

論 文 内 容 要 旨

Prognostic value of circulating tumour DNA in patients
undergoing curative resection for pancreatic cancer

(膵癌術後患者における circulating tumour DNA 検出の意義)

British Journal Of Cancer, in press

主指導教員：末田 泰二郎 教授

(応用生命科学部門 外科学)

副指導教員：檜山 英三 教授

(広島大学自然科学研究支援開発センター)

副指導教員：村上 義昭 准教授

(応用生命科学部門 外科学)

羽田野 直人

(医歯薬学総合研究科 医歯薬学専攻)

【背景】 膵癌は、浸潤・転移傾向が強く、ヒト固形がんの中でも極めて予後不良な難治癌である。厚生労働省発表の人口動態統計によると年間死亡離者数は増加傾向で、2009 年は 26,791 人が罹患し、部位別死亡原因の第 5 位である。また、根治切除後の再発率も極めて高く、切除例の 5 年生存率は 10% 程度にすぎない。膵癌の予後を改善するためには、できるだけ早期に診断し、確かな治療を行うことが重要であるが、有効なスクリーニング法が確立されていないことが大きな問題である。現在のところ、膵癌の診断用マーカーとして、癌胎児性抗原 Carcinoembryonic antigen; CEA や糖鎖抗原 carbohydrate antigen 19-9; CA19-9、DUPAN-2, Span-1 等が知られているが、これらはいずれも膵癌に特異的なマーカーではなく疑陽性が多い、またその一部は膵癌と膵炎とを区別できないものがあるなど、膵癌の早期診断、予後の予測には有効でないと考えられており、今後は有効なバイオマーカーの開発が急がれている。

近年、患者の血清、尿、胸水、腹水、脊髄液などの体液から採取された細胞の混入の無い DNA (cell-free DNA : 以下 cfDNA) が、様々な疾患の新しい解析の対象として注目されている。この基盤技術により、癌が進展していく経過で循環血液中に放出される、腫瘍細胞から抽出される cf DNA 中の癌遺伝子 (circulating tumor DNA: 以下 ctDNA) を検出することは、早期診断、再発のマーカー、また化学療法に対する治療効果判定・モニタリングに非常に有用である可能性がある。大腸癌、肺癌、乳癌などにおいては、それぞれの癌遺伝子に関連した ct DNA の研究報告がみられるようになり、生命予後の重要な指標になると予測されている。膵癌においては初期段階から高率に KRAS の点突然変異が起きていると考えられており、癌が進行していく過程で循環血液中に放出される腫瘍細胞から KRAS 遺伝子変異を検出し、定量化できれば、有用な膵癌診断のバイオマーカーとなる可能性がある。

【目的】 本研究は既存のリアルタイム PCR の限界を超える能力を有する第 3 世代の PCR と呼ばれる Droplet Digital PCR (以下 ddPCR) システムを用いて、膵癌患者における ctDNA の検出、定量化を行い、膵癌診断、治療における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。ddPCR システムは、検量線の必要性を排除することにより、ターゲット DNA 定量の革新的なアプローチが可能となった。この ddPCR システムの登場により、これまでにできなかった極低濃度のサンプルにおけるターゲット DNA の検出や、絶対的な定量が可能となった。

【対象】 広島大学病院で膵癌切除を施行した浸潤性膵管癌 105 切除例を対象とした。術前採取した患者血漿中に KRAS 遺伝子変異を検出した症例を ctDNA

陽性群とし、既存の腫瘍マーカーを含む各種臨床病理学的因子と長期予後との関連性、また Resectability (NCCN ガイドライン 2015) からみた ctDNA 測定の意義を検討した。

【方法】 対象から採取した末梢血約 8mL を EDTA 入り血液スピッツに回収し、遠心分離にて血漿のみを抽出した。その血漿中 200 μ L から QIAGEN QIAamp® DNA Blood Kit を用いて ctDNA を抽出し、Bio RAD QX100 Droplet Digital PCR システムを用いて膵癌患者血漿中の KRAS 遺伝子変異を検出、定量した。

【結果】 105 例中 33 例 (31%) から ctDNA が検出された。ctDNA 陽性群の全生存期間 (OS) 中央値は陰性群と比し有意に予後不良であった (13.6M vs. 27.7M, $P < 0.0001$)。OS 予後因子解析では単変量解析において術前血清 CA19-9 高値、リンパ節転移陽性、臨床病期、ctDNA 陽性の 4 因子が抽出され、多変量解析ではリンパ節転移陽性 [HR = 2.2, 95%CI: 1.1-4.2, $P = 0.02$]、臨床病期 [HR = 2.0, 95% CI: 1.1-3.5, $P = 0.02$]、ctDNA 陽性 [HR = 3.2, 95% CI: 1.8-5.4, $P < 0.001$] の 3 因子が独立した予後不良因子であった。ctDNA 陽性例は術前の画像診断における Resectable 症例 ($n = 52$) のみで行ったサブグループ解析においても有意な予後不良因子であった ($P = 0.001$)。

【結語】 ctDNA の予後予測バイオマーカーとしての有用性が示唆された。また ctDNA 陽性例は画像診断上の Resectable 症例においても、画像診断では検出できない微小転移を反映している可能性が示唆され、術前判断可能となるバイオマーカーとして有用な指標になる可能性がある。