

第23回
抗悪性腫瘍薬開発フォーラム

ctDNAによるリキッドバイオプシー
技術を活かす臨床の局面とは？

平成29年6月24日 (土) 13:00 – 18:00

がん研究会
吉田富三記念講堂

九州大学病院別府病院・外科
三森功士

発表項目

ctDNA解析技術の臨床応用について

- 1) 活用が期待される 癌種別の臨床的な局面
- 2) がん多様性の克服のため
- 3) 一般のがん検診にむけて

発表項目

ctDNA解析技術の臨床応用について

1) 活用が期待される 癌種別の臨床的な局面

1) 再発早期発見

2) 治療感受性の評価

3) 薬剤の選択

全身の担癌量の変化

低侵襲 頻回 精緻

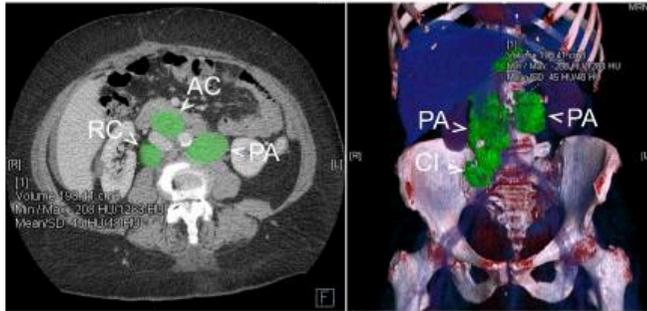
=ctDNAの標的分子のAF
に変化により評価

治療による担癌量の変化

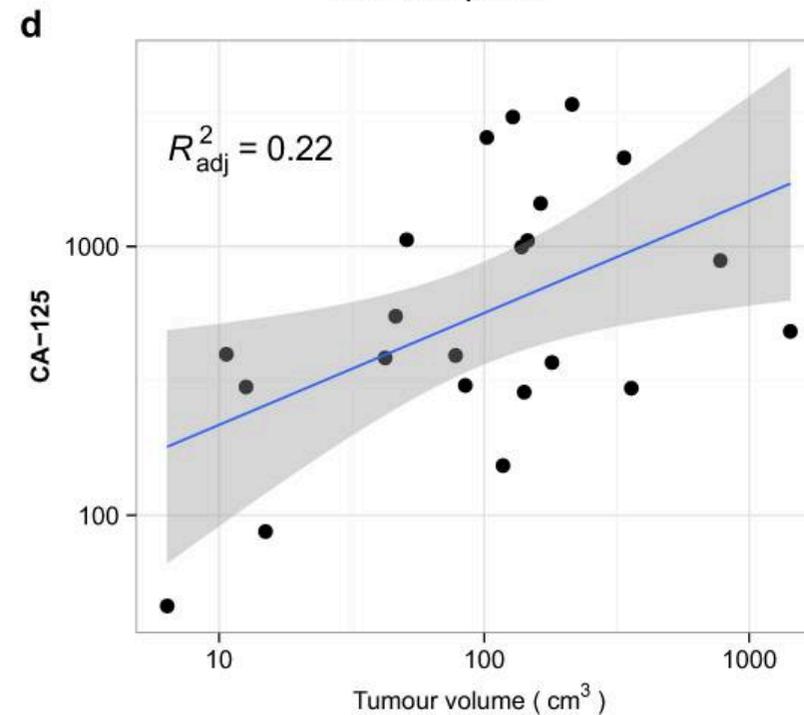
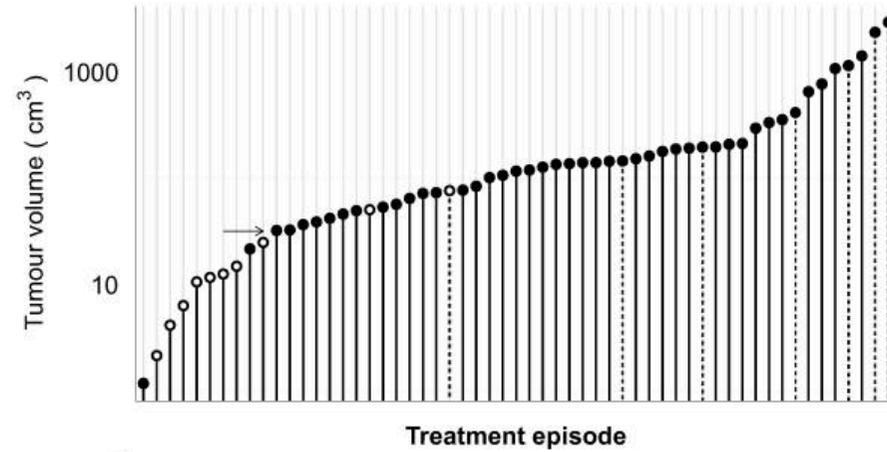
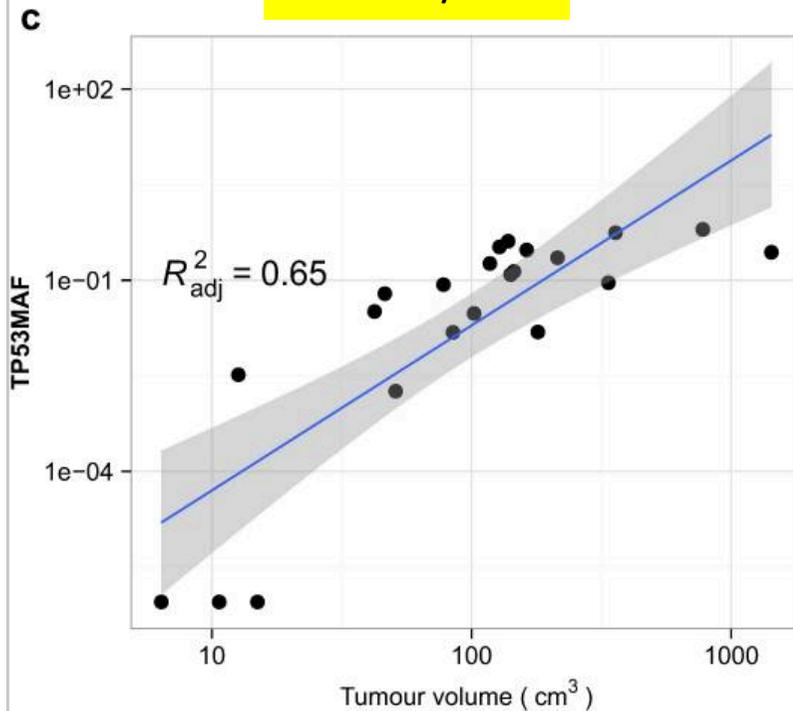
短期間 低侵襲 精緻

=ctDNAの標的分子のAF
に変化により評価

ctDNAのAFによる担癌量の評価



6コピー/cm³



Parkinson, C. A. et al. Exploratory analysis of TP53 mutations in circulating tumour DNA as biomarkers of treatment response for patients with relapsed highgrade serous ovarian carcinoma: a retrospective study. *PLoS Med.* 13, e1002198 (2016).

乳がん

診断

治療

再発

NAC

手術

術後補助化学療法

- トリプルネガティブ乳がん
(ER-、PgR-、HER2/neu -)
治療アームがなく、定期的に
外来観察している
→担癌量をcfDNAで評価

脳転移患者:
無症状で早期治療開始群は
有症状治療群と比較して
脳転移死亡は有意に少ない
Ann Oncol. 2003; 14(7): 1072-7

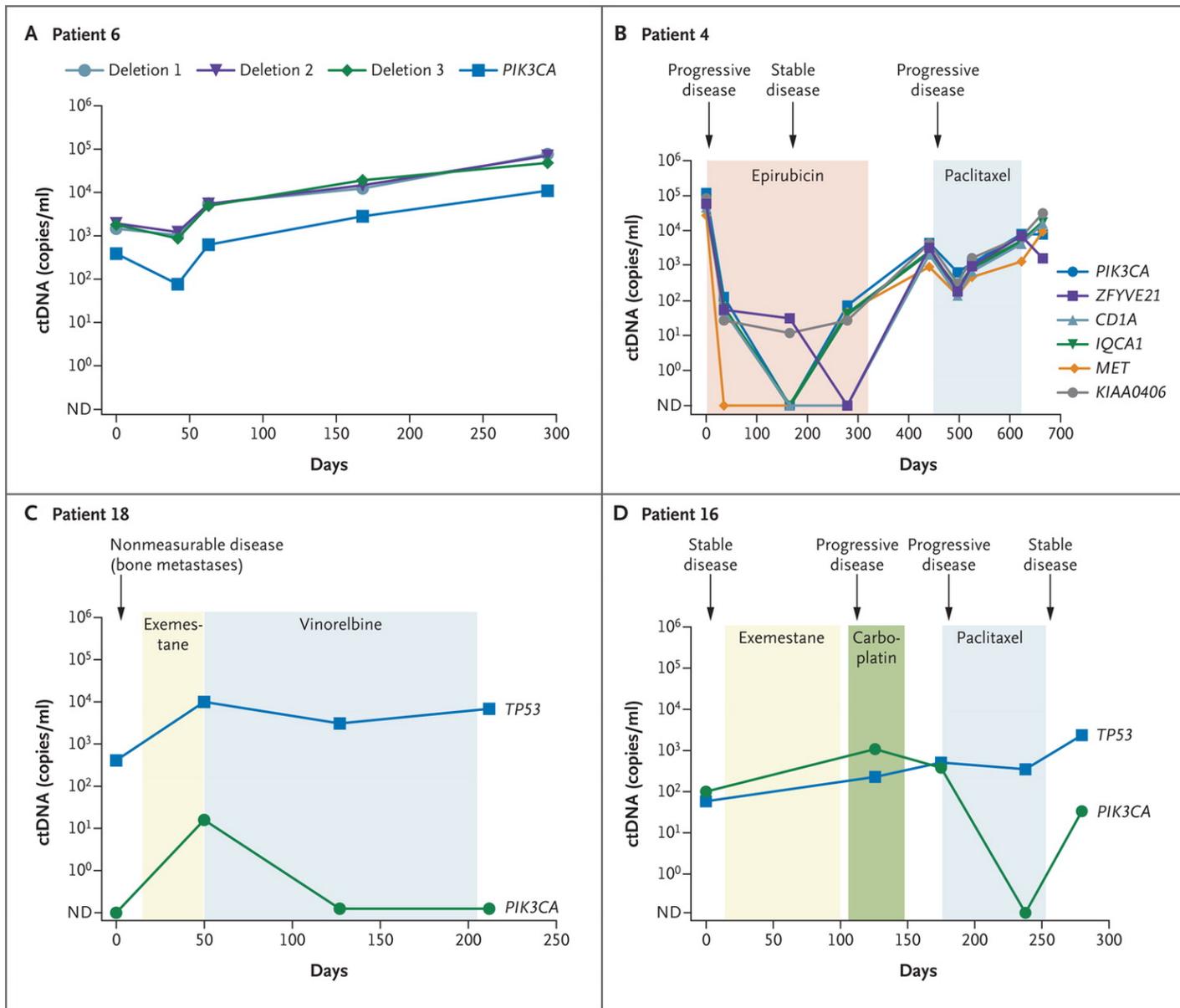
- 脳転移が見過ごされている
通常ルーチンで行わない
発症してから実施
→cfDNAで臓器特定・担癌量評価

- ホルモン剤10年は必須?
5年ですむ患者もいるのでは?
→担癌量をcfDNAで評価

- NAC→手術 ケモ終了?
術後補助化学療法をすべき患者の選別
→担癌量をcfDNAで評価

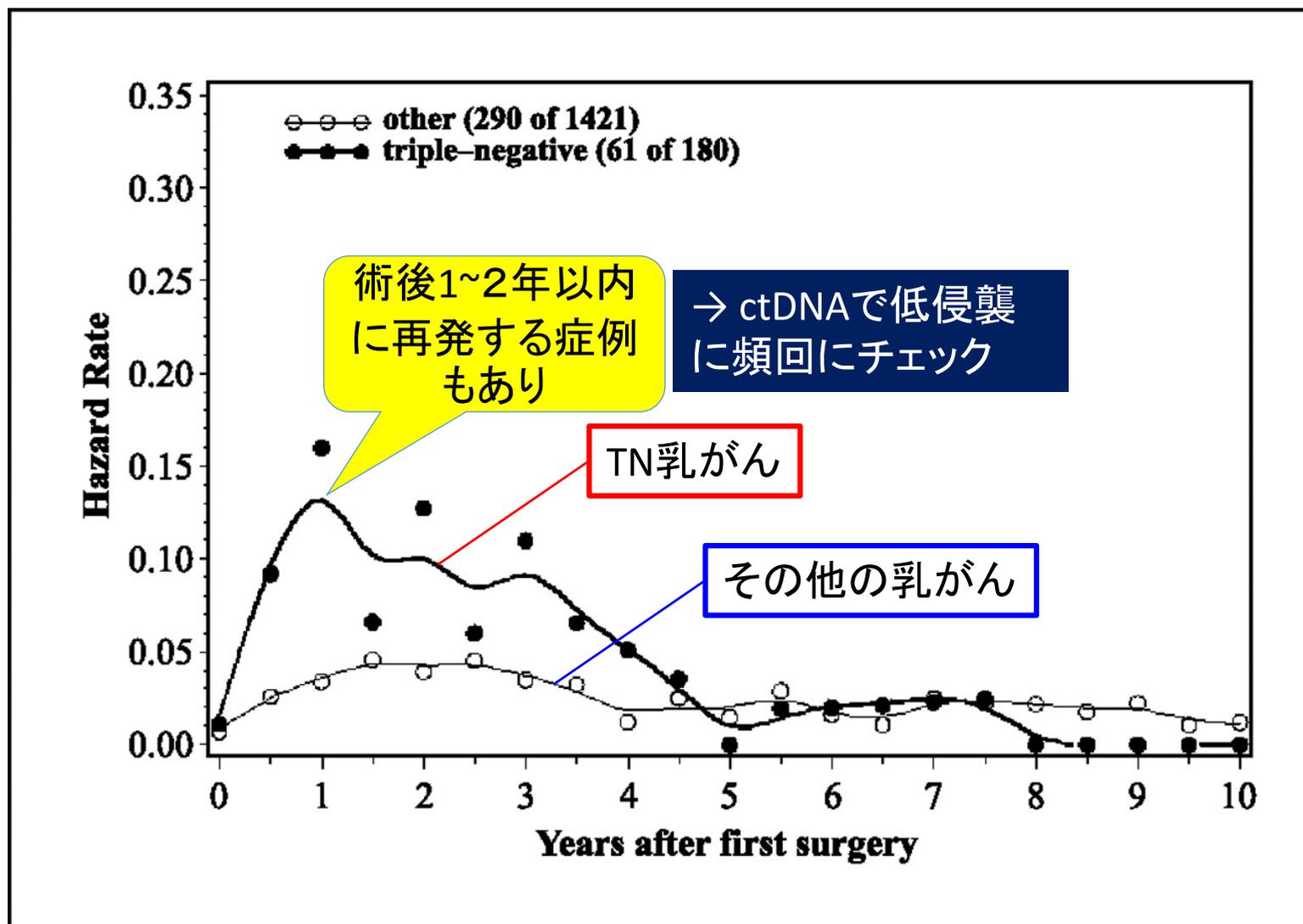
- 術後の定期フォローは、
一律4カ月ごとでよい?
もっと短期間のフォローの必要な
患者がいる
→担癌量をcfDNAで評価

乳がんの治療経過をctDNAでフォロー



Dawson, S.-J. et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 368, 1199–1209 (2013).

TN乳がんの術後経過期間と再発危険率の現状



Dent R et al. Clin Cancer Res 2007;13:4429-4434

5年生存率:
stage I 41.3%
II 17.8%
III 6.4%
IV 1.4%

診療上の問題点

膵がん

診断

治療

再発

NAC

手術

化学療法

● 早期診断

ERCP; 胆汁や膵液細胞診、擦過細胞診で、確定診断に至れないことも多くある

→ cfDNAで確定診断

● IPMNに決着!

経過観察しかない

→ cfDNAで確定診断

● 膵臓癌と慢性膵炎

メチル化パターンの差異で判定可能

→ cfDNAで鑑別診断

● ボーダーライン膵癌症例

術前化学放射線療法実施も、増悪のため、手術不能となる症例がある

→ cfDNAで感受性症例を検出

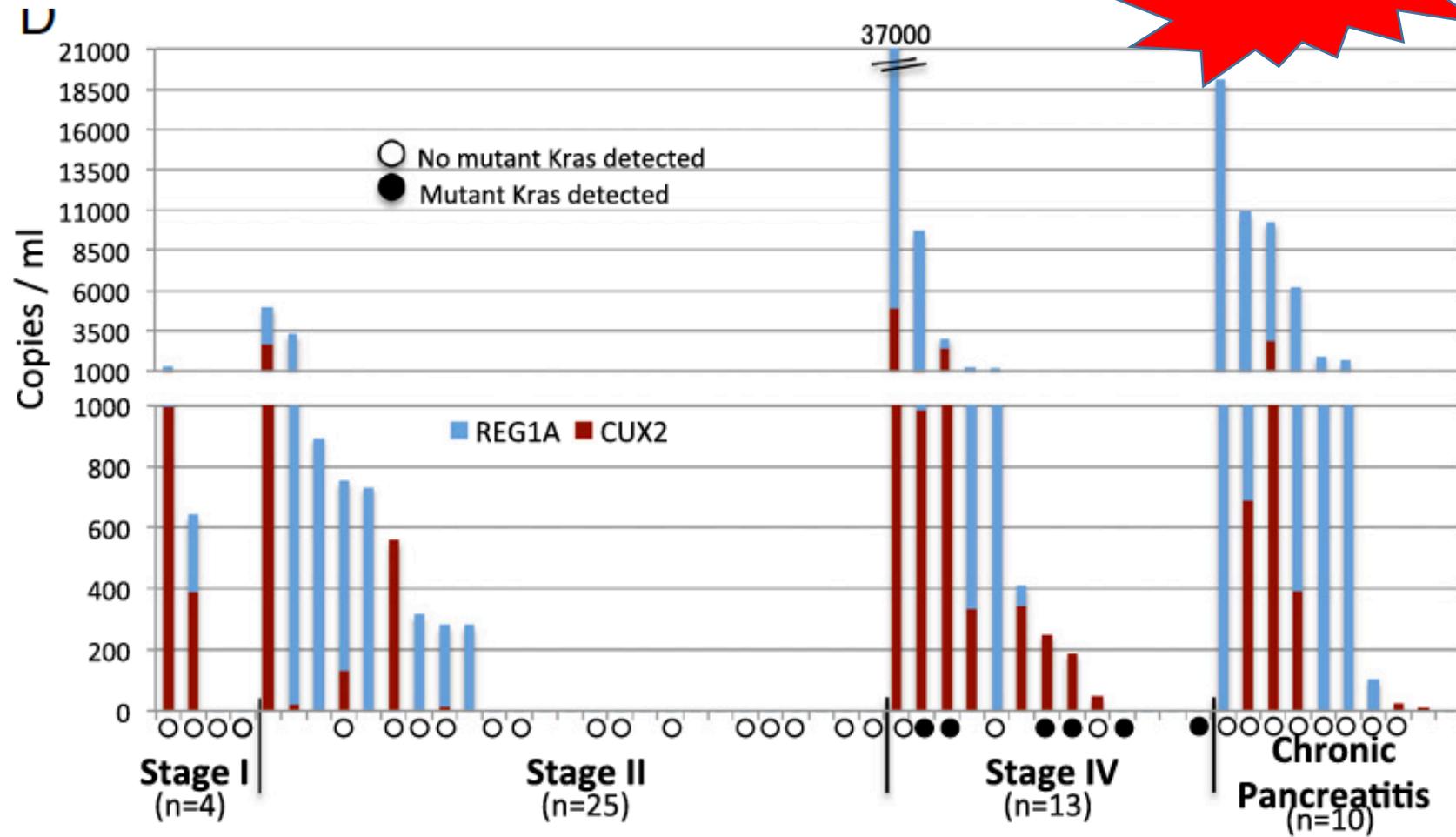
● FOLFIRINOX(切除不能膵癌)

有害事象が強いため適応症例を選定したい

→ cfDNAで感受性症例を検出

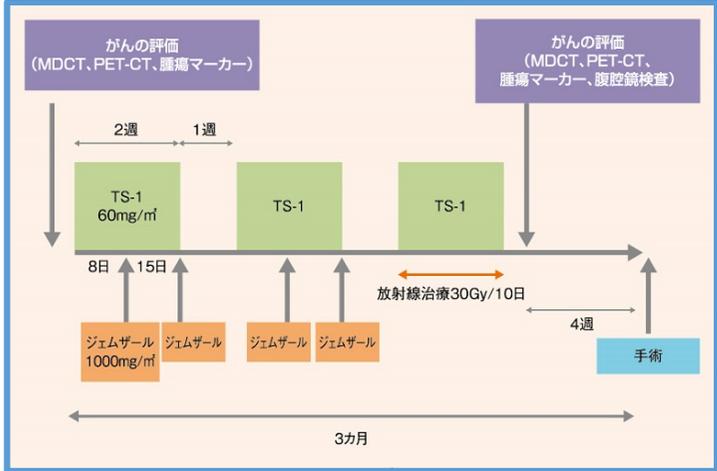
cfDNAのメチレーション+KRAS変異で 膵癌と慢性膵炎の鑑別診断

難しい



Lehmann-Werman R et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Mar 29;113(13):E1826-34

膵治療の内訳



膵がん281例

切除可能 120例

切除ボーダーライン 106例

切除不能 55例

術前化学放射線療法

化学療法

部分奏効/不変 96例 (91%)

手術可能 14例 (25%)

手術可能 80例 (75%)

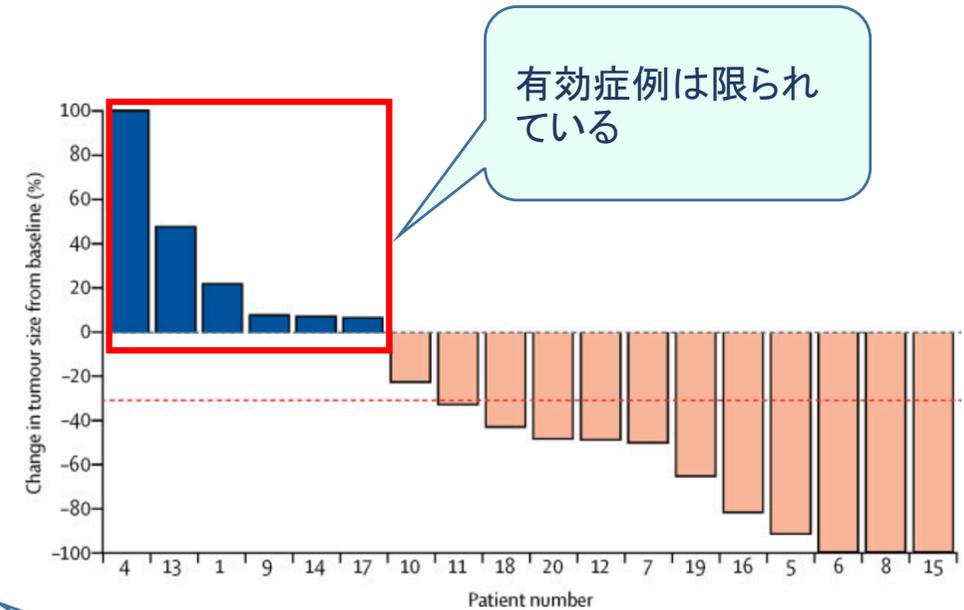
残り36例(25%)は手術が遅れ
切除不能になる
→ctDNAで短期間で評価

膵がんに対するFOLFIRINOX療法

Table 2.
Adverse events in patients who received the maximum tolerated dose

	Grade 1-2	Grade 3	Grade 4
Anaemia	14 (78%)	4 (22%)	0
<u>Hyperglycaemia</u>	8 (44%)	9 (50%)	1 (6%)
Alkaline phosphatase increased	17 (94%)	0	0
Fatigue	14 (78%)	3 (17%)	0
Peripheral sensory neuropathy	12 (67%)	5 (28%)	0
Thrombocytopenia	14 (78%)	3 (17%)	0
Diarrhoea	11 (61%)	5 (28%)	0
<u>Hypoalbuminaemia</u>	15 (83%)	0	1 (6%)
Hyponatraemia	11 (61%)	3 (17%)	0
Nausea	12 (67%)	2 (11%)	0
Hypomagnesaemia	13 (72%)	0	0
Lymphocyte count decreased	8 (44%)	5 (28%)	0
Pain	13 (72%)	0	0
Alanine aminotransferase increased	12 (67%)	0	0
Anorexia	11 (61%)	1 (6%)	0
<u>Hypokalaemia</u>	6 (33%)	5 (28%)	1 (6%)
Abdominal pain	7 (39%)	4 (22%)	0
Anxiety	11 (61%)	0	0
Aspartate aminotransferase increased	11 (61%)	0	0
Dysgeusia	11 (61%)	0	0
Hypertension	10 (56%)	1 (6%)	0
Hypocalcaemia	10 (56%)	0	0
Weight loss	9 (50%)	1 (6%)	0
Decreased white blood cell	9 (50%)	0	0
<u>Decreased neutrophil count</u>	3 (17%)	4 (22%)	1 (6%)

→ctDNAで感受性を短期間で評価



Grade 4の有害事象がある

Safety and efficacy of the first-in-class agent CPI-613 in combination with modified FOLFIRINOX in patients with metastatic pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-escalation, phase 1 trial. Alistar A, et al. *Lancet Oncol.* 2017 Jun;18(6):770-778.

診療上の問題点

食道がん

診断

治療

再発

NAC

手術

術後補助化学療法

● ESD後の再発

壁深達度が粘膜層(T1a)
だが、再発は懸念

→ cfDNAで評価

● 根治的化学放射線療法

Stage Iaでは化学放射線療法
と外科手術の同等性が期待
されているが、
抵抗性症例は手術をしたい
→ cfDNAで評価

● Barett食道の再発

AGAでは、高度異型症例
=3ヶ月毎の内視鏡f/u

→ cfDNAで評価

● 再発の早期発見

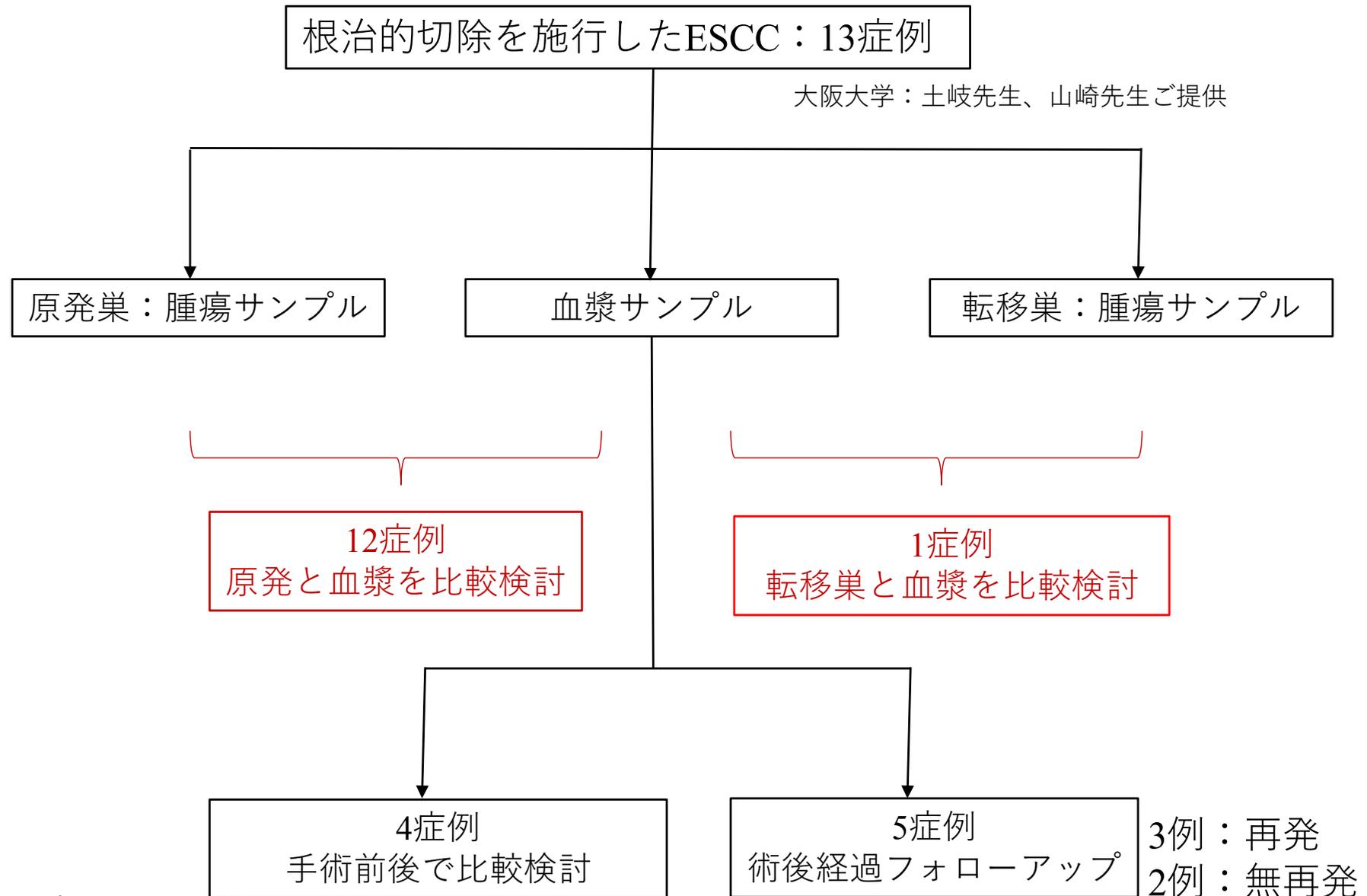
血清マーカーがよくない
SCC32%, p53抗体30%, CEA20%
→ cfDNAで評価

● ニボルマブのbiomarker

第2相単群非盲検試験で有効
性が示されたが、markerなし
→ cfDNAで評価?

食道がん症例におけるcfDNAの有用性

再発の超早期診断・治療感受性



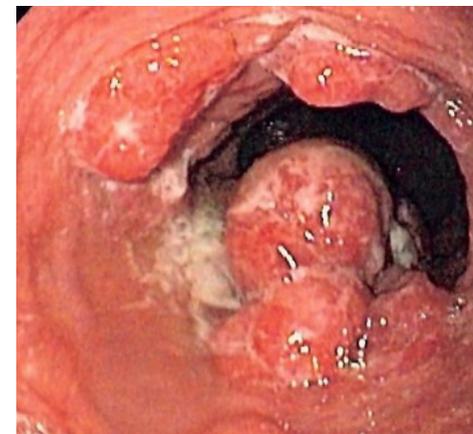
53個の遺伝子についてシーケンス

ESCCで高頻度に変異のある
ドライバー遺伝子



53遺伝子を抽出

TP53	FBXW7	PHF14
NOTCH1	TGFBR2	ARID4B
MLL2	CDKN2A	IRS2
ZNF750	CUL3	ASH1L
FAT1	BCL9	CHD8
NFE2L2	PRDM9	SETD2
CSMD3	RB1	APC
EP300	MYBL1	PHF17
CREBBP	JARID2	SMAD2
FAT3	GLI3	FAT2
ERBB4	ATR	BRCA2
NOTCH3	NCOR1	AURKA
MLL3	MAML3	EGFR
TET2	AJUBA	PIK3CA
FAT4	CHEK2	FAM135B
PRKDC	CHD4	ADAM29
MLL	TSC1	PRKDC
ARID2	ARID1A	

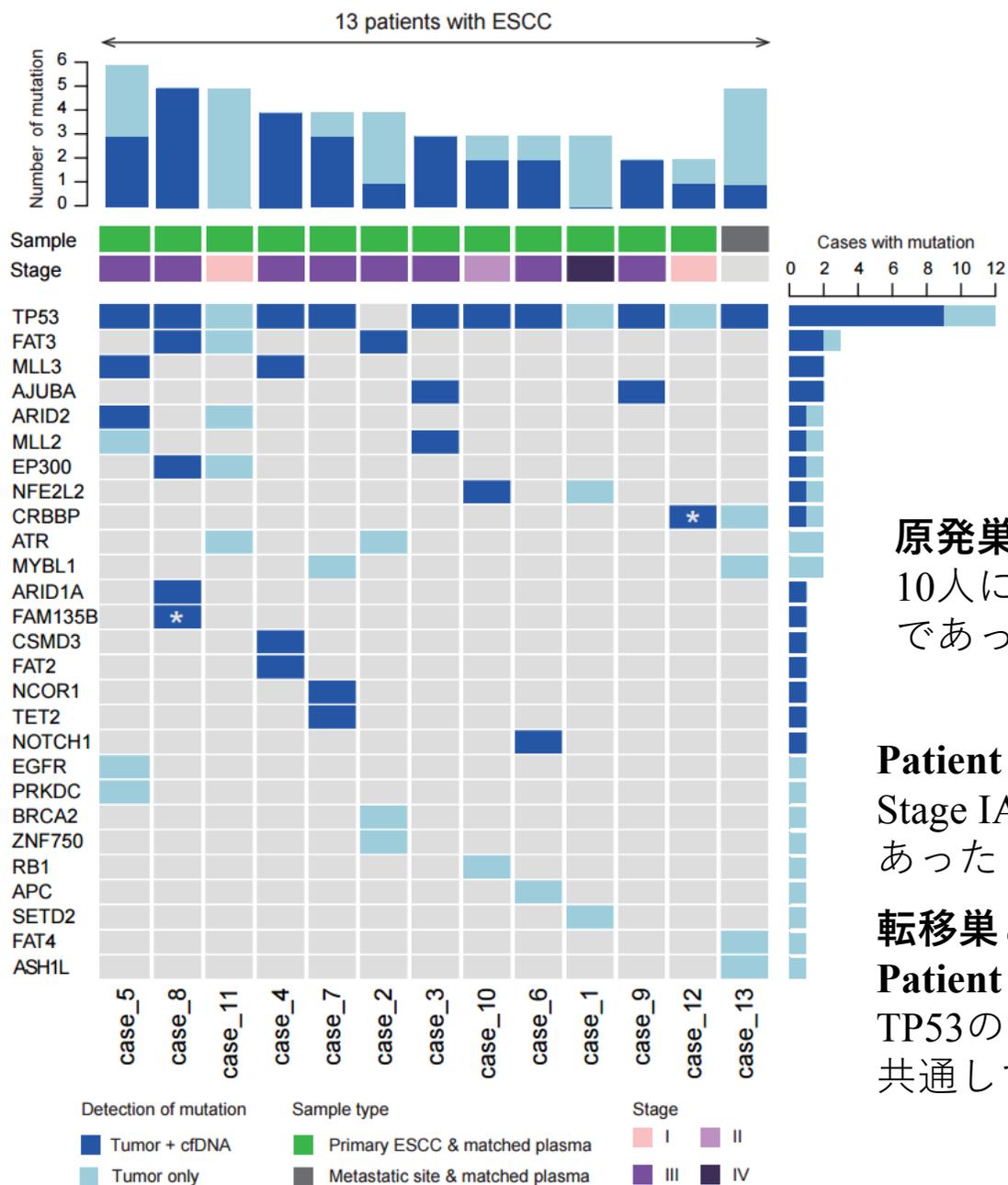


原発腫瘍



血漿 Ueda M. et al *Oncotarget* 2016

原発巣・転移巣と血漿での突然変異の比較



計57個の突然変異を認めた

28個 (49.1%)が血液でも同定可能であった

原発巣と血漿の比較

10人にて血漿にて突然変異を同定可能であった(83.3%).

Patient 12

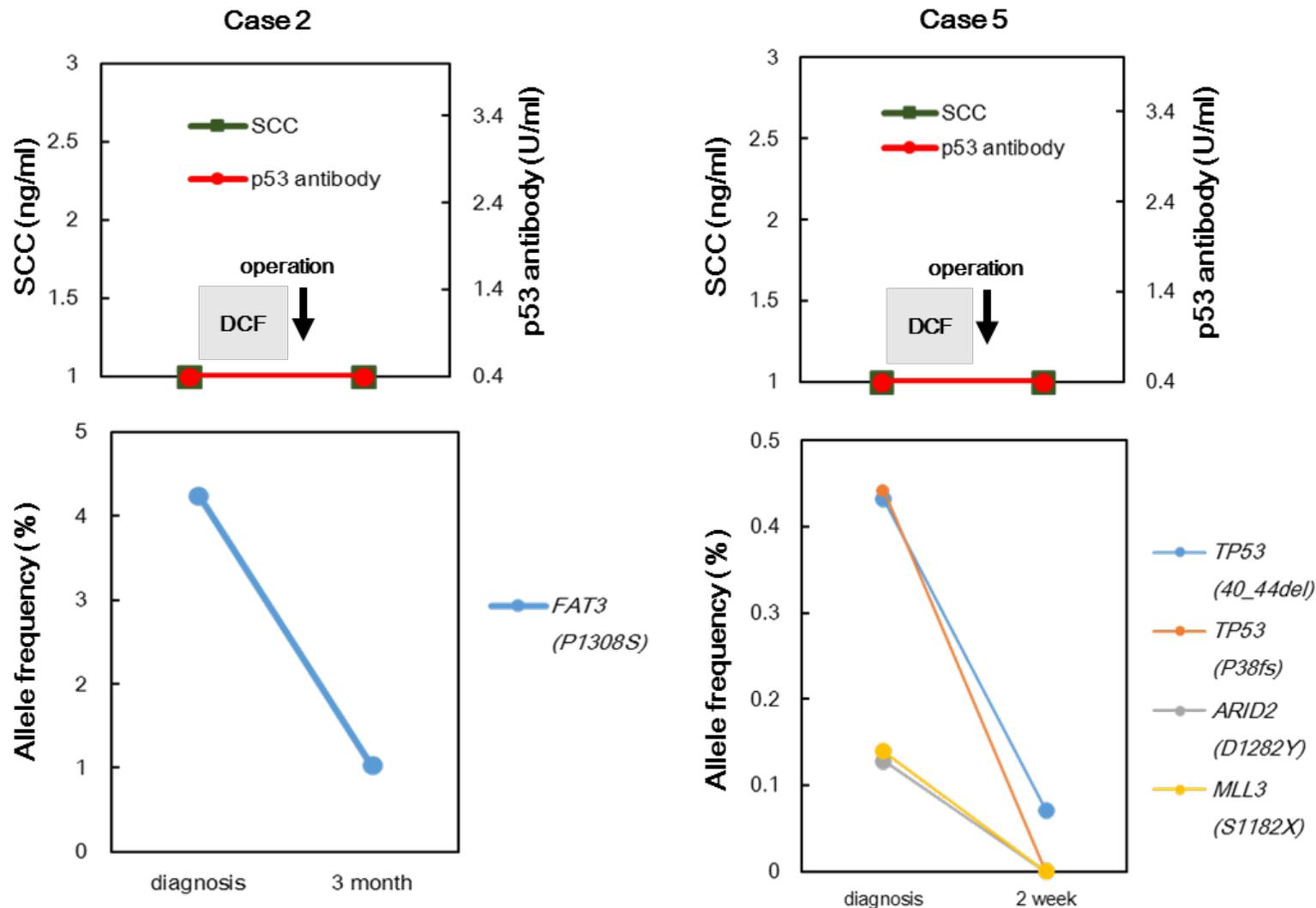
Stage IAでも、突然変異を同定可能であった

転移巣と血漿の比較

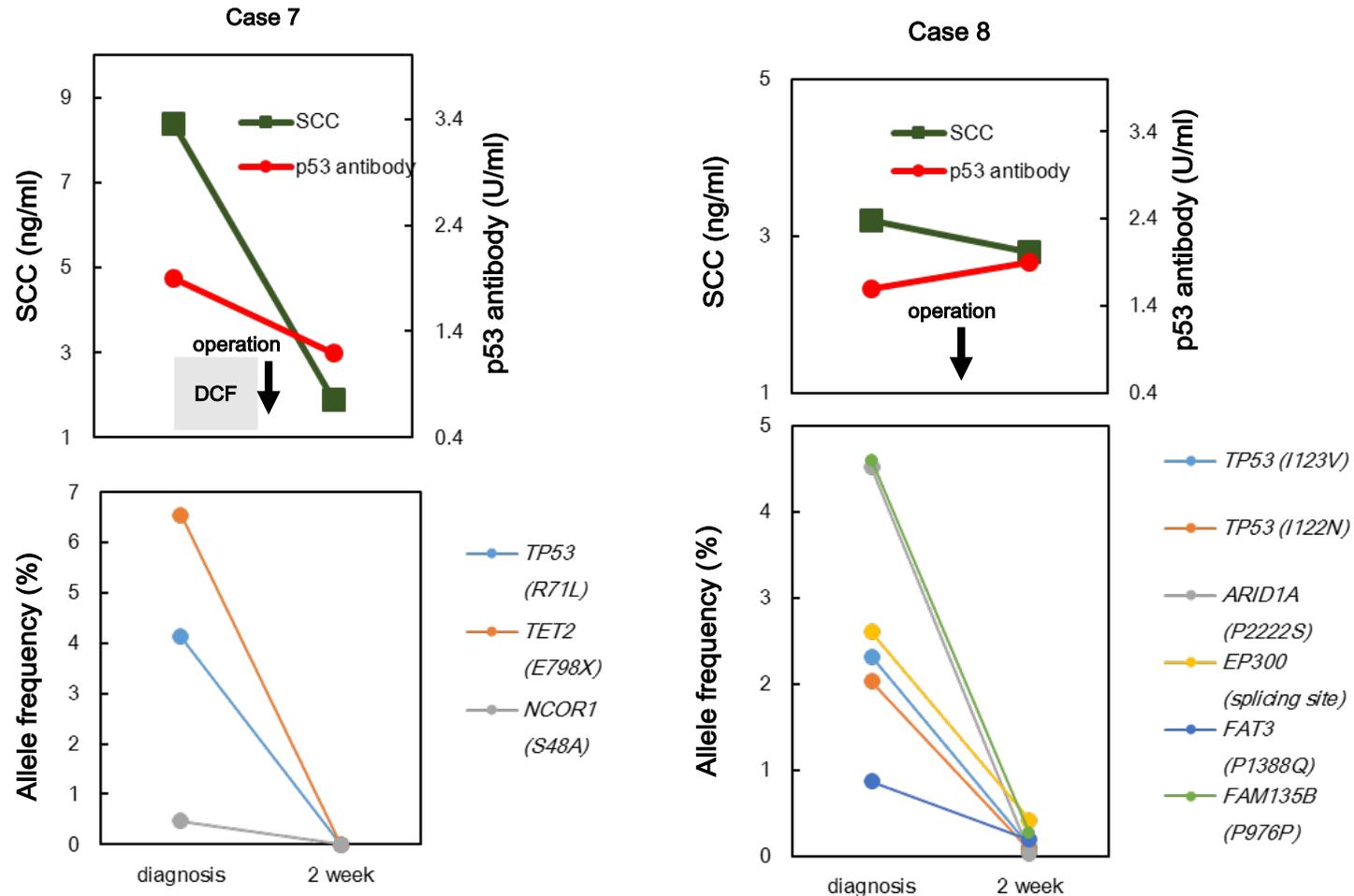
Patient 13

TP53の突然変異が、転移腫瘍と血漿で共通していた

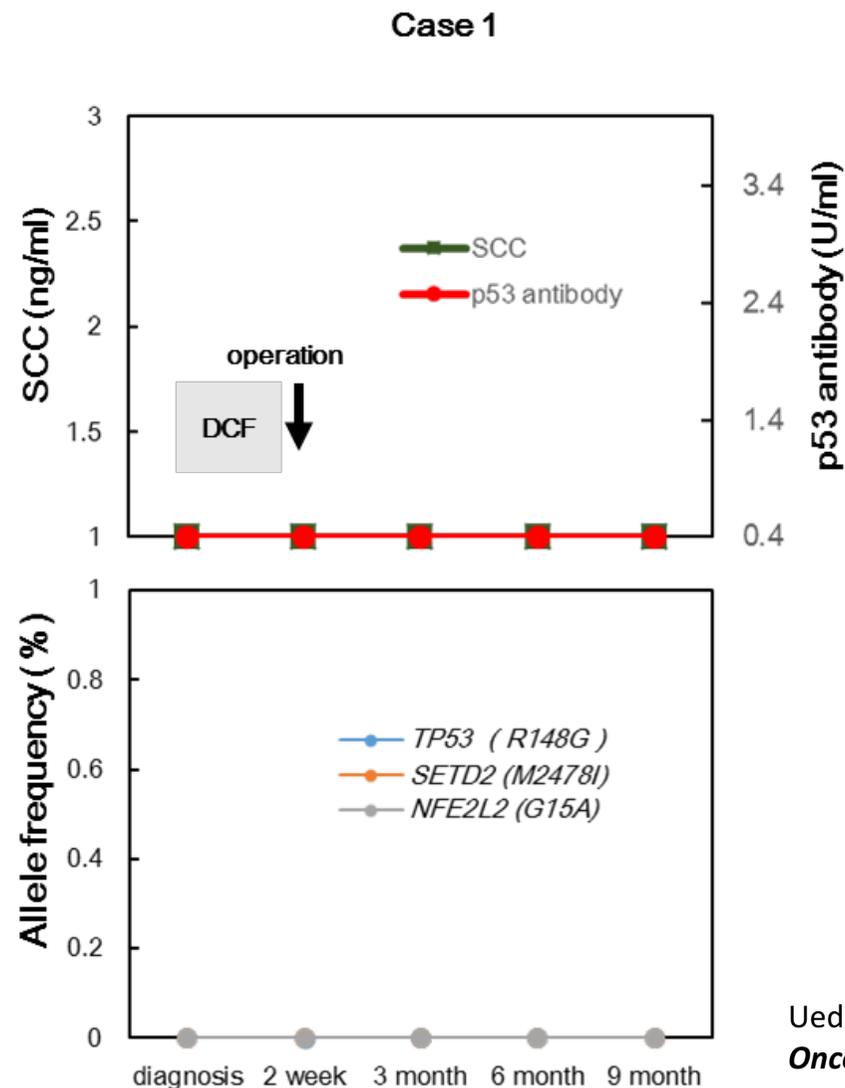
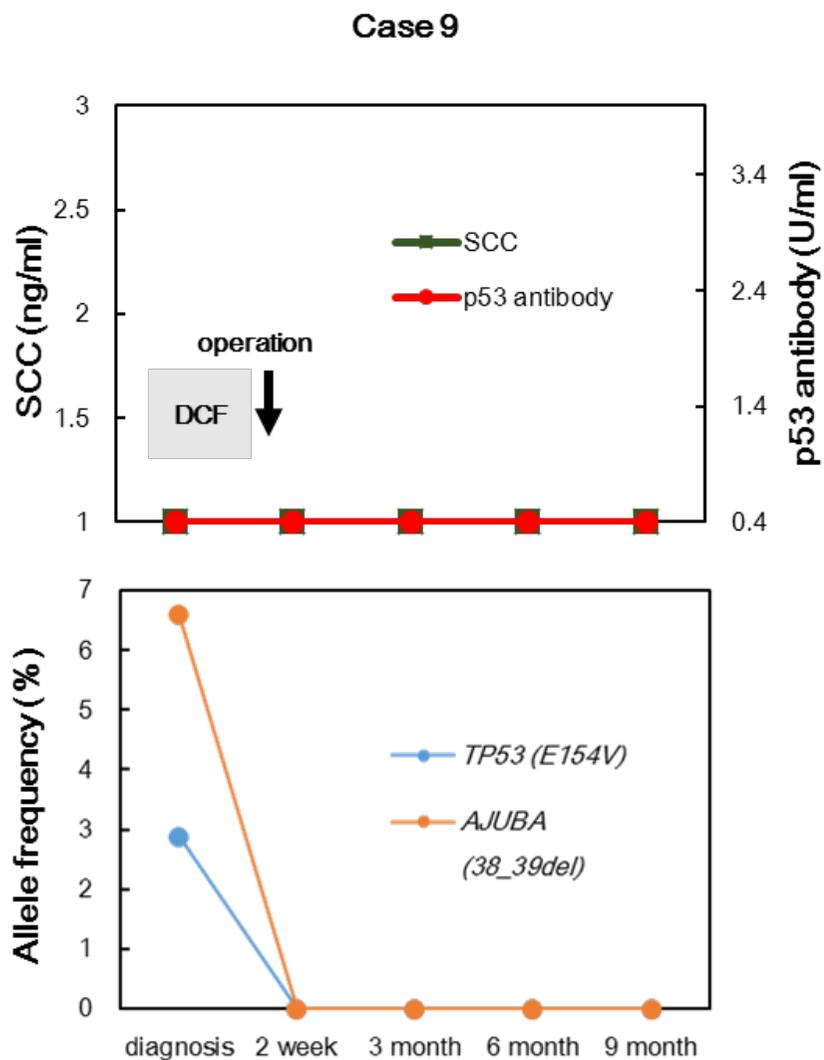
cfDNA中の突然変異の頻度は 治療(DCF+ope)により減少する



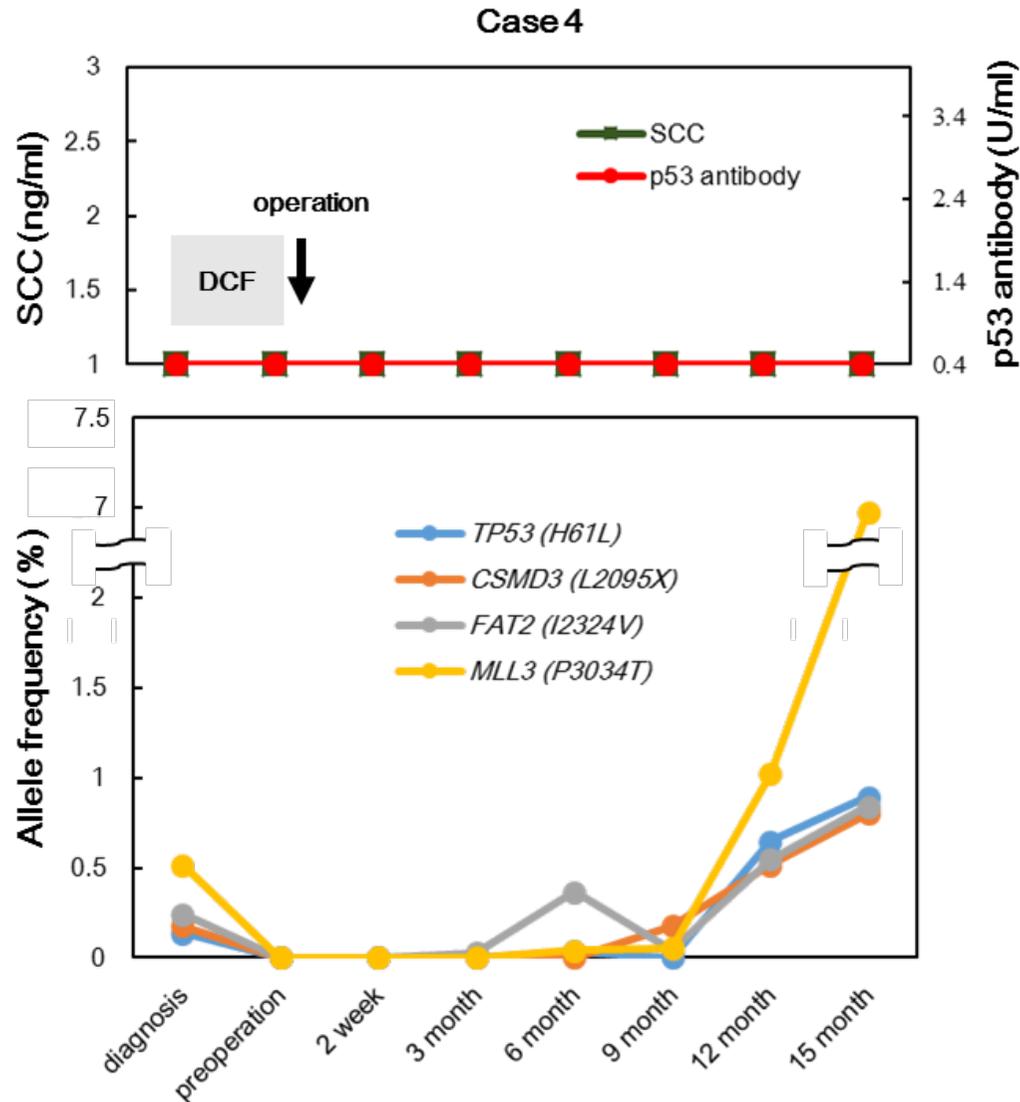
cfDNA中の突然変異の頻度は 治療(DCF+ope)により減少する



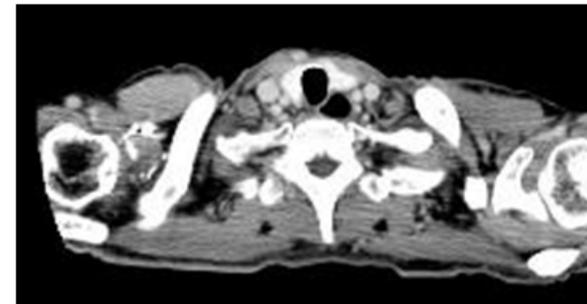
無再発患者においては、cfDNA中の突然変異の頻度は増加しない



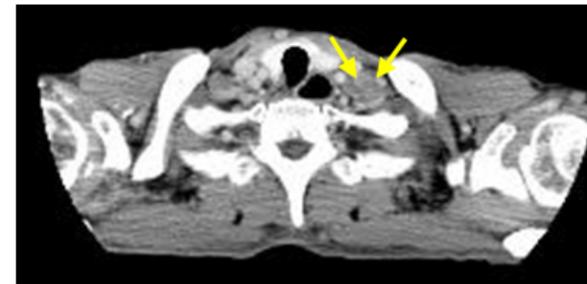
再発患者においては、cfDNA中の突然変異の頻度は早期に上昇する



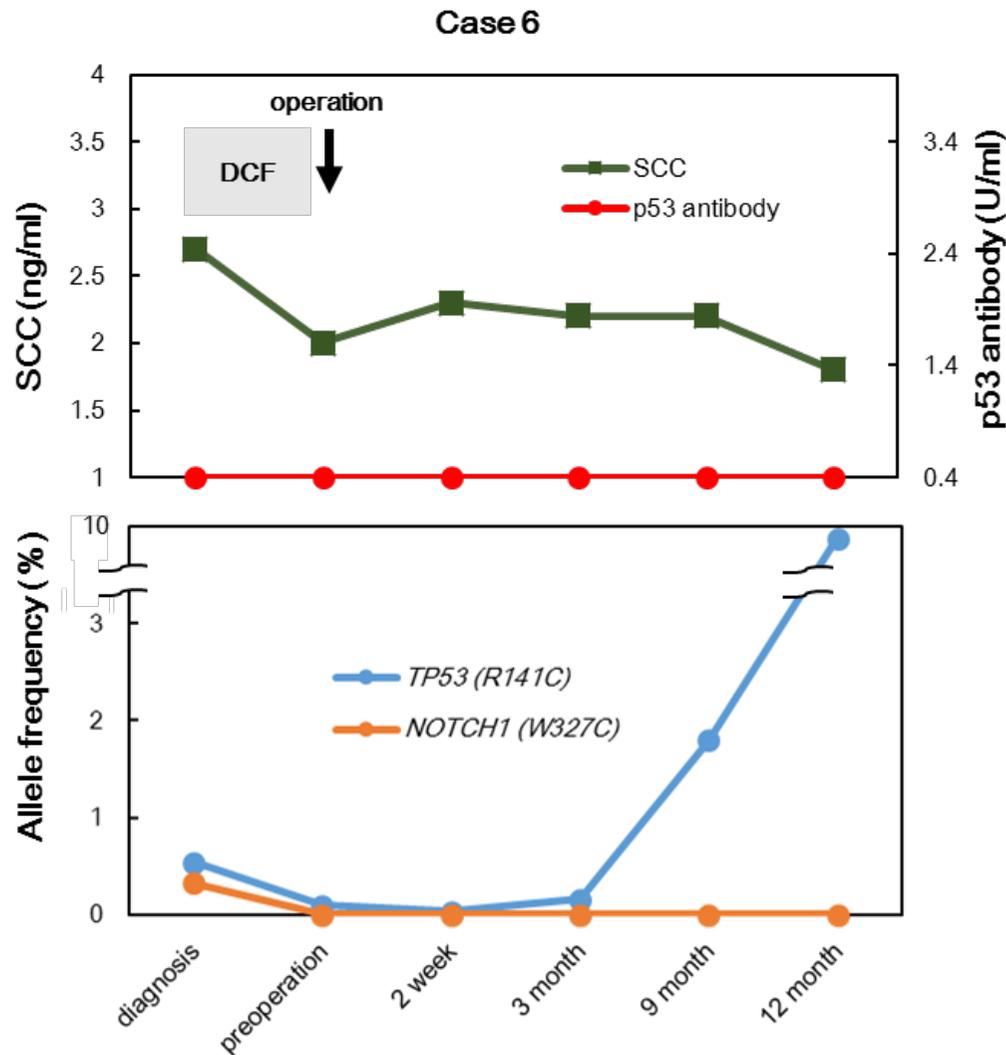
9 month after operation



15 month after operation



再発患者においては、cfDNA中の突然変異の頻度は早期に上昇する



9 month after operation

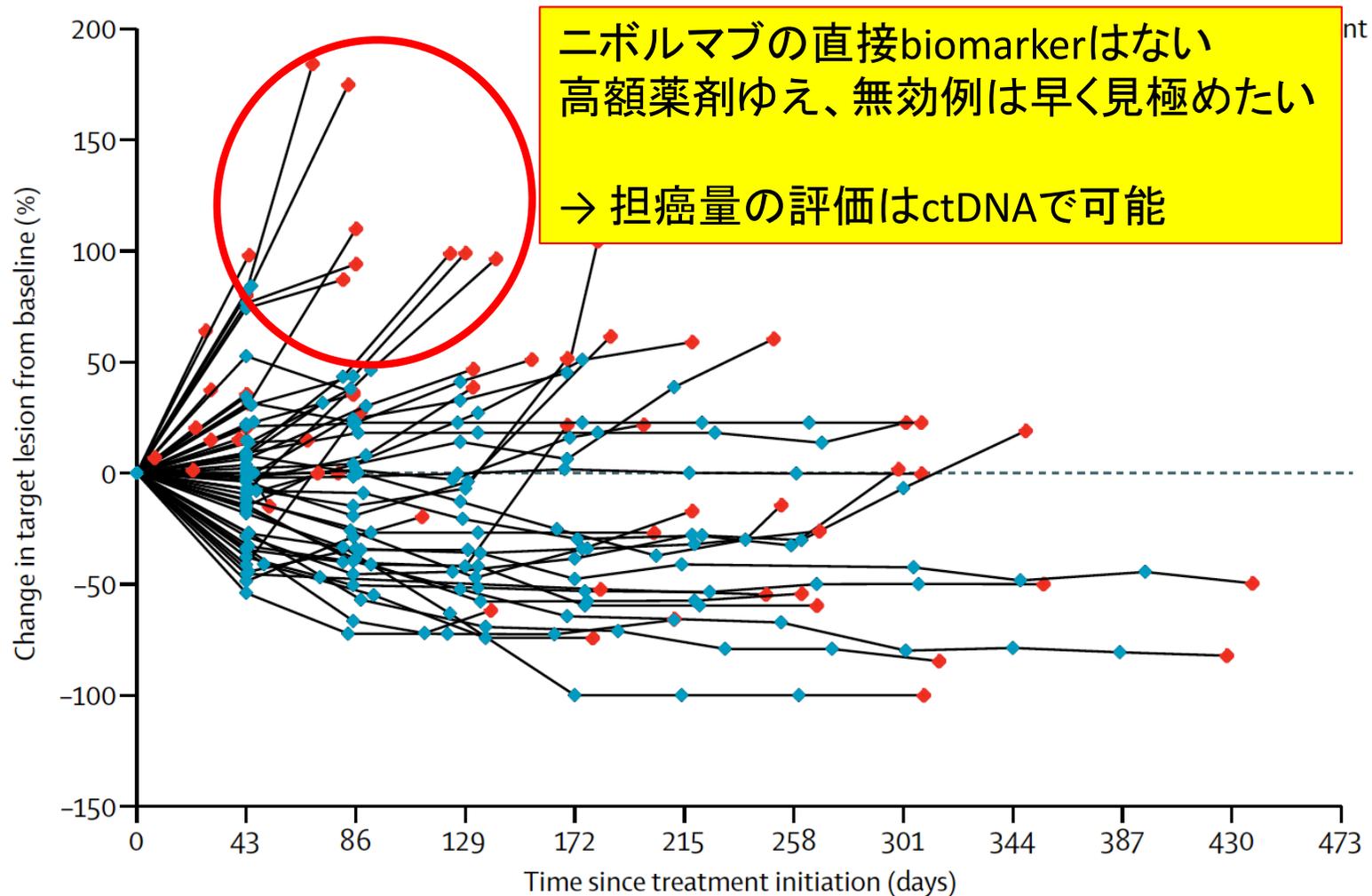


12 month after operation



第2相単群非盲検試験でニボルマブの有効性

標準療法に不応、または不耐容の日本人の食道扁平上皮がん患者



Kudo T, Kitagawa Y., et al. Nivolumab treatment for oesophageal squamous-cell carcinoma: an open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18(5):631-639. 2017

診療上の問題点
大腸がん

診断

治療

再発

NAC

手術

術後補助化学療法

●侵襲的検査の回避

大腸内視鏡は下剤内服、疼痛
(癒着など)など、特に高齢者
で負担が大きい

→ cfDNA存在・変異で診断

●がん特異的診断

ゲノムコピー数変異が健常大腸
粘膜とがんと境界

→ cfDNAでaneuploidy評価は？

●補助化学療法の終了時期

stage III大腸癌切除後で術後補助
化学療法のレジメン、施行期間は
主治医判断による

→ cfDNAで有効性評価は可能？

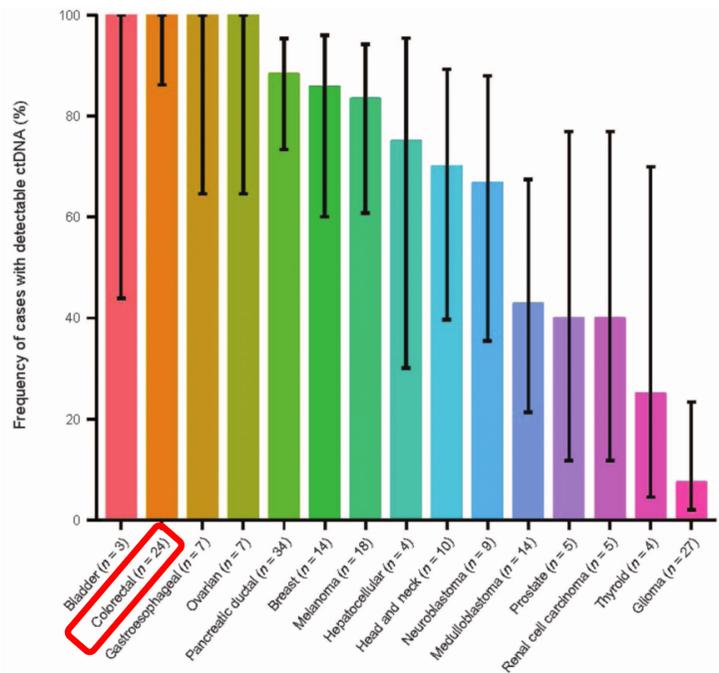
●Conversionのタイミング

Stage IV大腸癌で、化学療法継続か
手術実施するか

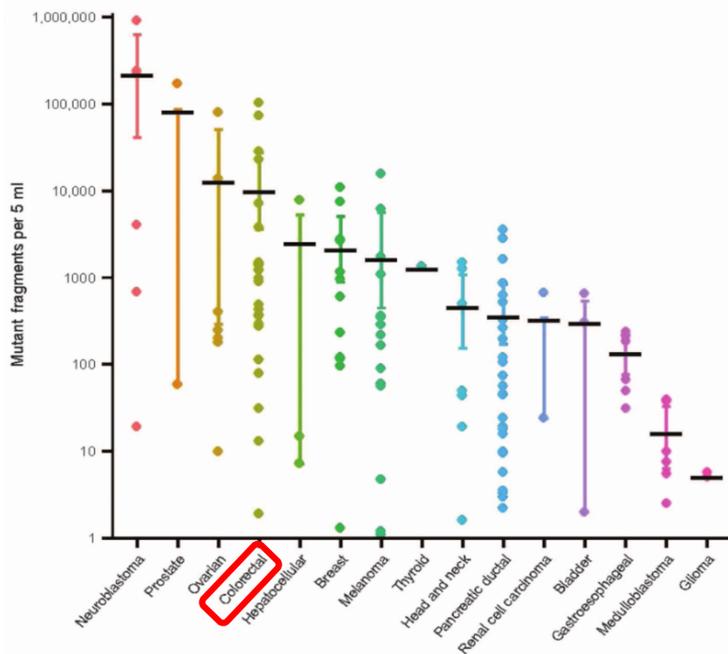
→腫瘍の絶対量をcfDNAで推測

比較的検出しやすい大腸癌 ctDNA

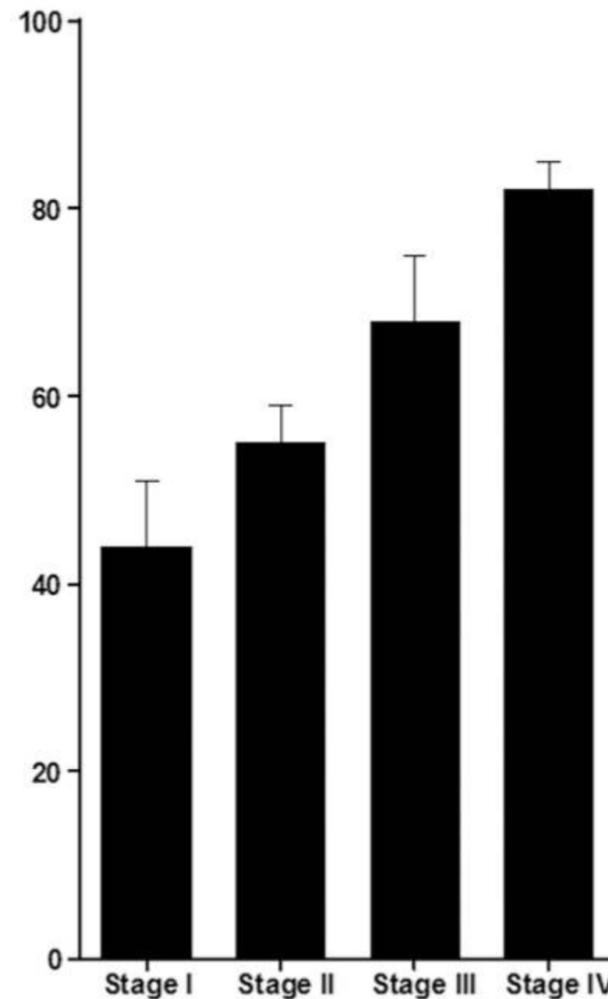
ctDNAの検出頻度



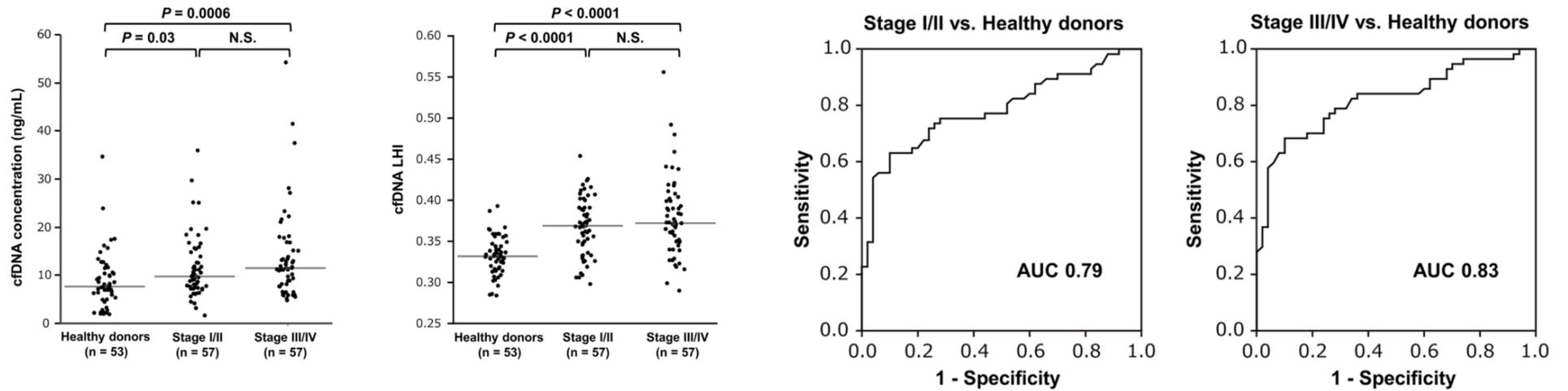
変異断片頻度/5ml



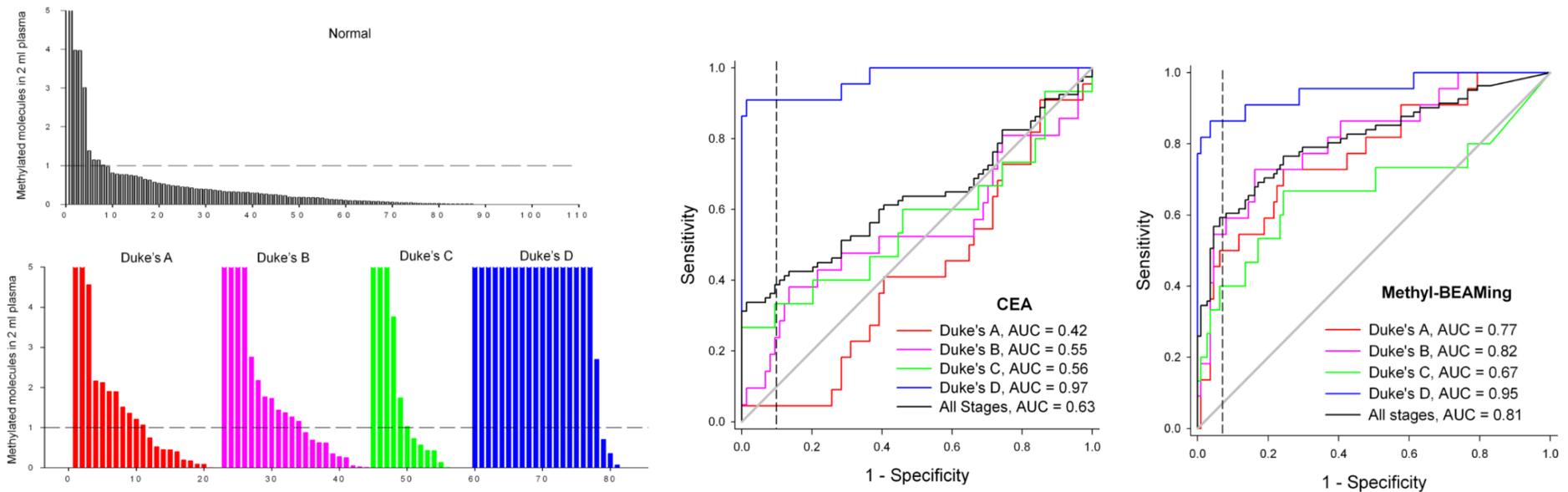
Frequency of cases with detectable ctDNA (%)



➤ 大腸癌ctDNAを用いたmethylation検出

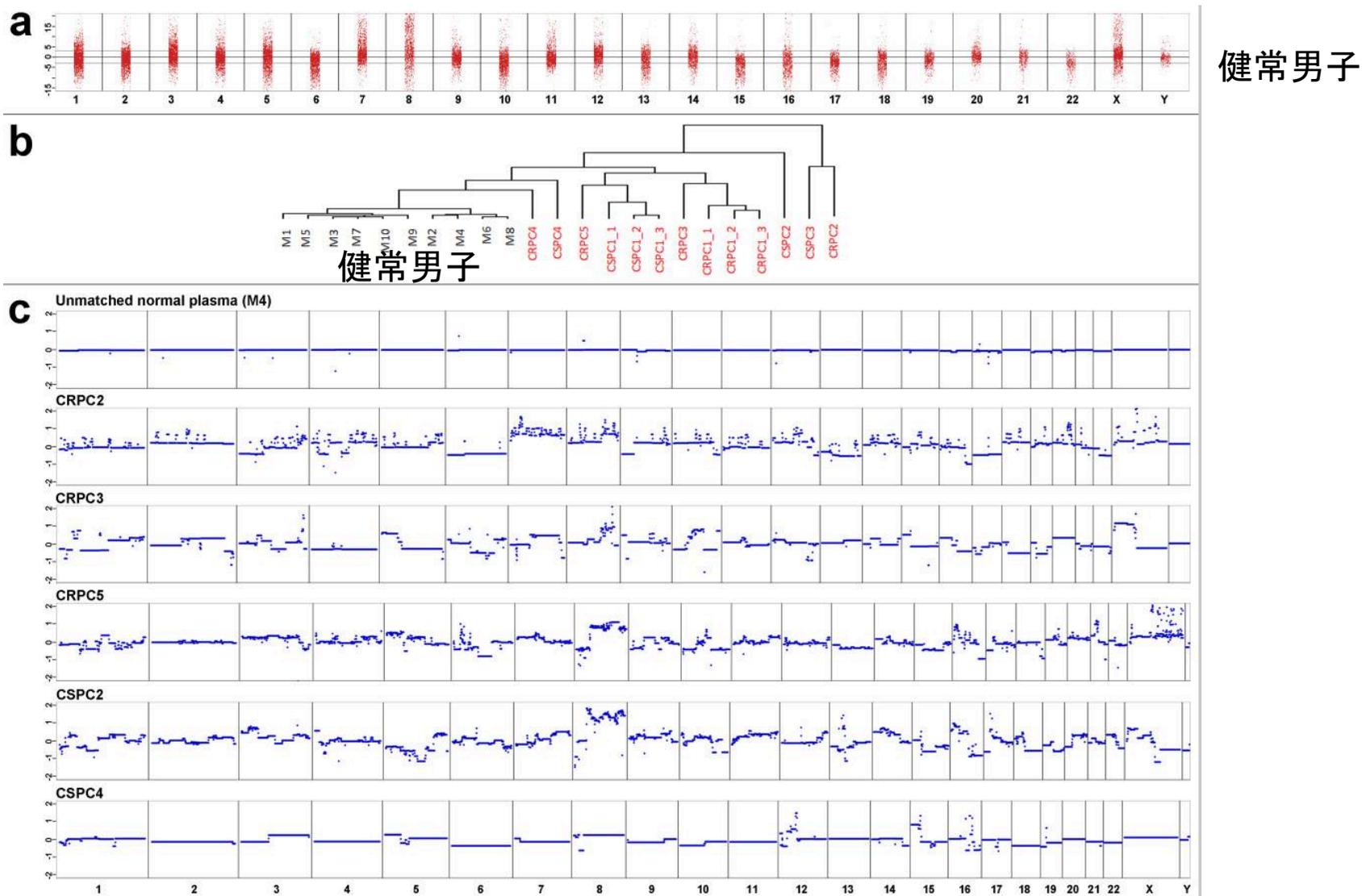


Nagai Y, et al. Oncotarget. 2017.



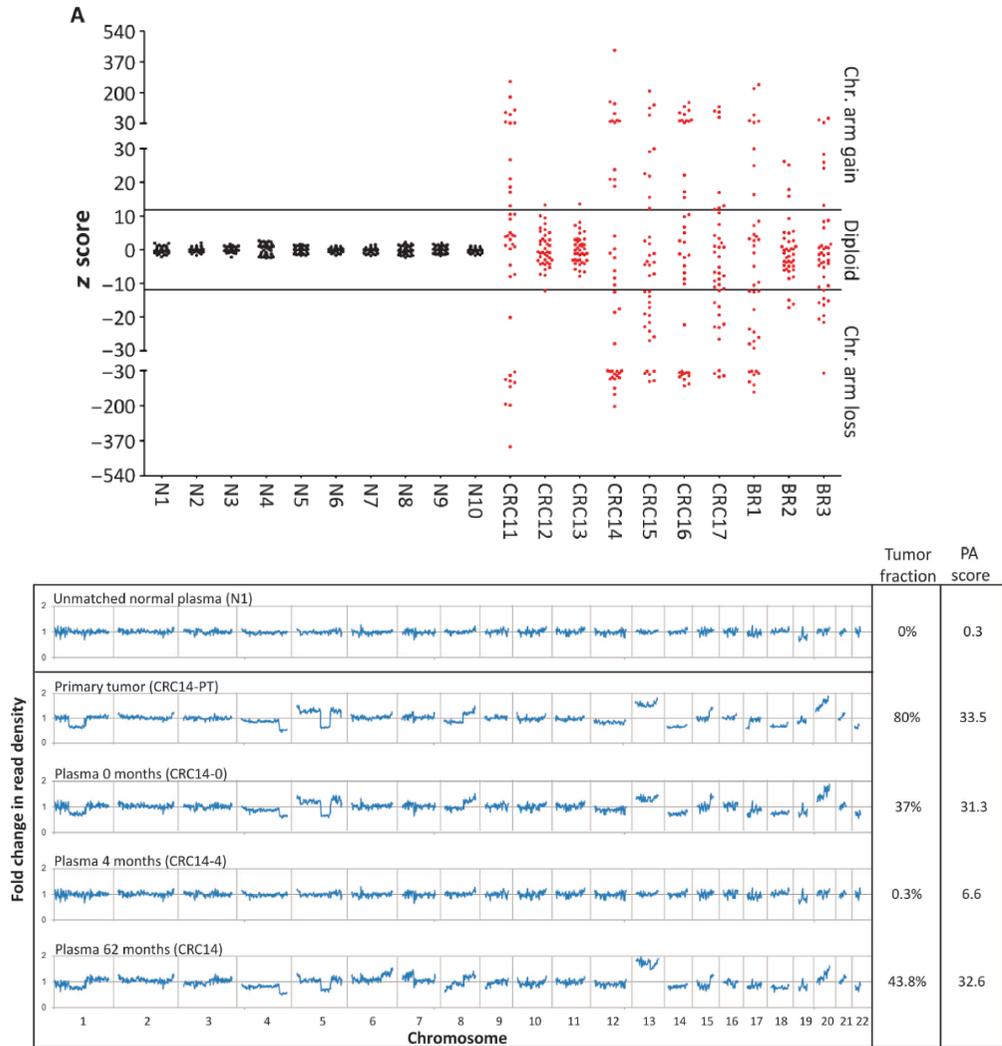
Li M, et al. Nat Biotechnol. 2009.

cfDNA WGS→アームレベルのコピー数変異(前立腺がん)

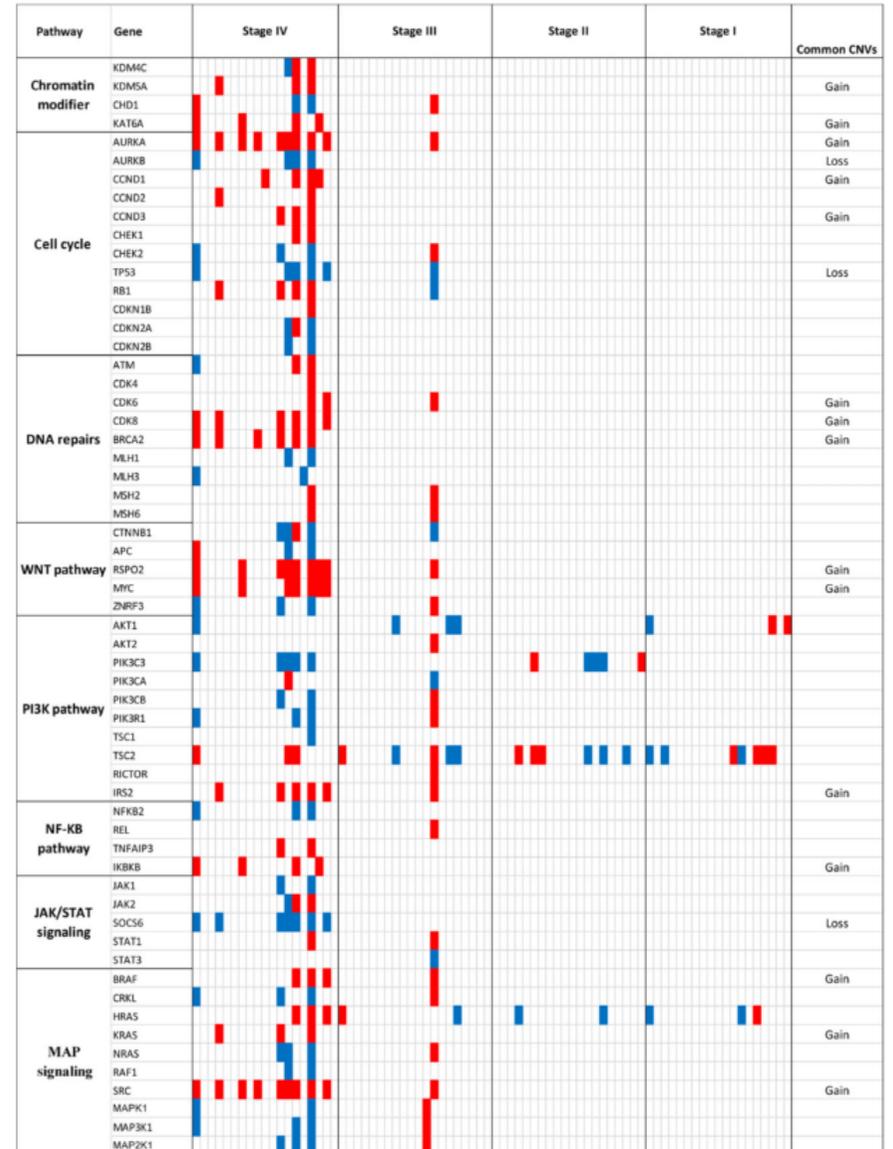


Heitzer, E. et al. Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med.* 5, 30 (2013)

➤ 大腸癌ctDNAを用いたコピー数異常検出



Leary RJ, et al. Sci Transl Med. 2012.



Li J, et al. Mol Oncol. 2017.

診療上の問題点
肝臓がん

診断

治療

再発

手術

化学療法

Interventional Tx

● NASHとCCC

ウイルス性肝臓癌に比べて、
早期発見は困難
→ cfDNAで診断？

● TACEによる治療

- ① TACE 1ヶ月以内の治療効果判定が困難
- ② リピオドールの高吸収が造影効果判定の妨げになる
- ③ リピオドール集積でも残存病変が存在することもある

→ cfDNAで評価

リピオドール集積後は再発を見逃す可能性がある

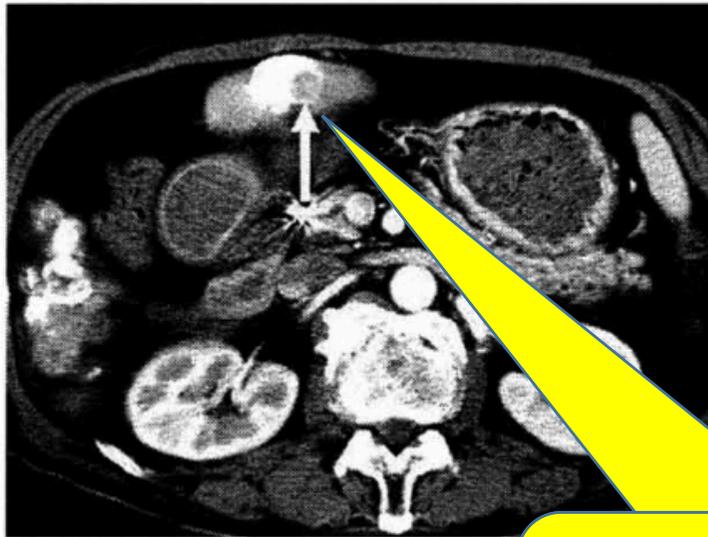


図4a. ダイナミック造影CT
肝左葉S3の治療後のリピオドール
欠損部位が認められ、再発を疑う
認められる(矢印)。



造影CT平衡相
欠損部位にwash out
、TACE治療後再発が

腫瘍内部に
リピオドール欠損域があり、
再発が疑われる。

発表項目

ctDNA解析技術の臨床応用について

1) 活用が期待される 癌種別の臨床的な局面

2) がん多様性の克服のため

1. クローナルな遺伝子変異を攻めよう！
2. 標的分子のある薬剤を交互に使おう！
3. 抵抗性クローンを黙らせて長期生存を狙おう！

3) 一般のがん検診にむけて

発表項目

ctDNA解析技術の臨床応用について

1) 活用が期待される 癌種別の臨床的な局面

2) がん多様性の克服のため

3) 一般のがん検診にむけて

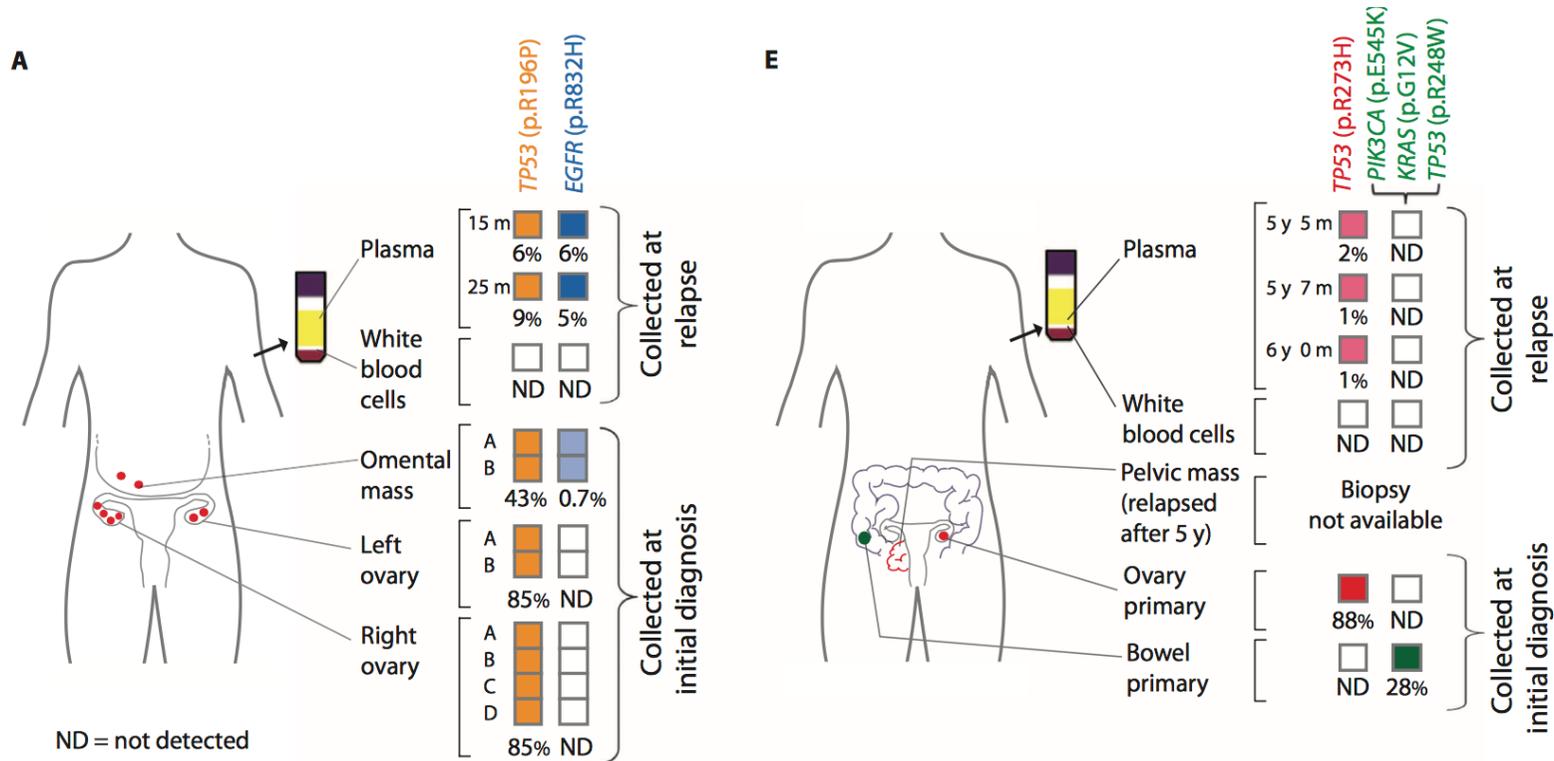
1. 罹患臓器：原発不明癌の臓器特定
2. 検体の種類：低侵襲。尿検査なら無医村でも可

がんのスクリーニング



- 7mm以上に大きく育った癌組織ならば検出
- 糖尿病だと検査不可
- がんの種類制約
- 高額診療費
- 被爆

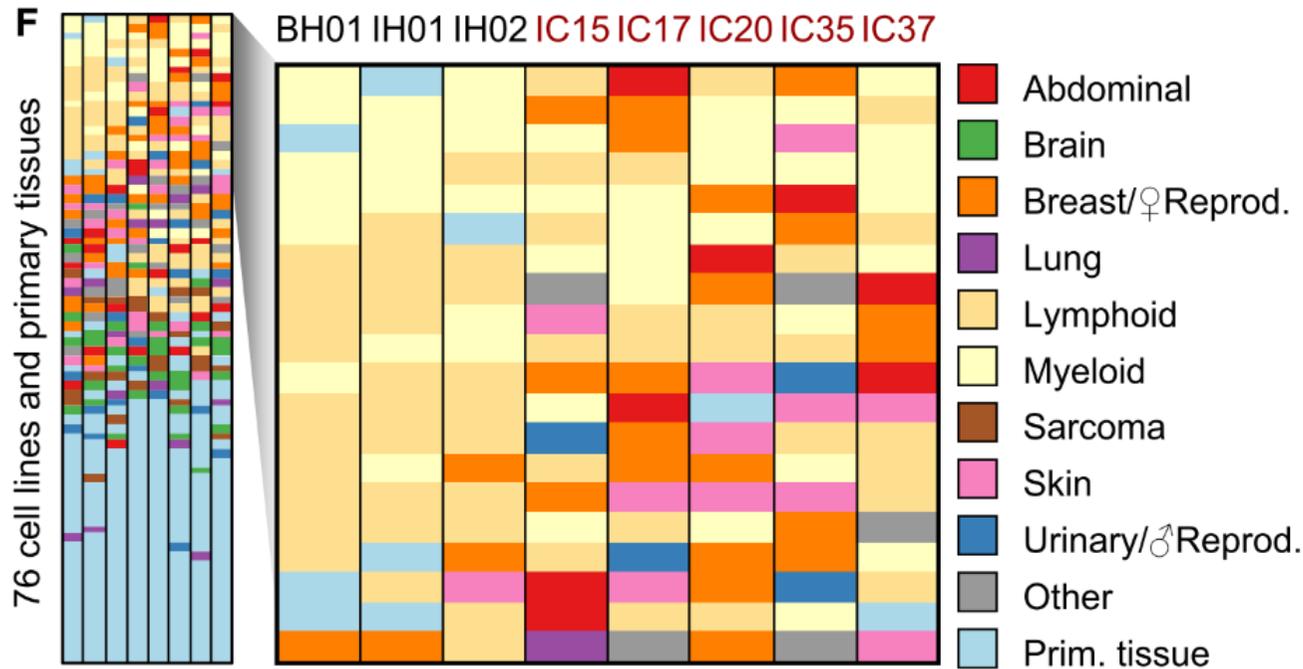
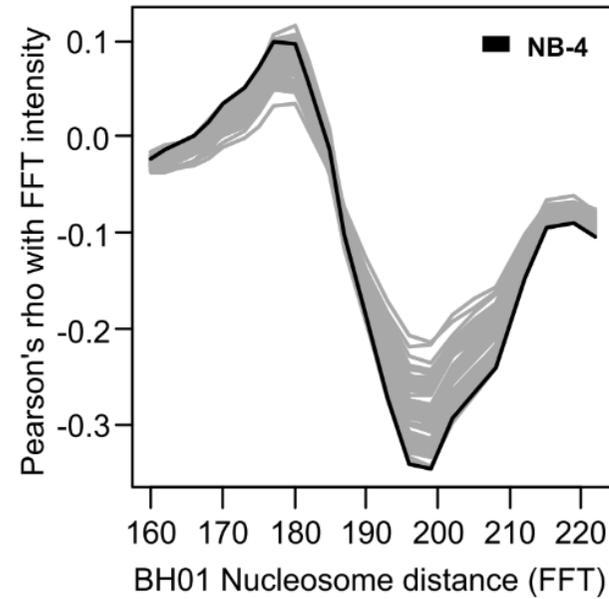
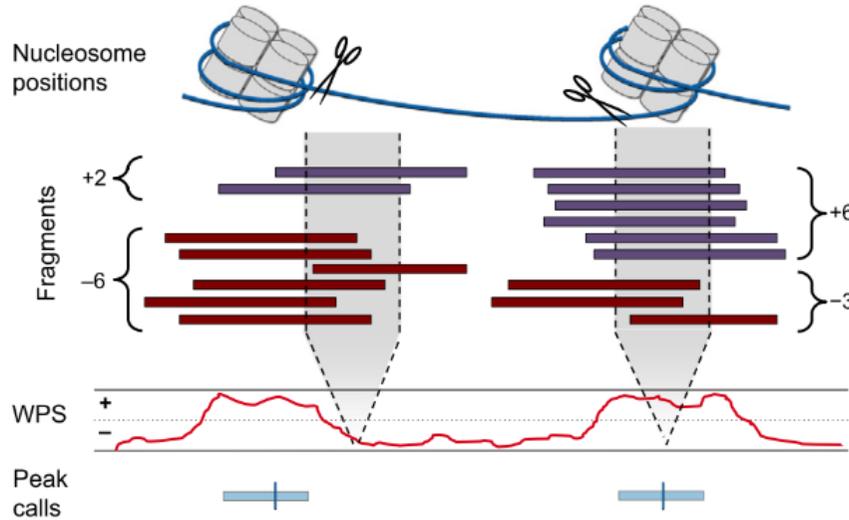
ctDNA seqを用いることにより、 多発がん症例の再発時の原発巣の特定



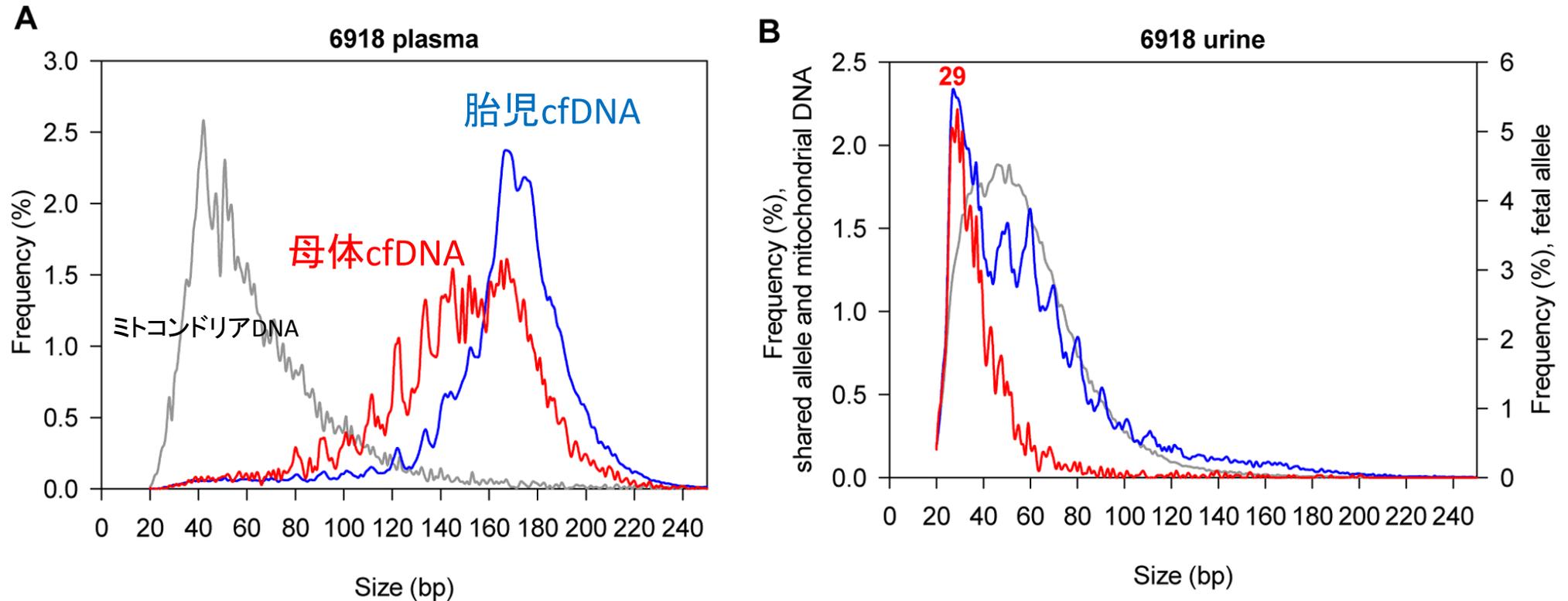
Forsheo, T. et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci. Transl Med.* 4, 136ra68 (2012).

tagged ampliconで変異を検出

ctDNAのWGSによる由来細胞推定



尿中ctDNA



尿中fragmentの長さは血漿より短い(Tsui et al.PLoS ONE 2012)
→尿中nuclease活性が高いため(Nadano D, Clin Chem 1993)

Tsui, N. B. Y. et al. High resolution size analysis of fetal DNA in the urine of pregnant women by paired-end massively parallel sequencing. *PLoS ONE* 7, e48319 (2012)

Nadano, D., Yasuda, T. & Kishi, K. Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin. Chem.* 39, 448–452 (1993).

尿中ctDNA

FFPEで評価したKRAS変異と尿中cfDNAで検出したKRAS変異の一致性について

Table 3. Concordance assessment of *KRAS*^{G12/G13} mutations in FFPE tumor tissue and urine cfDNA from patients with advanced cancers

Concordance for urine samples collected before systemic therapy tested for *KRAS*^{G12/G13} mutations versus FFPE tumor samples tested in the clinical laboratory

	<i>KRAS</i> ^{G12/G13} mutation in tumor	<i>KRAS</i> ^{G12/G13} wild-type in tumor
Number of patients, <i>N</i> = 71		
<i>KRAS</i> ^{G12/G13} mutation in cfDNA, number of patients	30	1
<i>KRAS</i> ^{G12/G13} wild-type in cfDNA, number of patients	18	22
Observed concordance	52 (73%); kappa, 0.49; SE, 0.09; 95% CI, 0.31-0.66	
Sensitivity	63% (95% CI, 0.47-0.76)	
Specificity	96% (95% CI, 0.78-1.00)	
PPV	97% (95% CI, 0.83-1.00)	

Concordance for urine samples (>50 mL of urine) collected before systemic therapy tested for *KRAS*^{G12/G13} mutations versus FFPE tumor samples tested in the clinical laboratory

	<i>KRAS</i> ^{G12/G13} mutation in tumor	<i>KRAS</i> ^{G12/G13} wild-type in tumor
Number of patients, <i>N</i> = 43		
<i>KRAS</i> ^{G12/G13} mutation in cfDNA, number of patients	19	0
<i>KRAS</i> ^{G12/G13} wild-type in cfDNA, number of patients	10	14
Observed concordance	33 (77%); kappa, 0.55; SE, 0.11; 95% CI, 0.34-0.77	
Sensitivity	66% (95% CI, 0.46-0.82)	
Specificity	100% (95% CI, 0.77-1.00)	
PPV	100% (95% CI, 0.82-1.00)	

Concordance for urine samples (90-110 mL of urine) collected before systemic therapy tested for *KRAS*^{G12/G13} mutations versus FFPE tumor samples tested in the clinical laboratory

	<i>KRAS</i> ^{G12/G13} mutation in tumor	<i>KRAS</i> ^{G12/G13} wild-type in tumor
Number of patients, <i>N</i> = 19		
<i>KRAS</i> ^{G12/G13} mutation in cfDNA, number of patients	8	0
<i>KRAS</i> ^{G12/G13} wild-type in cfDNA, number of patients	2	9
Observed concordance	17 (89%); kappa, 0.79; SE, 0.14; 95% CI, 0.52-1.00	
Sensitivity	80% (95% CI, 0.44-0.97)	
Specificity	100% (95% CI, 0.66-1.00)	
PPV	100% (95% CI, 0.63-1.00)	

A quantitative, mutation-enrichment next-generation sequencing test

Fujii T., et al Mutation-Enrichment Next-Generation Sequencing for Quantitative Detection of KRAS Mutations in Urine Cell-Free DNA from Patients with Advanced Cancers. *Clin Cancer Res.* 2017 Jan 17. doi: 10.1158/1078-0432

まとめ

ctDNA解析技術の臨床応用について

1) 癌種別の臨床的な局面

- 1) 再発早期発見
- 2) 治療感受性の評価
- 3) 薬剤の選択

2) がん多様性の克服の3法←ctDNA役割

1. 遺伝子変異のclonalityの評価
2. 担癌状態で、どの変異がdominantか確認
3. 抵抗性クローンと感受性クローンの比率

3) 一般のがん検診にむけて

1. 原発臓器の特定 = ctDNA変異、WGS、メチル化
2. 検体の種類 = 実際の応用に即した形を！