子 (cell free DNA: cf-DNA) 抽出時には氷上にて溶解後、15000rpm にて 10 分間遠心分離を行って上清を回収し、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (#55114, Qiagen) を用いて同キットの推奨プロトコールに従って DNA を抽出した。簡単には、キャリア RNA とプロテインキナーゼ K を添加した溶解バッファ中で 60 度にて 30 分間インキュベート後、カラム精製を行い、Low TE バッファにて溶出を行った。

得られた DNA は Qubit dsDNA HS Kit (#Q33231, Thermo Fisher Scientific) を用いて Qubit 3.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific) で濃度測定を行った。

## (3) digital PCR による *KRAS* 変異検出解析

生検組織検体由来 DNA 及び cfDNA の *KRAS* codon12、13 変異解析には LBx Probe for *KRAS* G12/13 (A183, Riken Genesis) と ddPCR<sup>™</sup> Supermix for Probes (No dUTP) (#1863024, Bio-Rad) を用いて 40 サイクルの PCR 増幅を行い、QX200 (Bio-Rad) にて測定し、Quanta Soft software (Bio-Rad) にて解析を行い、変異検出割合 (mutation allele frequency (MAF)) を算出し、ct-DNA の定量的モニタリングを行った。なお、事前に癌細胞株由来 DNA の希釈系列を用いて検討を行い、本検出系における *KRAS* 変異検出限界は 0.1% とした。

## (4) NGS 解析

digital PCR による *KRAS* 変異検出解析を行った結果、cf-DNA 中の *KRAS* 変異の MAF 値が上昇を示した 20 検体 (8 症例) に対しては NGS 解析を行った。NGS 解析にはターゲットシーケンスパネルとして Ion Ampli-seq Cancer Hotspot Panel v. 2 (#20019161, Illumina, CA, USA) を用いて PCR によるアンプリコン増幅を行い、検体識別のための index 配列を付加し、iSeq100 system (Illumina) にてシーケンスを行った。得られたデータは BaseSpace Sequence Hub<sup>®</sup> software (Illumina) を用いて変異解析を実施した。変異の検出基準としては、Coverage >500、Allele Coverage >5 を満たしたもののうち、アミノ酸配列変化をきたし、Clin Var (NIH, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) にて病的と分類されているものを抽出した。また、必要に応じて診断時の生検組織検体由来 DNA に対しても同様の NGS 解析を追加で実施した。

## IV 結 果

## (1) 診断時 cf-DNA における digital PCR による KRAS 変異検出解析

Table 1 に本研究の対象とした膵癌 20 症例の性別、年齢、病期、診断時腫瘍マーカー値 (CEA, CA19-9)、digital PCR による KRAS 変

異検出解析結果を示す。診断時 cf-DNA 検体において digital PCR で KRAS 変異が検出されたのは、Ⅱ B 期：0/1 例、Ⅲ期：2/7 例、Ⅳ期：11/12 例で、KRAS 変異検出値はⅢ期での検出例に比して、Ⅳ期での検出例で高値の傾向を示した。

〈Table 1〉

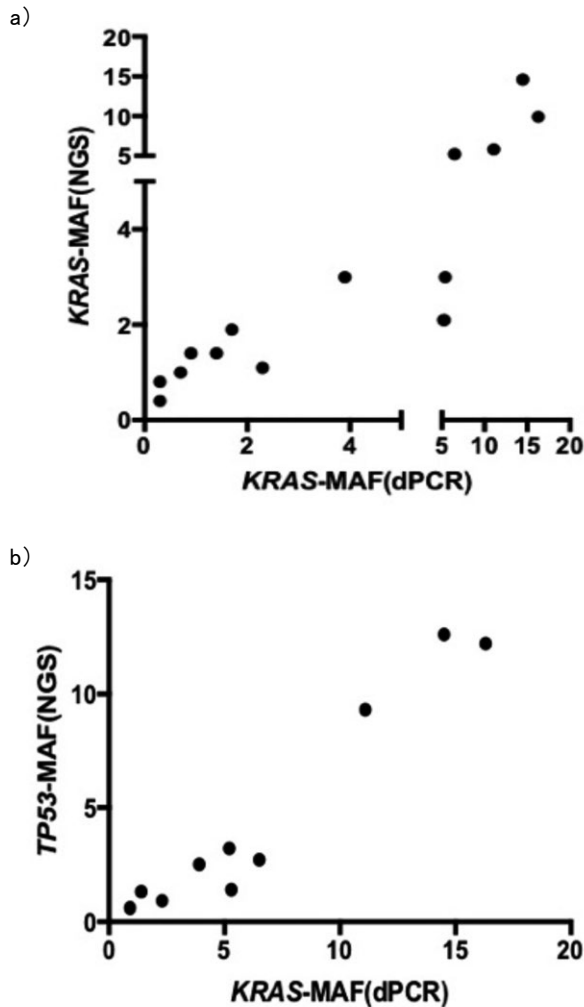
症例 #.	性別	年齢	UICC (7th.)	Stage	診断時 CEA (ng/ml)	診断時 CA19-9 (U/ml)	組織検体由来 DNA における Digital PCR での KRAS 変異検出の有無	診断時 cf-DNA 検体における Digital PCR での KRAS 変異検出割合 (:MAF) (%)
1	女	57	T3N1M0	Ⅱ B	13.4	294	+	0.0
2	男	72	T4NOM0	Ⅲ	0.4	58	+	0.0
3	女	64	T4NOM0	Ⅲ	3.4	685	+	0.0
4	男	68	T4NOM0	Ⅲ	5.4	157	+	0.0
5	女	65	T4N1M0	Ⅲ	9.5	14485	+	0.0
6	男	71	T4NOM0	Ⅲ	5.5	9	+	0.0
7	男	77	T4N1M0	Ⅲ	5.6	1	+	0.1
8	男	57	T4N1M0	Ⅲ	41.4	1026	+	0.2
9	男	74	T2N1M1	Ⅳ	4.1	623	+	0.0
10	女	62	T4N1M1	Ⅳ	2.1	545	+	0.1
11	女	74	T3N1M1	Ⅳ	7.7	33947	+	5.2
12	男	42	T4NXM1	Ⅳ	11.1	5308	+	0.1
13	男	71	T3N1M1	Ⅳ	39.2	5129	+	0.2
14	女	59	T4N1M1	Ⅳ	59.9	394500	+	14.5
15	男	70	T3N1M1	Ⅳ	6.5	3352	+	3.9
16	男	60	T2N1M1	Ⅳ	8.8	1154	+	3.3
17	男	78	T4N1M1	Ⅳ	648.9	3768	+	0.4
18	男	77	T4NOM1	Ⅳ	3.7	352	+	0.1
19	男	63	T3NOM1	Ⅳ	9.0	2	+	0.6
20	男	57	T3N1M1	Ⅳ	9.6	74	+	0.1

(2) cf-DNA に対する NGS 解析

digital PCR による *KRAS* 変異検出解析を行った結果、cf-DNA 中の *KRAS* 変異の MAF 値が上昇を示したタイミングの 20 検体（8 症例）に対して、Ion Ampli-seq Cancer Hotspot Panel v. 2 による NGS 解析を行った。結果、NGS 解析においても 14/20 検体で *KRAS* 変異を検出し、digital PCR での *KRAS* 変異の MAF 値が 0.7% 以上の検体については NGS での変異検出が可能であった。また、10/20 検体で *TP53* 変異を検出した。digital PCR で検出した

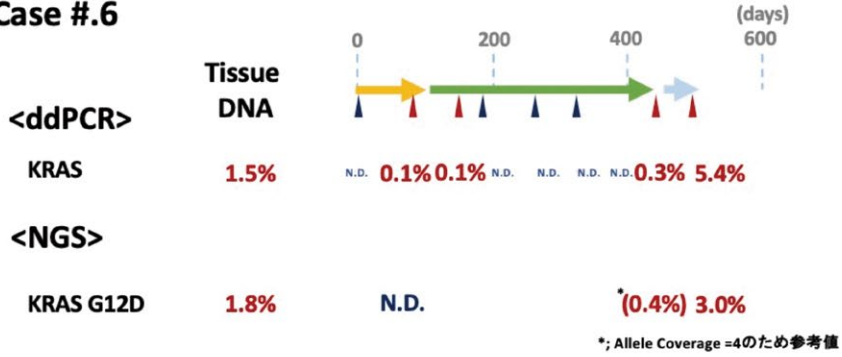
*KRAS* 変異検出の MAF 値と、NGS で検出した *KRAS* 変異、及び *TP53* 変異の MAF 値は、各々、概ねの相関を示した (Figure 1)。3 症例で、新規の病的変異の出現を認め、いずれも最終レジメンに不応となったタイミングで、各々、APC A1107V、APC S1465Wfs、SMAD4 S504R を検出した。なお、上記以外の病的遺伝子変化は検出されなかった。抜粋した 3 症例について、digital PCR で検出した *KRAS* 変異検出の MAF 値と、NGS で検出した変異検出の MAF 値の推移を Figure 2 に示す。

(Figure. 1)

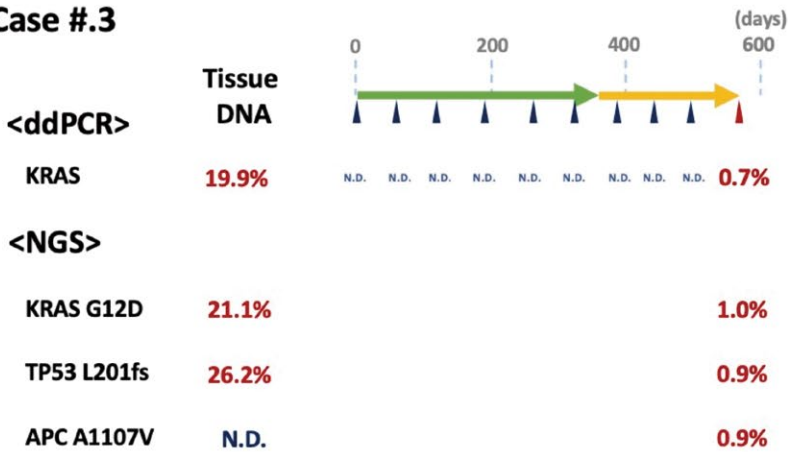


<Figure. 2>

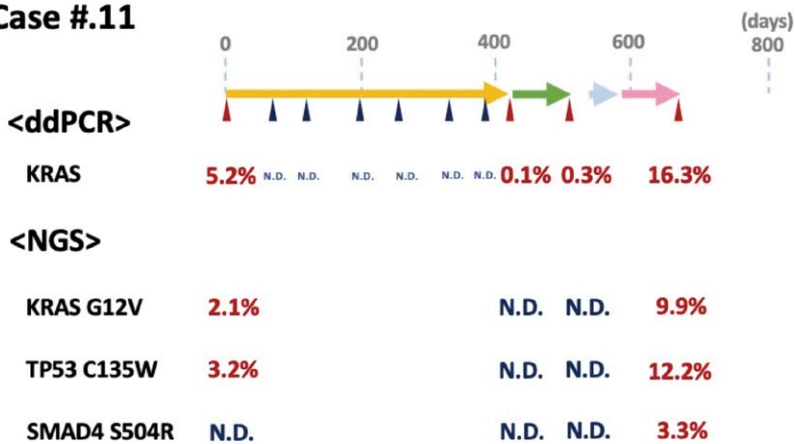
**Case #.6**



**Case #.3**



**Case #.11**



➡ Gem + nab-PTX   
 ➡ modified FFX   
 ➡ Gem + S1   
 ➡ S1  
 N.D.: not detected

## V 考 査

切除不能進行膀胱癌に対する化学療法開発、並びに薬剤耐性化研究が困難を極める最大の要因は、癌種特異的特徴に端を発するのみならず、既存の多くの研究は切除検体や診断時生検検体を用いて行われ、化学療法後の腫瘍組織解析を紐付けした検討が不足してきた点が挙げられる。実臨床において化学療法不応となった進行担癌患者から、再度の腫瘍組織検体の採取機会が得られないことにある。近年、cf-DNAをはじめとして、非侵襲的に腫瘍の存在診断・解析を行うリキッドバイオプシーの概念・解析技術が確立され、その解決の一端を覗かせつつある。cf-DNAは、1) 収量の少なさ、2) 180bp程度に断片化を受けていること、3) 多くの正常細胞由来のDNAの混入を免れ得ず、低頻度変異とPCRエラー及びシーケンスエラーの鑑別は困難である等の特徴があり、NGSでの変異解析には技術的な困難を伴う。近年では、分子バーコード技術を用いたdeep target sequencing技術によって解析エラーを選別して低頻度変異を検出する検査系も登場してきた現状にあるが、本研究ではshort ampliconサイズのパネル(ampliconサイズ: 111-187bp、平均154bp)を用い、digital PCR解析でのcf-DNA中の*KRAS*変異のMAF値を指標としてNGS解析を行なった。結果、digital PCRで0.7%以上の*KRAS*変異を検出したサンプルにおいてはNGS解析が可能であることが確認され、そのMAF値はdigital PCRにおける*KRAS*変異のMAF値と同様の挙動を示した。また、経時的cf-DNA検体で解析を行う中で、化学療法後不応時には新規に*APC*や*SMAD4*の病的変異の出現を認めるケースを見出した。このようにdigital PCRを用いて比較的簡便かつ正確にcf-DNA中の*KRAS*変異の存在頻度を測定することで、適切なタイミングでNGS解析が可能であることが示唆された。

今後、化学療法施行前後の遺伝子変化を解析・統合することで治療効果や薬剤耐性化マーカーを同定し、更には、同定された遺伝子変化が薬剤抵抗性獲得に係る責任性の有無や、その詳細な機序の解明が期待される。

## VI 結 語

*KRAS*変異を有する進行膀胱癌症例の、化学療法中の経時的なcf-DNA検体に対して、digital PCR及びNGSによる遺伝子解析を実施した。digital PCRでcf-DNA中の*KRAS*変異の存在頻度を測定することで、効率的なタイミングでNGS解析が実施可能であること、short ampliconサイズのパネルが有用であることが示唆された。