

博士論文

卵巣癌患者における Circulating tumor DNA の

Digital Droplet PCR を用いた測定は

新たなバイオマーカーになりうる

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

発生・発達医学講座 婦人科学分野

湊 敬道

略語..... - 2 -

要旨..... - 4 -

研究背景..... - 6 -

方法..... - 15 -

研究結果..... - 21 -

考察..... - 25 -

結論..... - 32 -

謝辭..... - 33 -

文献..... - 34 -

図表..... - 49 -

略語

CA125 Carbohydrate Antigen 125

ddPCR digital droplet PCR

FIGO International Federation of Gynecology and Obstetrics

NAC neoadjuvant chemotherapy

IDS interval debulking surgery

cfDNA cell free DNA

ctDNA circulating tumor DNA

EGFR Epidermal Growth Factor Receptor

ERBB2 erb-b2 receptor tyrosine kinase 2

MET mesenchymal-epithelial transition

ALK anaplastic lymphoma kinase

ROS1 c-ros-1

RET rearranged during transfection

TP53 tumor protein p53

ARID1A AT-rich interactive domain-containing protein 1A

PIK3CA Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alph

CT Computed Tomography

MAF mutant allele fraction

TTP time to progression

FFPE Formalin-fixed paraffin-embedded tissues

PET-CT Positron Emission Tomography

ccfDNA circulating cell free DNA

WES Whole Exome sequencing

要旨

卵巣癌は婦人科領域の難治性腫瘍であり、根治的手術や術後補助化学療法により腫瘍組織を寛解に至っても、数年以内に再発することが多い。従来の腫瘍マーカーである CA125 (Carbohydrate Antigen 125) は、腫瘍切除後の経過観察に広く用いられているが、炎症などの他要因による影響を受けた場合に偽陽性を示し、また再発腫瘍が必ずしも CA125 の上昇を伴わないため偽陰性の可能性もある。

近年の liquid biopsy の発展により癌抗原マーカーのみならず、腫瘍細胞由来の DNA 断片つまり Circulating tumor DNA (ctDNA) の検出が可能になった。ctDNA を計測することにより、卵巣癌再発の早期診断するための課題を克服することが期待されている。

本研究では digital droplet PCR (ddPCR) 技術を用いて、寛解を得て経過観察中の卵巣癌患者の ctDNA を計測した。対象となる患者には研究の説明を行い、同意を得た。それぞれの患者からは、複数回にわたって連続的に外来受診の際、CA125 の測定と ctDNA 検出用の血漿を採取した。対象患者の初回手術時に摘出した腫瘍組織から抽出した DNA の全エクソームシーケンスにより、腫瘍特異的な変異を同定し、患者ごとに ddPCR プローブを選択した。

11 例中 6 例が経過観察中に画像診断により再発を認め（平均無増悪生存期間は 348.3 日）、6 例すべてに ctDNA が ddPCR により検出された。その 6 例中 5 例で CA125 の上昇前に ctDNA を ddPCR で検出した。ctDNA の対立遺伝子頻度の増加は、再発後の腫瘍量の増加と関連していた。また画像診断での再発日を基準として、CA125 の増加よりも早く ddPCR により ctDNA が検出された（ddPCR は 49 日前、CA125 は 7 日後： $p < 0.05$ ）。再発していない症例の血漿には ctDNA は検出されなかった。

本研究の結果は、ctDNA が CA125 よりも鋭敏かつ定量的に卵巣癌の再発を反映することを示し、ctDNA が卵巣癌治療後のフォローアップにおいて理想的なマーカーであるという仮説を支持するものであった。

結論：ddPCR による ctDNA の測定は、卵巣癌再発の早期発見方法としてのバイオマーカーとなりうる。

研究背景

婦人科腫瘍は卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、膣癌、外陰癌に分類される。卵巣癌は婦人科悪性腫瘍における死因の第1位であり、女性の癌死で5番目に多い疾患である[1]。世界的には毎年約23万人以上が卵巣癌を発症し、発生率は加齢と共に上昇し、70歳代でもっとも高くなる[2]。本邦では、毎年約9,000人が卵巣癌と診断され、4,500人が卵巣癌で死亡している[3]。さらに、東欧・南欧諸国やアジアでも卵巣癌が増加している報告があり[4]、卵巣性腫瘍の90%は上皮性の悪性腫瘍である。組織型は漿液性癌、明細胞癌、類内膜癌、粘液性癌などに分類される。本邦での各組織型での割合は漿液性癌33.2%、明細胞癌24.4%、類内膜癌16.6%、粘液性癌9.1%と報告されている[5]。

主な組織型は上述の通り高異型度漿液性癌であり、化学療法感受性は高いものの、再発をきたす頻度が高く予後は不良である[6]。明細胞癌は半数ほどがI期で診断され、進行例は多くはないが、化学療法感受性は低く難治性である。類内膜癌の多くは低異型度であり、粘液性癌も進行例は少ないが、化学療法抵抗性である[7]。

日本産科婦人科学会では、FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) による手術進行期分類を用いており、FIGO2014 進行期分類 (FIGO2014) にしたがった進行期分類を採用している。I期は卵巣ないしは卵管内に限局して発育

し、II期はさらに子宮や直腸・膀胱といった骨盤内臓器に進展する。III期・IV期を進行癌と呼び、III期は腹膜播種やリンパ節転移を認め、腹膜播種を除く遠隔転移を有する場合はIV期と定義されている[8]。

初回手術で病巣を切除し、組織型と進行期を決定し、一部の早期癌を除き術後補助療法として薬物療法を行う。薬物療法はカルボプラチンやシスプラチンといった白金製剤を軸とした多剤化学療法が標準治療とされており、パクリタキセルとカルボプラチンの併用療法が最も頻用される[9]。

病巣の完全摘出を目指した最大限の腫瘍減量術が原則ではあるが、広汎な腹膜播種や転移巣を有するために完全摘出が不可能と予想される場合や、多量腹水や重篤な合併症のために手術が困難と予想される場合には術前化学療法（neoadjuvant chemotherapy; NAC）を施行後に手術（interval debulking surgery; IDS）を行うことが推奨される [10]。

進行癌の半数以上が再発し、再発後の生存期間の中央値はおよそ2年と非常に予後不良である [11]。前回化学療法終了後から再発と診断されるまでの期間が、6か月以上の再発を白金製剤感受性再発、6か月未満の再発を白金製剤抵抗性あるいは不応性再発と定義され[12]、白金製剤抵抗性/不応性再発症例に対する有望な標準治療はない [13]。イリノテカンやゲムシタビン、リポソーム化ドキソルビシンといった非

白金製剤の選択肢もあるが、奏効率が 10~20%、無増悪生存期間の中央値が 3~4 ヶ月、と十分な効果があるとは言い難い[14]。外科手術が進歩し、有効な化学療法剤が開発されたにもかかわらず、数年以内に再発するため、進行した卵巣癌患者の生存成績は依然として十分改善したとはいえない[15]。初期の卵巣癌は自覚症状がないため、前述したように 40~50%の症例はステージ III あるいは IV で診断されている。報告されているステージ III および IV の卵巣癌の 5 年生存率は、それぞれ 48.2%と 30.5% であり、進行卵巣癌の予後が悪い理由は、原発巣を完全に切除しても再発が多いためである[16]。

Carbohydrate Antigen 125 (CA 125)は、MUC16 遺伝子にコードされるムチン型糖タンパク質で、細胞膜に結合している。このバイオマーカーは、卵巣病変に最もよく用いられている。1980 年代初頭、Bast らが、健康な卵巣組織と比較して、癌の卵巣組織でモノクローナル抗体 OC125 を特異的に分離したことから、使用されるようになった[17]。正常上限値は閉経前後の患者で 35U/mL と定義されている[18]。しかし、この測定法は、卵巣癌の初期段階では感度が低い（ステージ I の 23~50%で上昇すると報告されている）[19]。さらに、他の生理的・病的状態（月経、妊娠、子宮内膜症、腹膜の炎症性疾患）でも、CA125 値の上昇が認められることがある[20]。Ferraro

らによるメタアナリシス[21]では、卵巣癌の検出における CA125 の感度は 79%、特異度は 78%であった。

CA125 は、卵巣嚢腫が観察されたときに、悪性腫瘍との鑑別目的に頻繁に測定されている。しかし、良性疾患である子宮内膜症でも CA125 値の上昇が認められることが明らかとなり、高い確率で偽陽性となっている[22]。このことは、最近の Cochrane Review でも確認されている。調査対象となった 97 種類のバイオマーカーのうち、CA125 は子宮内膜症の症例で上昇する唯一のマーカーであり、感度は 40%、特異度は 91%、カットオフリミットは 35U/mL であったと報告されている。Hirsch らは、ごく最近の別のメタアナリシスにおいて、CA125 は子宮内膜症の診断に有用であり、特に病状に応じて感度が上昇することを示した[23]。

実臨床において CA125 は卵巣腫瘍の悪性度の指標および再発診断のスクリーニングとして頻用されるが、様々な生理的状況で値の上昇が認められることから、必ずしも最善の腫瘍マーカーとはいえない。このため、卵巣悪性腫瘍の診断精度を向上させる、あるいは治療効果や予後の指標を得るために、新しいバイオマーカーを探索する研究が行われている。血清癌抗原以外の例を挙げると *BRCA1* または *BRCA2* の変異が予後マーカーであることが報告されている。特に *BRCA2* の変異を有する卵巣癌患者は生存率が高いと報告されている[24]。

卵巣癌の再発を検出するために、卵巣癌治療後のフォローアップでも、CA125 を測定することが多い。米国国立衛生研究所の声明では、治療終了後の卵巣癌のフォローアップのために問診、身体的初期検査、診察、CA125 の測定を行うことが推奨されており[25]、臨床の現場では卵巣癌の再発を検出するために CA125 を測定していることが多い[26]。再発診断における CA125 は、陽性適中率は高いが感度は低いとされる[27]。血清中での生物学的半減期が長いため、治療効果の傾向を示すための継続的な臨床測定に有用であるが、CA125 を 1 回測定しただけでは、偽陰性を否定することはできない[28]。また、CA125 は腫瘍の絶対量を直接反映していないため、その値は卵巣癌患者内および患者間で不均一である可能性がある[29]。そのため、CA125 の絶対値ではなく、周期的な変化に基づいて卵巣癌の再発を早期に診断することが検討されている。日本のガイドライン[30]では、卵巣癌再発の指標として、正常範囲内であっても 3 回連続して上昇した場合[31]、10U/ml 以上の上昇があった場合[32]、1 ヶ月間で 25U/ml 以上の上昇があった場合[33]を推奨している。

原則として再発診断は、画像診断や組織診断に基づいてなされるが、頻繁に実施できる方法ではないことと、被曝を含む侵襲が問題視されている。CA125 を指標とした早期再発診断による予後の改善は現時点では否定されているが、より早く確実な再発診断が予後の改善や治療選択の指標になりうる可能性はある。

本研究は CA125 より優れたバイオマーカーを探索することを第一の目的とした。

癌の診断を目的とした liquid biopsy と呼ばれる技術がある。侵襲の少ない方法で採取できる液体サンプル（血漿や尿を含む）を用いる liquid biopsy は、腫瘍の形成や進行を検出するための有用なバイオマーカーとなり得る [34]。血漿は、全身を循環しているため、腫瘍を含むさまざまな組織や細胞に由来する断片化された DNA を含んでおり、全身の腫瘍プロファイルを包括的に把握できると考えられている。

血液中に核酸が存在することは 1948 年に Mandel と Metais らによって初めて報告された [35]。cfDNA（cell free DNA）は体内の細胞から血中に放出された DNA 全般を指すもので、癌患者のみならず、健常人にも検出される。cfDNA の血中への放出には、apoptosis を始め necrosis や active secretion、血中循環細胞からの放出などが関与する [36]。担癌患者の cfDNA には腫瘍細胞から放出された ctDNA（circulating tumor DNA）が含まれ、ctDNA には腫瘍に生じた DNA 変化が継承されており、侵襲を伴う生検や手術を行うことなく血液から腫瘍の DNA 情報を入手可能である。

内視鏡や針で組織を採取する従来の生検技術は侵襲を伴い、また、腫瘍組織の一部しか採取できないため、得られる情報が部分的なものである可能性がある。早期癌患者の循環血中にも癌細胞から放出された、正常細胞にはない変異を伴った ctDNA

が含まれていることが明らかになってきた[37]。特に ctDNA は、手術後の再発を検出するツールとして、活発に研究されている[38]。

Diehl らは、大腸癌患者の ctDNA を定量し、ctDNA が、再発病変の検出において血清マーカーCEA を上回ることを示した[39]。さらに、Allegretti らは、術後1回目のフォローアップにおける ctDNA の有無が、早期の再発および非再発と関連していることを報告した。彼らの研究では、血清 CEA レベルと組み合わせて分析した場合、ctDNA 結果の感度が上昇したことが報告されている。これらの研究は、ctDNA が大腸癌の微小残存病変のバイオマーカーであることを示唆している[40]。非小細胞肺癌では、ctDNA により、*EGFR*、*ERBB2*、*MET*、*ALK*、*ROS1*、*RET* など、いくつかの実用的なゲノム変異の同定とモニタリングが可能になった[41]、[42]。

卵巣癌の再発バイオマーカーとして CA125 と ctDNA を比較した研究が報告されている[43]。Pereira らは Digital droplet PCR (ddPCR) 技術を用いて、CT (Computed Tomography) 検査の所見に先立って ctDNA が上昇することを報告した[44]。高異型度漿液癌は体細胞性 *TP53* 変異が特徴的である。Parkinson らはその特徴を利用し、患者特異的な *TP53* プローブを開発した。血漿サンプルの ctDNA の解析を、個別に作成したプローブを用いて ddPCR を行った。その結果、ctDNA が治療開始時の病変量と相関していること、および化学療法後の *TP53* MAF (mutant allele fraction) の

減少が TTP (time to progression) の短縮と関連していることを示した。これらの結果は、高異型度漿液性癌の *TP53* 領域の ctDNA 測定が特異的バイオマーカーとなりうることを示す [45]。しかし、先行研究では、高異型度漿液性癌の ctDNA の *TP53* 領域に限定した研究であり、日本人の卵巣癌患者の 24% が罹患する明細胞癌は含まれていない。

ctDNA は卵巣癌患者にとって有効なバイオマーカーになりうる可能性を秘めているが、現段階では組織型が限定されており、CA125 と比較して際立って優位な結果は得られていない。

日本では、2018 年 12 月に 2 つの癌遺伝子プロファイリング検査 (Foundation One CDx[46]と NCC Oncopanel[47]) が承認され、2019 年 6 月からはこれらの検査が国民健康保険の対象となっている。この 2 つの検査では 100 以上の遺伝子がカバーされているため、liquid biopsy に使用できる ddPCR プローブの癌特異的な変異を比較的容易に特定することができると考えられる。今後、卵巣癌の治療においては、ゲノム情報を利用したバイオマーカーの発見と検出方法の確立が期待されている。治療後の卵巣癌のフォローアップにおいても、CA125 や画像検査との比較により、ddPCR による ctDNA 検出の有用性が示されれば、放射線検査による被曝量の軽減、治療介入タイミングの改善につながる可能性がある。

そこで本研究では、卵巣癌の2つの主要な組織型である漿液性癌と明細胞癌を対象とした。治療後の卵巣癌患者の血漿中の ctDNA を検出するために、市販の ddPCR 用プローブを用いて実験を行った。再発開始時期、再発時の腫瘍体積、無増悪生存期間と CA125 および ctDNA との関連性の解析を試みた。

以上の研究のシェーマを示した。(図 1)

方法

患者の背景

本研究は、宮城県立がんセンターの倫理委員会による承認を受けた上で実施した（登録 ID：2019-038）。

初回手術、術後補助療法治療を完了し、画像診断と CA125 の陰性判定により残存腫瘍がないと診断された患者を選定した。その結果、11 名の進行卵巣癌患者を対象として登録した。

選択基準

(1) 宮城県立がんセンター病院で 2016 年から 2019 年までに卵巣癌手術を受けた症例 93 例中より選択した

(2) 術前の CA125 陽性 (35 Units/ml) の症例

患者背景を表 1 に記載した。すべての患者から研究内容を書面で説明し、文書同意を得た。再発のタイミングは、造影 CT または PET-CT (Positron Emission Tomography) を専門の放射線科医師が読影した画像診断で新規病変が検出された場合とした。

抽出した臨床情報、治療歴、CA125 値、組織型を患者の医療記録から得た。

FFPE 試料からの DNA 抽出

手術で摘出した臓器は、10%中性緩衝ホルマリン液（060-01667、富士フイルム和光純薬株式会社、大阪）に浸透する。その後にパラフィン包埋（FFPE）標本として保存する。パラフィン包埋と組織スライドの作成は、ゲノム解析用の標準的なプロトコルを用いて行った。組織はパラフィンブロック（厚さ 5 μ M、10 枚）から切り出し、癌組織と正常組織の標本を別々にスライドガラスに貼り付けた。

11 組の癌組織と正常組織の標本は AVENIO Millisect System(Roche, Basel, Switzerland) を用いてスライドガラス上で癌組織、正常組織のマイクロダイセクションを行った。DNA 抽出のための領域の選択は、対応するヘマトキシリン-エオジン染色に基づいて顕微鏡的に選択した。(図 2)

選択した切片を回収し QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を用いて 6 段階の工程（パラフィン除去、溶解、加熱、結合、洗浄、溶出）を経て、FFPE より DNA を抽出した。

血漿採取と血漿からの DNA 抽出

治療後の経過観察期間中の CA125 検査の採血時（1~2 か月ごと）に、10ml の血液を採取した。サンプルの血液は PAX gene Blood ccfDNA Tube (Becton Dickinson,

Franklin Lakes, NJ, USA) に回収した。血液を $1900 \times g$ で 15 分間、室温で遠心分離し、上澄である血漿を別の DNA LoBind Tube (0030108051 ; Eppendorf Germany) に移した。血漿を $1900 \times g$ で 10 分間、室温で遠心分離し、残った白血球を除去した。得られた血漿を凍結し、circulating cell free DNA (ccfDNA) を精製するまで -80°C で保存した。

血漿から ccfDNA を抽出するために、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (55114; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) を使用した。その工程で cfDNA は選択的に QIAamp Mini column に結合し、不純物は除去される。また 2 価の陽イオンおよびタンパク質などの PCR 阻害物質は、3 回の効率的な洗浄ステップにより完全に除去される。以上の工程によって得た高純度の ccfDNA をバッファーで抽出した。

全エクソームシーケンスとバイオインフォマティクス解析

各患者の FFPE 標本の腫瘍組織と正常組織の双方から抽出した DNA を、全エクソームシーケンス (Whole Exome sequencing : WES) に供した。WES は日本マクロジェン株式会社に委託し、Novaseq 6000 を使用した。バイオインフォマティクスの手順 (図 3A) は、FFPE 検体へのホルマリン固定の影響に適した変異検出に基づいて行った [48] [49]。raw data のリードをトリミングした後、BWA-MEM を用いてペアリードを hg38 リファレンスにマッピングした [50]。バリエントコーリングは Genome

Analysis Toolkit 4.1 [51]の Mutect2 を用いて行い、正常パネルは 11 検体の正常組織データで構成した。フィルタリング条件は false discovery rate = 0.01、unique alt read count = 20、min allele fraction = 0.1、minimum depth = 100 とした。検出されたバリアントのアノテーションは、カスタムメイドの 4.7KJPN バリアントデータセットと COSMIC 90 [52]を用いて Annovar [53]で行なった。その際、liftOver ソフトウェア[54]を用いた。4.7KJPN のバリアントデータセットは hg19 リファレンスを用いているため、hg38 を hg19 に変換した。

Digital droplet PCR

ddPCR は、デジタル計測が DNA の高感度検出に利用される新しいアプローチであり、従来の qPCR に代わってさらに高い精度による絶対定量を行うことができる。特徴的な工程としては、DNA サンプルを微細な仕切りの中に分配し PCR 反応を行うことである。この仕切りの仕様には油滴を利用したドロップレット技術が用いられている。ドロップレット技術では、PCR 反応させる仕切りとして 20,000 個もの分画が可能であり、各仕切りは 1 分子単位の分画が可能である。PCR 反応後、各分画ごとに、目的の分子を含むか（シグナルが陽性：デジタル的に【1】）、含まないか（シグナル

が陰性：デジタル的に【0】）をシグナルの有無で計測し、それぞれの分画のシグナル数を、ターゲットのコピー数として換算し、絶対定量を可能にしている。(図 4)

今回は BIORAD ddPCR Mutation Assay (Bio-Rad, Hercules, CA) より FFPE サンプルの WES で同定された体細胞変異に対する市販のプローブを選択した。各検体のエキソームより腫瘍特異的な変異を同定し、Allele Frequency が十分な変異を選定した。さらに Pathogenic~Variant of Unknown Significance に合致する変異を選定し、それらの中から Bio-Rad 社のカタログに合致する 11 サンプル分のプローブを選択した。QX200 AutoDG Droplet Digital PCR IVD System (Bio-Rad Hercules, CA) を用いて ddPCR を行った。各 PCR 反応には、 $8\mu\text{l}$ の溶出 ccfDNA (平均の DNA 量は $0.128\mu\text{g}$) を用いた。PCR 反応の総量は $40\mu\text{l}$ (20,000 液滴) とした。PCR 条件は、 95°C で 10 分間の 1 サイクル、 94°C で 30 秒、 55°C で 1 分間の 40 サイクルステップ、最後に 98°C で 10 分間の条件で PCR を行った。プローブの蛍光色素は FAM/HEX を使用し、野生型と変異型を測定した。すべての ddPCR よる測定は少なくとも 2 回行った。すべてのプローブについて、対応する腫瘍組織から抽出した DNA を用いて、ddPCR による ctDNA の検出効率を検証した。Allele frequency (AF) は、1 つの時点での変異型シグナルドット (FAM)、または連続した時点での 2 つ以上の変異型シグ

ナルドットが、野生型シグナルドット (HEX) の存在下で存在する場合に、以下の式を用いて算出した。

$$AF(\%) = \text{変異型ドット (FAM)} \times 100(\%) / \text{変異型ドット (FAM)} + \text{野生型ドット (HEX)}$$

画像解析

再発した 6 名の患者に対して、再発の治療前後の CT 画像のボリューム解析を行った。再発時の CT の腫瘍体積は Aquarius iNtuition Edition version 4 (TeraRecon, Durham, NC) を用いて算出した。ctDNA 量と腫瘍ボリュームとの相関を見るため代表的な評価可能病変を一つ選択した。

統計解析

腫瘍量と ddPCR で検出された AF との相関関係は、Pearson の相関係数を用いて解析した。CA125 と ddPCR の再発との比較は Student's t-test を使用し、Kaplan-Mayer 無増悪生存曲線は、JMP 15pro ソフトウェア (ver.15) を用いて描画した。双方の有意水準は $P < 0.05$ とした。

研究結果

エクソーム解析と ddPCR プローブの選定

本研究における卵巣腫瘍は、高異型度漿液性癌、明細胞癌、およびこの 2 種類の組織の混合癌（それぞれ 6 例、4 例、1 例）が登録された。卵巣癌とその周辺の正常組織の DNA を FFPE より抽出した。合計で 590ng~4,480ng の全ゲノム DNA が得られた。（図 5）

バリエーションコールを上述した条件で処理することで、FFPE サンプルの保存期間や固定期間の長さに関わらず、妥当な結果が得られ、ホルマリン固定に起因する潜在的な偽陽性を取り除くことができた[48] [49]。

エクソームデータは、表 3 と図 3B に示す。腫瘍特異的な遺伝子変化の平均数は 66 で、以前の研究[48]と同様であった。手術前に術前化学療法を受けたのは 11 例中 1 例のみで、サンプル間の DNA の質的な違いは検出されなかった。本研究における WES の目的は、ddPCR 解析に適切な腫瘍特異的な変異を同定することである。全症例で ddPCR プローブが市販されている変異が少なくとも 1 つは認められた(表 2)。変異スペクトルは、典型的な卵巣癌の変異パターンを示していた(図 3B)。高異型度漿液性癌では体細胞性変異 *TP53* 変異が確認され、本研究で解析した明細胞癌では *ARID1A* および *PIK3CA* 変異が確認された。

ctDNA は、再発例において CA125 より早期に検出された

卵巣癌のフォローアップマーカーとして、ctDNA と CA125 レベルを比較した。CT で再発が確認された時点で、ctDNA と CA125 はともに陽性であった。図 6 は、これら 6 例の癌特異的変異を伴う ctDNA、CA125、および総 ccfDNA の時間経過を示したものである。

症例 1 は 高異型度漿液性癌の再発症例である (図 6A)。症例 2 は明細胞癌の再発症例であり、ctDNA が先に陽性となり、治療の効果に沿うように ctDNA が推移した (図 6B)。症例 3 は明細胞癌の再発症例 (図 6C)、症例 4 (図 6D) と症例 5 (図 6E) は高異型度漿液性癌の再発症例、症例 6 は明細胞癌の再発症例である (図 6F)。

症例 1、4、5 は再発腫瘍に対して外科的切除を施行し、症例 1 では再発手術後に維持療法を継続した (図 6A、D、E)。これらの症例では、CA125、ctDNA の低下を認めた。症例 2 と 3 (図 6B と C) は原疾患で死亡し、観察期間中に CA125、ctDNA が上昇した。これらの結果から、ctDNA が病状を反映すると考えられ、経過観察に有用である可能性が示唆された。

次に、ctDNA が CA125 の上昇よりも早く卵巣癌の再発を検出できるのか検討した。図 6 に示すように、再発した 6 例のうち 5 例 (症例 1、2、4、5、6) では、腫瘍特異的な ctDNA が CA125 よりも早い時期に陽性になった。症例 1 の経過では、観察期

間中、CT 画像に再発腫瘍が現れた時には、CA125 は基準値である 35U/ml を超えていなかった。症例 3 は ccfDNA の急激な増加を示したが、CT 画像でも CA125 でも、6 ヶ月間は再発と診断することはできなかった (図 6C)。この症例で ccfDNA が増加した原因は、卵巣癌の病状とは無関係の可能性があり、明確な原因の特定には至らなかった。症例 1 では、再発手術後は腫瘍の消失を維持し、10 ヶ月間、すべてのマーカー (ctDNA、CA125) でも陰性となった (図 6A)。再発を認めてない 5 症例はすべて、追跡調査中にすべてのマーカーの増加を示さなかった。本研究の観察では、腫瘍特異的な変異の ctDNA 検出は、CA125 よりも 5 例で感度が高かった (図 6 A、B、D、E、F)。

ctDNA の AF の相対的变化は、腫瘍体積の変化と相関する

CT 画像での腫瘍体積の増減を、各症例の直前に測定した ctDNA の AF と比較した。再発病巣が一か所であり、かつ AF の変化が正確に測定された 4 例を研究対象とした。他の 2 例は、再発病変が複数あり正確な計測と定量化が困難であったため、本解析から除外した。測定した腫瘍画像と ctDNA および腫瘍体積の変化を図 7 に示す。腫瘍体積の増減は ctDNA と正の相関があった (Pearson $r = 0.93$)。この相関関係は、治療効果を ctDNA で代用できることも示唆している。卵巣癌では、他の種類の癌と

同様に、腫瘍体積は治療に対する反応と負の相関があることが示された [50]。このことは、AF を見ることで画像診断のタイミングを決定する、すなわち頻回の被曝を回避できる可能性がある。

卵巣癌の画像診断による再発まで期間は、ctDNAの方がCA125よりも短い

血液検査から画像診断による再発診断までの中央値は、ctDNAが-49日、CA125が+7日であり、有意な差が認められた（それぞれ95%CI：-95.8-5.85、95%CI：-29.1-53.7、 $p=0.0495$ 図 8A）。本研究では、CA125の陽性値は35U/ml以上に加えて、1カ月毎の計測の結果が正常範囲内で3回連続して上昇した場合、また正常範囲内で徐々に10U/ml以上の上昇した場合、1回で25U/ml以上の上昇した場合を追加で陽性とした。

また治療後に採取した血液サンプルからddPCR法によりctDNAが検出された患者の無増悪生存期間（PFS）は、ctDNAが検出されなかった患者に比べて有意に短かった（ctDNA陽性患者のPFS中央値348日、Kaplan-Meier解析によるPFS、 $p=0.0038$ 、図 8B）。

考察

再発例全例で ctDNA の検出

卵巣癌患者 11 名の FFPE 標本から抽出した DNA のエクソーム解析により、腫瘍特異的な変異を同定した。その中から選択した変異に対して設計された ddPCR プローブを患者ごとに選定し、観察期間中に再発した 6 名の患者すべてにおいて、ctDNA が検出された。ctDNA における AF の定量化により、再発検出における ddPCR の感度は高く、最大で 0.039% の AF で ctDNA が検出された。ctDNA の ddPCR の検出度は前研究の 0.01% [38] と比較しても遜色ないものと思われた。再発患者 6 名全例で ctDNA を検出できたことから、手術検体を用いたターゲット変異の同定、選別が適切であったことを示している。再発した組織型は高異型度漿液性癌、明細胞癌であったが ctDNA の放出量、時期に関連は認められなかった。同様に ctDNA と術前進行期に関連も認められなかった。

CA125 より早い ctDNA の変化

本研究では、ctDNA の AF の変化は CA125 の変化よりも早かった。治療後に採取した血液サンプルから ctDNA が検出された患者の PFS は、ctDNA が検出されな

った患者の PFS よりも有意に短かった。再発を確認されてない患者は研究終了時を打ち切りとして PFS として換算した。

これらの結果から、ctDNA の ddPCR による測定は、再発の検出や治療効果の推定において、CA125 よりも鋭敏かつ早いタイミングで再発を検出するマーカーである可能性が示された。

CA125 と CT 画像は、卵巣癌と子宮内膜癌で最も頻繁に使用されるサーベイランスモダリティである。しかし、CA125 はオプションとされており、CT 画像は米国 National Comprehensive Cancer Network のガイドラインで臨床的に指示された場合にのみ推奨されている [56]。CT 画像は、卵巣癌の再発を検出することが可能だが、放射線被曝の原因となり、高頻度での撮影は避けるべきであると言われている。したがって、卵巣癌のフォローアップには、血液中で検出可能な優れたマーカーが必要となる。

CA125 は、前述の通り、卵巣癌以外の組織にも広く発現しており、子宮内膜症、子宮筋腫、良性付属器腫瘍、および胆管癌などの他のタイプの悪性腫瘍で発現が変化していく。さらに、CA125 の半減期は 9~44 日と長くなると報告されている [57]。したがって、CA125 は腫瘍の変化に多少遅れて反応し、卵巣癌再発の最新の状態を反映していないと考えられる。

本研究の結果は、ctDNA が CA125 よりも正確に卵巣癌の再発の程度を反映することを示し、ctDNA が卵巣癌のフォローアップのための優れたマーカーであるという考えを支持するものであった。

Pereira[38]らの研究では、ctDNA は画像検査の前に平均 7 か月間（範囲は 1~11 か月）上昇することが示されたが、卵巣癌再発の検出という点で、血漿中の CA125 に対する ctDNA の優位性は明確には示されなかった。一方、本研究では、個別化された ctDNA の測定は、CA125 よりも早いタイミングで再発を反映するものと考えられた。

Parkinson らは、*TP53* 特異的な ddPCR プローブが、再発した高異型度漿液性卵巣癌の ctDNA の検出に有用であることを示した[45]。しかし、日本では、*TP53* 変異の少ない明細胞癌が多く[48]、高異型度漿液性癌のみを標的とした戦略は適用しがたい。本研究では、原発腫瘍に認めた患者特異的な変異を標的とした ctDNA を検出する方法を用いることで、卵巣癌の組織型や特定の変異遺伝子の範囲に限定されることなく、対象の拡充が可能となった。

日本では、プレジジョン・オンコロジーの実現に向けて、2019 年 6 月から 2 種類の癌遺伝子プロファイリング検査が健康保険適用されており[58]、これらのプロファ

イリング検査は日本で一般的に使用されている。このような背景から、個々の腫瘍標本のゲノム情報を得られやすくなり、ctDNA 研究がさらに展開する可能性がある。

腫瘍体積と AF 相関

未治療の肺癌を対象とした先行研究では、9名の患者において ctDNA レベルと腫瘍体積の間に有意な一致が見られた[59]。今回の研究では、4人の患者で腫瘍体積と AF の間に正の相関が確認された。

今後の研究課題

本研究にはいくつかの限界がある。各サンプルの塩基の変異に合わせて、Bio-Rad 社のカタログからプローブを選択した。既成プローブを用いて再発患者の血漿中の ctDNA を検出することが可能であり、市販の ddPCR プローブでも一定の品質が保たれていると考えられる。しかし、ddPCR プローブの選択において、すべての卵巣癌患者に対応する既製品があるとは限らない。明細胞癌に特徴的な変異である *ARID1A* の変異も検出されたが、同領域で今回の変異に合致するプローブは既成製品としては存在しなかった。そのため今回は *ARID1A* 以外の変異をターゲットとせざるを得なかった。

卵巣癌患者のフォローアップにおいて、AFの高い変異に対して、カスタムの ddPCR プローブを作成して同じ性能が得られるかどうかは、未検討である。またプローブ選択については個数や基準が明確となっていない。本研究のように単一のプローブを用いる測定方法は、ターゲットである変異が再発時に変化した場合には追跡不能になる可能性がある。しかし複数にすると偽陽性の可能性も出るという報告[60]もあり、今後の研究の課題の一つである。また転移形式によって ctDNA の放出量についても現段階では大きく差はない[61]とされているが、文献の研究はマウスを用いており、今後さらに人での検証が必要である。

本研究の弱点は、サンプルサイズが小さいことと、レトロスペクティブな研究デザインであることである。しかし、サンプル数が少ないにもかかわらず、すべての再発患者の血漿中に ctDNA が検出され、CA125 と比較して有意な差を示した。さらに、観察期間中に 5 人の未再発患者からは ctDNA を認めていない。陰性時であっても、6 か月毎で撮影される造影 CT または PET-CT スキャンでは明らかな腫瘍像は観察されず、特異性が高いことを示した。

本研究における陰性結果が再現性のあるものかどうかは不明である。具体的には未再発患者に、複数のプローブをテストしていないことが挙げられる。ddPCR の感度と特異性を示すためには、さらなる検証が必要であると考えられる。

本研究では、ctDNA を測定することで、CA125 を測定するよりも早く卵巣癌の再発を検出することが可能であることを示した。Rustin らの研究では、早期介入は卵巣癌患者にとってメリットがないことが示された[62]。しかしながら Rustin らの研究発表の当時は再発に対する治療薬は限られていた。当時は卵巣癌再発の治療にプラチナ単剤あるいはタキサンとの併用の割合が多かったが、それらの治療が再発腫瘍に必ずしも有効ではなかった可能性もある。現在は、数多くの分子標的薬が利用可能であり、ctDNA による卵巣癌再発の早期かつ正確な検出と組み合わせることで、ゲノム変異に応じた治療薬の選択も可能であり、卵巣癌再発の予後を改善する可能性がある。これらの新しい治療薬を用いた卵巣癌の追跡調査では、ctDNA 検出を再発マーカーとして追加し、早期治療介入の意義が再評価されるべきであると考えられる。

本研究では、卵巣癌再発の予測因子としての ctDNA の有用性が示唆された。今後の新薬の臨床試験付随研究として ctDNA の評価を取り入れることで、卵巣癌再発に対する ctDNA 検出の有効性を示すことができる可能性がある。また、ctDNA を用いた再発の早期発見は、その時点での治療介入が有効でないとしても、次のステップに向けての準備に役立つ可能性がある。現段階では、患者に適した臨床試験を特定、再発病変の根治治療となる 2 回目の手術の可能性を模索など、再発の早期発見によるメリットは複数想定される。

本研究の患者は、卵巣癌治療（外科的切除および化学療法）後に、一定のプロトコルに従ってフォローアップを受けた。患者毎に CA125 検査は 1 ヶ月または 2 カ月ごと、画像検査（造影 CT、PET-CT）は 6 カ月ごとに実施した。CA125 の値が正常範囲内にあるにもかかわらず、継続的に上昇するなど、再発が疑われる場合には、追加の画像検査を臨床診療の必要性に併せて実施した。このような検査スケジュール法は、がん診療を行う一般的な施設で実際に実施されている方法であり、今後より多くの症例を対象とした多施設共同研究にも応用可能である。現在、大腸癌では根治的外科治療を予定しているステージ II 期から IV 期を含む大腸がんの患者約 2,500 名を対象に、術後 2 年間、リキッドバイオプシーを用いた再発のモニタリング検査を行う臨床試験[63]を実施中である。また 1,240 名を対象に、従来の標準的治療である術後補助化学療法群と経過観察群とを比較する第 III 相試験 (VEGA 試験) [64] も開始されている。今回の成果を臨床に生かすためには、卵巣癌でも同様の大規模な臨床試験に ctDNA の検証を組み込み、得られた結果を治療へ還元する必要がある。

結論

- 1 : 卵巣癌治療後患者 11 例中 6 例が経過観察中に再発を示し (平均無増悪生存期間は 348.3 日)、6 例すべてにおいて ddPCR 解析で ctDNA が陽性となった。
- 2 : 6 例中 5 例で血漿 CA125 が上昇する前に ddPCR 解析で ctDNA が陽性となった。
- 3 : ctDNA の対立遺伝子頻度の増加は、再発後の腫瘍量の増加と関連している。
- 4 : 画像診断による卵巣癌再発の検出を基点とすると、ddPCR 解析において、CA125 の増加よりも有意に早く ctDNA のシグナルを検出した (-49 日 VS +7 日 : $p < 0.05$)。
- 5 : 再発していない症例の血漿には ctDNA は検出されなかった。

以上より本研究は ctDNA が卵巣癌における新たなバイオマーカーになりうることを示した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東北大学大学院医学系研究科婦人科学分野の八重樫伸生教授に深甚なる謝意を表します。

本論文をまとめるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました宮城県立がんセンター発癌制御部の安田純教授、そして宮城県立がんセンター研究所がん発癌制御部のスタッフの皆様は厚く御礼申し上げます。常にご指導・ご鞭撻を頂いた島田宗昭准教授(東北大学大学院医学系研究科・婦人科学分野)、徳永英樹講師(東北大学病院婦人科)をはじめとした産婦人科学分野の皆様は厚く御礼申し上げます。皆様のおかげで、充実した研究生生活を送ることができたことに心から感謝申し上げます。

社会人大学院生として臨床診療と研究活動を共に行えたのは、宮城県立がんセンター婦人科の山田秀和病院長、そして同婦人科・大友圭子先生、藤田信弘先生、海法道子先生をはじめとした多くの皆様のご支援・ご協力によるものであり、心より感謝申し上げます。

文献

- [1] R. Siegel, E. Ward, O. Brawley, et al. A. Jemal Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths CA Cancer J.Clin., 61 (2011), pp. 212-236
- [2] Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. J Clin Oncol. 2014;32:1302-8.10.1200
- [3] Shoji T, Komiyama S, Kigawa J, et al. An open-label, randomized, phase II trial evaluating the efficacy and safety of standard of care with or without bevacizumab in platinum-resistant epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer patients previously treated with bevacizumab for front-line or platinum-sensitive ovarian cancer: rationale, design, and methods of the Japanese Gynecologic Oncology Group study JGOG3023. BMC Cancer. 2018;18:771.10.1186

[4] Coburn SB, Bray F, Sherman ME, et.al. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype. *Int J Cancer*. 2017;140:2451-60.10.1002

[5] 婦人科腫瘍委員会報告 2017 年度患者年報：日産婦 2019;71：699-724

[6] Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:284-96.10.3322

[7] Gurung A, Hung T, Morin J,et.al. Molecular abnormalities in ovarian carcinoma: clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology*. 2013;62:59-70.10.1111

[8] 卵巣癌治療ガイドライン 2020 年度版：126-127

編集 日本婦人科腫瘍学会 金原出版

[9] Du Bois A, Lück HJ, Meier W, et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1320-9.10.1093

[10] Kehoe S, Hook J, Nankivell M, et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet.* 2015;386:249-57.10.1016

[11] Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;95(Suppl 1):S161-192

[12] Markman M, Rothman R, Hakes T, et al. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol* 1991;9:389-393

- [13] Markman M, Markman J, Webster K, et al. Duration of response to second-line, platinum-based chemotherapy for ovarian cancer: implications for patient management and clinical trial design. *J Clin Oncol.* 2004;22:3120-5.10.1200
- [14] Chan JK, Cheung MK, Husain A, et al. Patterns and progress in ovarian cancer over 14 years. *Obstet Gynecol.* 2006;108:521-8.10.1097
- [15] Bowtell DD, Böhm S, Ahmed AA, et al. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15:668-79.10.1038
- [16] Malpica A, Deavers MT, Lu K, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:496-504.10.1097
- [17] Bast RC, Jr., Feeney M, Lazarus H, et al. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* 1981;68:1331-7.10.1172

[18] Bast RC, Jr., Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 1983;309:883-7.10.1056

[19] Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:3695-700

[20] Buamah P. Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration. *J Surg Oncol.* 2000;75:264-5.10.1002

[21] Ferraro S, Braga F, Lanzoni M, et al Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: a systematic review. *J Clin Pathol.* 2013;66:273-81.10.1136

[22] Markman M. The Role of CA-125 in the Management of Ovarian Cancer. *Oncologist.* 1997;2:6-9

[23] Hirsch M, Duffy J, Davis CJ, et al. Diagnostic accuracy of cancer antigen 125 for endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *Bjog*. 2016;123:1761-8.10.1111

[24] Da Yang, Sofia Khan, Yan Sun, et al. Association of BRCA1 and BRCA2 mutations with survival, chemotherapy sensitivity, and gene mutator phenotype in patients with ovarian cancer. *JAMA* 2011 Oct 12;306(14):1557-65: 10.1001

[25] NIH consensus conference. Ovarian cancer. Screening, treatment, and follow-up. NIH Consensus Development Panel on Ovarian Cancer. *JAMA* 1995 Feb 8;273:491-7.

[26] Harmandayan GZ, Gao F, Mutch DG, et al. Ovarian cancer patient surveillance after curative-intent initial treatment. *Gynecol Oncol*. 2011;120:205-8.10.1016

[27] Rustin GJ, Nelstrop AE, Tuxen MK, et al. Defining progression of ovarian carcinoma during follow-up according to CA 125: a North Thames Ovary Group Study. *Ann Oncol*. 1996;7:361-4.10.1093

[28] Gu P, Pan LL, Wu SQ, et al. CA 125, PET alone, PET-CT, CT and MRI in diagnosing recurrent ovarian carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol.* 2009;71:164-74.10.1016

[29] Van Gorp T, Cadron I, Despierre E, et al. HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br J Cancer.* 2011;104:863-70.10.1038

[30] Tokunaga H, Mikami M, Nagase S, et al. The 2020 Japan Society of Gynecologic Oncology guidelines for the treatment of ovarian cancer, fallopian tube cancer, and primary peritoneal cancer. *J Gynecol Oncol.* 2021;32:e49.10.3802

[31] Wilder JL, Pavlik E, Straughn JM, et al. Clinical implications of a rising serum CA-125 within the normal range in patients with epithelial ovarian cancer: a preliminary investigation. *Gynecol Oncol.* 2003;89:233-5.10.101

[32] Santillan A, Garg R, Zahurak ML, et al. 2nd, Armstrong DK, et al. Risk of epithelial ovarian cancer recurrence in patients with rising serum CA-125 levels within the normal range. *J Clin Oncol.* 2005;23:9338-43.10.1200

[33] Meier W, Baumgartner L, Stieber P, et al. CA125 based diagnosis and therapy in recurrent ovarian cancer. *Anticancer Res.* 1997;17:3019-20

[34] Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10:472-84.10.1038

[35] Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142:241-3

[36] M Stroun , J Lyautey, C Lederrey, et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release *Clin Chim Acta.* 2001 Nov;313(1-2):139-42. 10.1016

[37] Chetan Bettegowda , Mark Sausen, Rebecca J Leary, et al. Detection of circulating tumor DNA in early-and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014 Feb 19;6(224):224ra24.10.1126

[38] Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:223-38.10.1038

[39] Diehl F, Schmidt K, Choti MA, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008;14:985-90.10.1038

[40] Allegretti M, Cottone G, Carboni F, et al. Cross-sectional analysis of circulating tumor DNA in primary colorectal cancer at surgery and during post-surgery follow-up by liquid biopsy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39:69.10.1186

[41] Thress KS, Brant R, Carr TH, et al. EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. *Lung Cancer*. 2015;90:509-15.10.1016

[42] William Pao , Nicolas Girard. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*. 2011 Feb;12(2):175-80.0.1016

[43] Asante DB, Calapre L, Ziman M, et al. Liquid biopsy in ovarian cancer using circulating tumor DNA and cells: Ready for prime time? *Cancer Lett*. 2020;468:59-71.10.1016

[44] Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, et al. Personalized Circulating Tumor DNA Biomarkers Dynamically Predict Treatment Response and Survival In Gynecologic Cancers. *PLoS One*. 2015.10.1371

[45] Parkinson CA, Gale D, Piskorz AM, et al. Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with

Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. PLoS Med.

201610.1371

[46] Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, et al. Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2013;31:1023-31.10.1038

[47] Sunami K, Ichikawa H, Kubo T, et al. Feasibility and utility of a panel testing for 114 cancer-associated genes in a clinical setting: A hospital-based study. Cancer Sci. 2019;110:1480-90.10.1111

[48] Shibuya Y, Tokunaga H, Saito S, et al. Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinoma with next generation sequencing. Genes Chromosomes Cancer. 2018.10.1002

[49] Ito S, Sato I, Mochizuki M, Minato T, et al. Robustness of a Cancer Profiling Test Using Formalin-fixed Paraffin Embedded Tumor Specimens. *Anticancer Res.* 2021;41:1341-8.10.21873

[50] Liu H, Bielinski SJ, Sohn S, et al. An information extraction framework for cohort identification using electronic health records. *AMIA Jt Summits Transl Sci Proc.* 2013;2013:149-53

[51] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20:1297-303.10.1101

[52] Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D941-d7.10.1093

[53] Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e164.10.109

[54] Hinrichs AS, Karolchik D, Baertsch R, et al. The UCSC Genome Browser Database: update 2006. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D590-8.10.1093

[55] To EW, Chan KC, Leung SF, et al. Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9:3254-9

[56] Network NCC. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Ovarian Cancer. USA 2017.

[57] Riedinger JM, Wafflart J, Ricolleau G, et al. CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. *Ann Oncol.* 2006;17:1234-8.10.1093

[58] Ebi H, Bando H. Precision Oncology and the Universal Health Coverage System in Japan. *JCO Precis Oncol.* 2019;3.10.1200

[59] Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014;20:548-54.10.1038

[60] N Tarazona , F Gimeno-Valiente , V Gambardella, et al. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Annals of Oncology.* 2019 Nov 1;30(11):1804-1812.

[61] Nakako S, Akemi S, Naomi K, et al. Correlation between plasma DNA and tumor status in an animal model. *PLoS One.* 2014 Dec 2;9(12):e111881. doi: 10.1371

[62] Rustin GJ, van der Burg ME, Griffin CL, et al. Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer (MRC OV05/EORTC 55955): a randomised trial. Lancet. 2010;376:1155-63.10.1016

[63] リキッドバイオプシーによるがん個別化医療の実現を目指す新プロジェクト
「CIRCULATE-Japan」

https://www.ncc.go.jp/jp/information/pr_release/2020/0610/index.html

(閲覧日 2022/1/20)

[64] 血液循環腫瘍 DNA 陰性の高リスク Stage II 及び低リスク Stage III 結腸癌治療切除例に対する術後補助化学療法としての CAPOX 療法と手術単独を比較するランダム化第 III 相比較試験 (VEGA trial)

<https://jrct.niph.go.jp/latest-detail/jRCT1031200006>

(閲覧日 2022/1/20)

図表

表 List

表 1. 患者背景

表 2. ddPCR プライマー一覧

表 3. Summary of exome sequencing of 11 ovarian cancers in this study

図 List

図 1. 研究シエーマ

図 2. FFPE 検体からの DNA 抽出

図 3. 卵巣癌患者 11 名の腫瘍検体エキソーム解析結果による変異スペクトル

図 4. Digital drop let PCR の補足説明図

図 5. FFPE 検体より抽出した DNA 量一覧

卵巣癌再発患者 6 名の ctDNA、CA125、cfDNA の推移

図 6. 卵巣癌再発患者 6 名の ctDNA、CA125、cfDNA の推移

図 7. (1) (2) ctDNA と腫瘍体積の相関図

図 8. ctDNA と CA125 の再発日数の比較と ctDNA 陽性患者のカプランマイヤー生

存曲線

患者背景

合計	11
年齡中央值	54.7(42-68)
Stage	
IIB	2
IIIA	3
IIIB	2
IIIC	3
IVB	1
組織型	
漿液性癌	6
明細胞癌	4
混合(漿液性、明細胞癌)	1

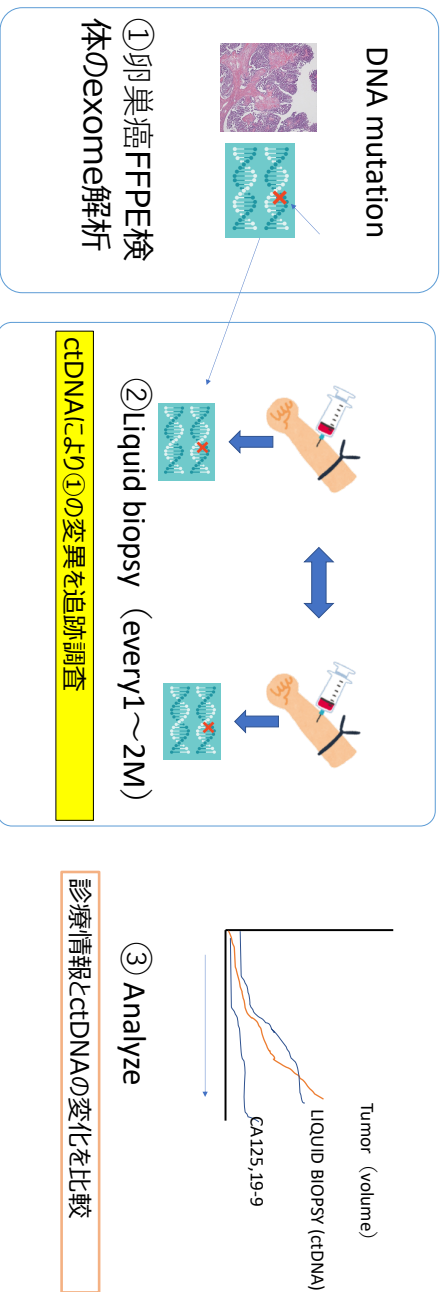
腫瘍特異的DNA変異のプロローブの選定

Case	Assay Name	Clinical Significance	Nucleotide Mutation:
T1	TP53 p.R273H	Likely Pathogenic	c.818G>A
T2	PIK3CA p.H1047R	Pathogenic	c.3140A>G
T3	TP53 p.T253P	Likely Pathogenic	c.757A>C
T4	TP53 p.R306Efs*39	Variant of Unknown Significance	c.916delC
T5	MYH13 p.E1419D	Variant of Unknown Significance	c.4257G>T
T6	FGFR2 p.S252W	Variant of Unknown Significance	c.755C>G
T7	PIK3CA p.T1052K	Variant of Unknown Significance	c.3155C>A
T8	TP53 p.C242W	Variant of Unknown Significance	c.726C>G
T9	TP53 p.Y236C	Likely Pathogenic	c.707A>G
T10	TP53 R175H	Likely Pathogenic	c.524G>A
T11	MYH6 p.R673H	Variant of Unknown Significance	c.707A>G

Summary of exome sequencing of 11 ovarian cancers in this study

Number of variants	
Total	670
SNVs	628
nonsynonymous	276
synonymous	81
nonsense	17
splicing	4
Intronic	157
Intergenic, up- and downstream	41
non-coding exonic (including UTRs)	45
unknown	6
DNVs	7
Ins	18
dels	25
frameshift indels	15
COSMIC ver. 92	106

METHOD

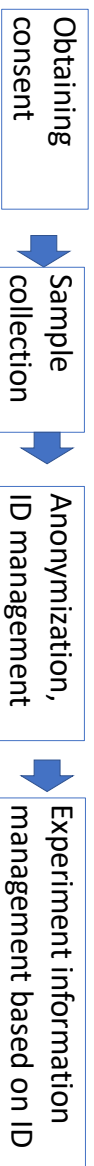


OPE

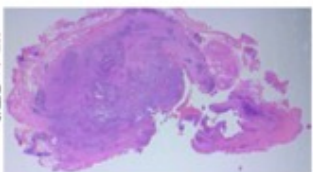
Start of research
Postoperative treatment or follow-up

End of research
Under follow-up or recurrent treatment

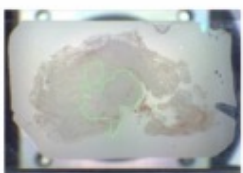
Anonymization



進行卵巢癌11人、23検体 FFPF検体よりダイセクション



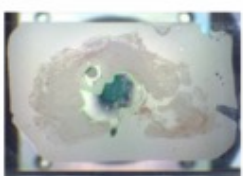
リアブリンス面積



ダイセクション前



ダイセクション経路



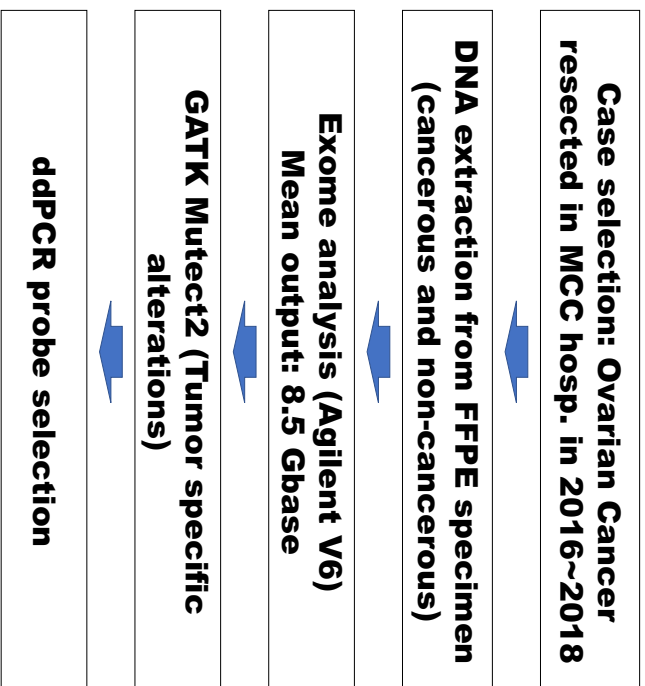
ダイセクション後

リアブリンス面積

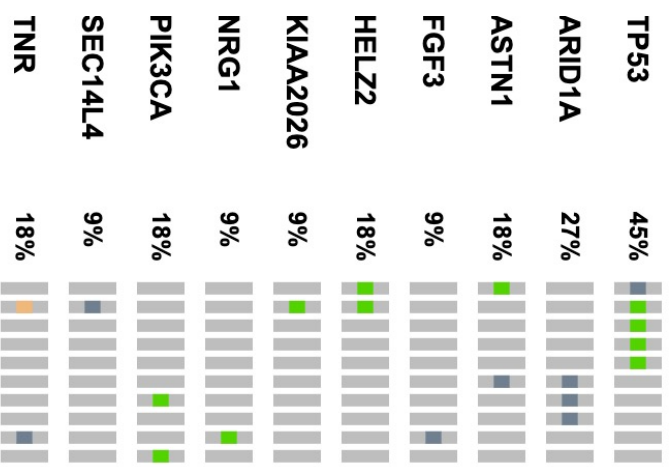
AOI	スライスID	組織領域	領域
領域-1	-	1/4	64.10 mm ²
領域-1	-	2/4	64.10 mm ²
領域-1	-	3/4	64.10 mm ²
領域-1	-	4/4	64.10 mm ²
領域-2	-	1/4	9.36 mm ²
領域-2	-	2/4	9.36 mm ²
領域-2	-	3/4	9.36 mm ²
領域-2	-	4/4	9.36 mm ²
カウ-1	1		293.84 mm ²

図 2

A



B



Gray: Truncation, Green: Missense mutation
Orange: Splice mutation (unknown significance)

Digital droplet PCRとは

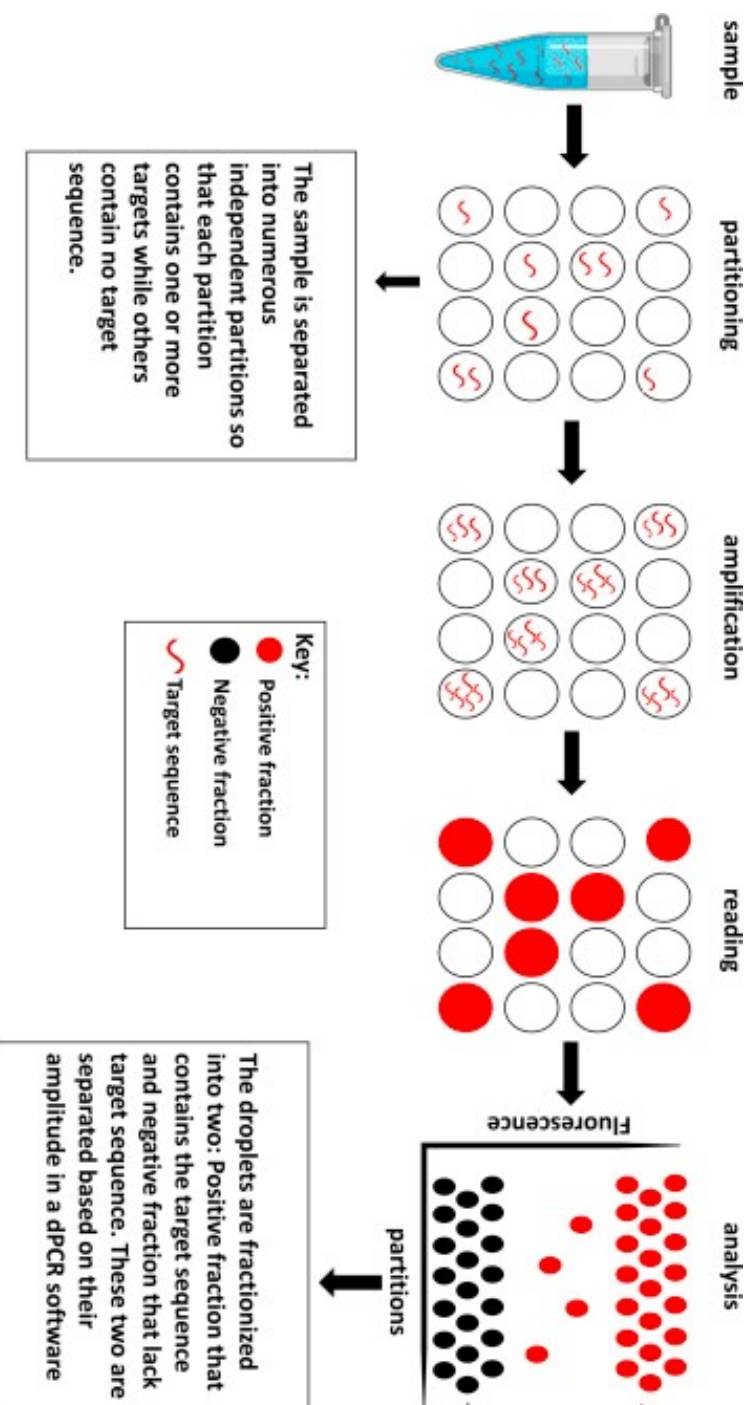


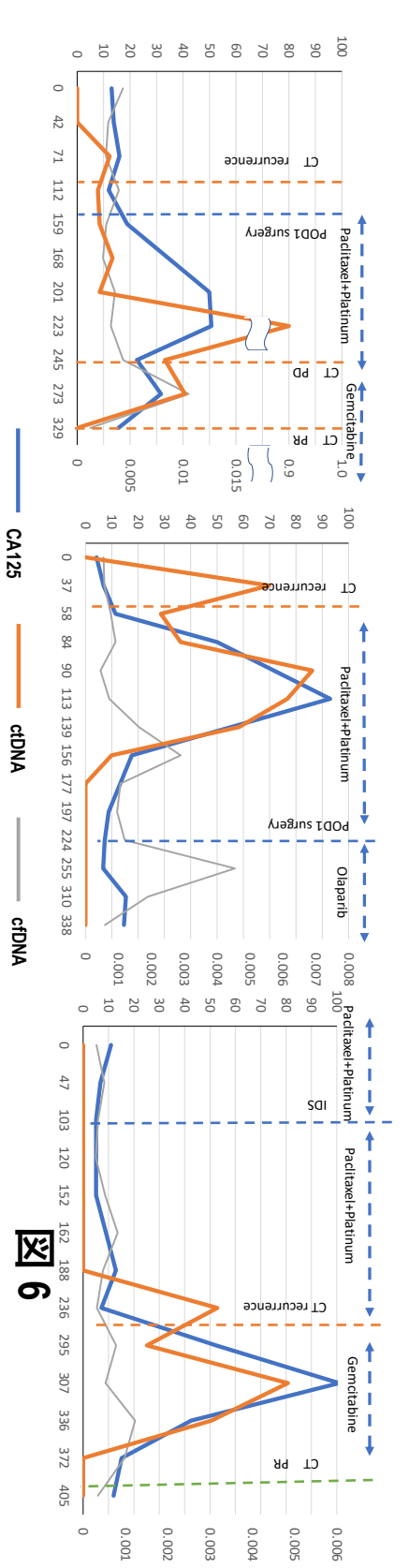
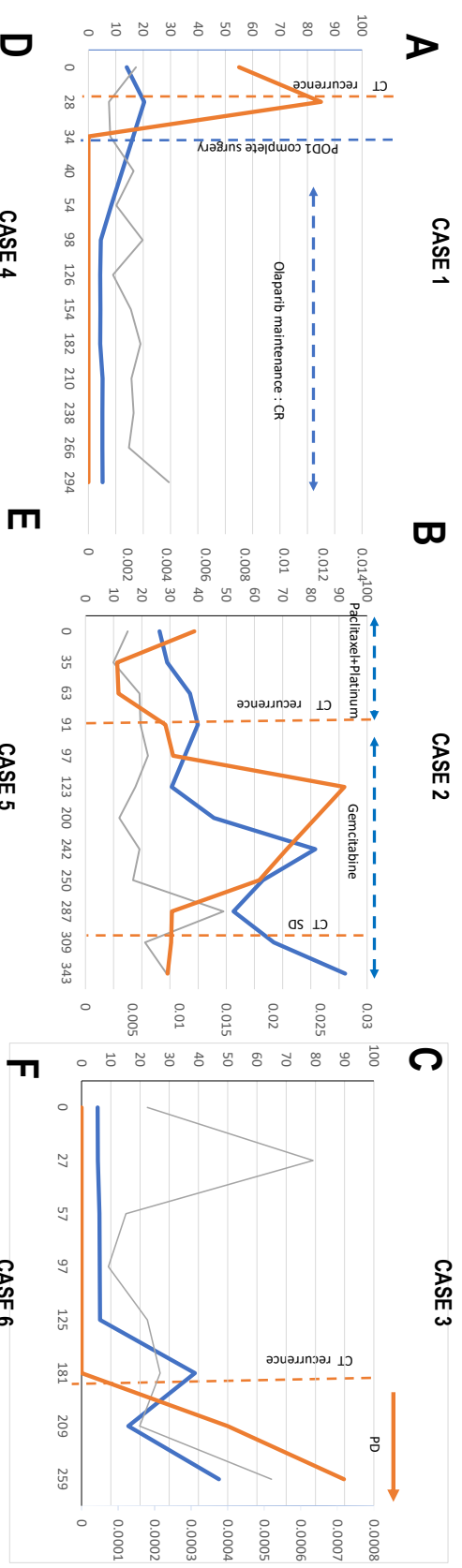
図4

Raphael N et al | Tuberculosis 117 July 2019, Pages 85-92 一部改

進行卵巣癌11人、23検体 FFPF検体よりダイセクション

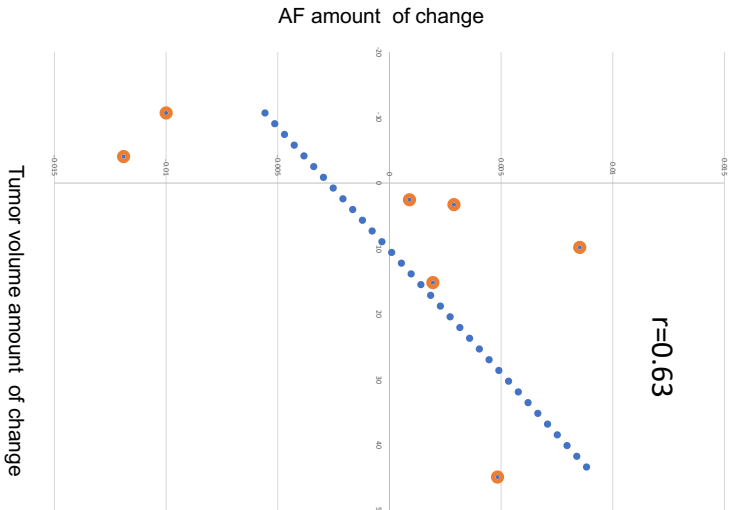
#	Sample Name	Conc. (ng/ml)	Volume (ul)	Total Amount (ng)
1	T1	65.8	35	2.3
2	N1	45.4	35	1.59
3	T2	16.8	35	0.59
4	N2	39.4	37	1.46
5	T3	78.3	34	2.66
6	N3	55.1	34	1.87
7	T4	103.2	38	3.92
8	N4	73.2	35	2.56
9	T5	79.6	35	2.78
10	N5	127.9	35	4.48
11	T6	35.5	32	1.14
12	N6	19.2	35	0.67
13	T7	75	35	2.63
14	N7	123.8	33	4.08
15	T8	114.2	33	3.77
16	N8	204	16	3.26
17	T9	83.4	35	2.92
18	N9	11.5	35	0.4
19	T10	28.7	35	1
20	N10	28.6	35	1
21	T11	44.5	35	1.56
22	N11	32.7	38	1.24
23	T12	39.7	35	1.39

図 5

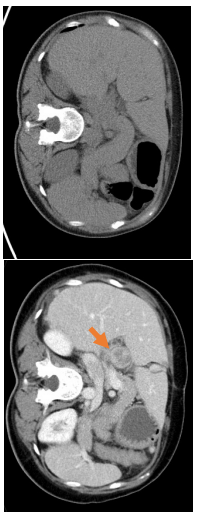


6

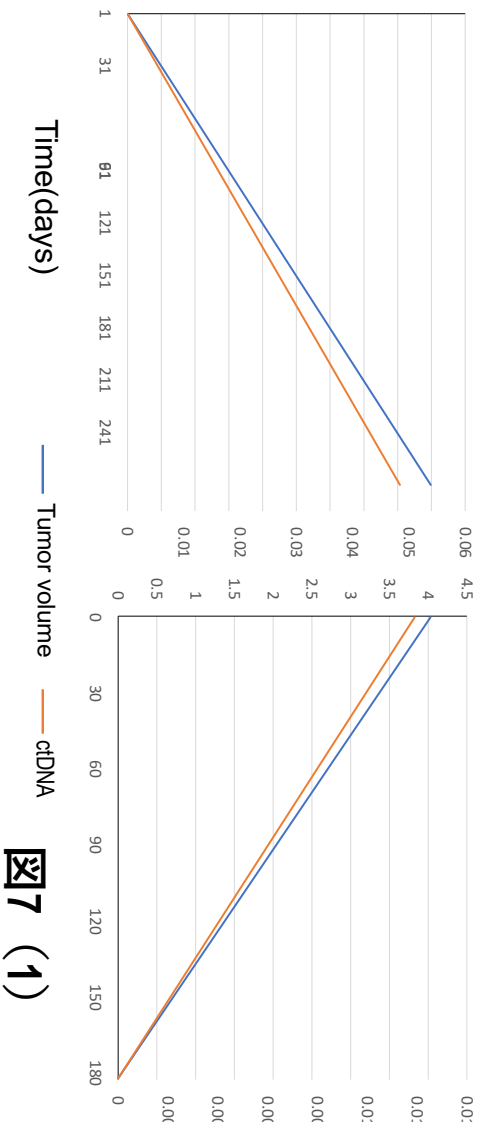
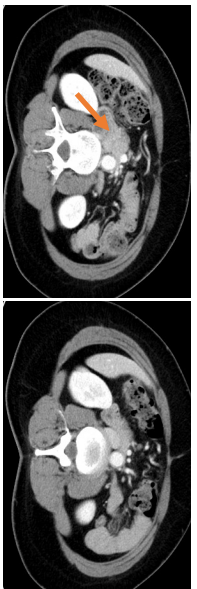
A



B



C



7 (1)



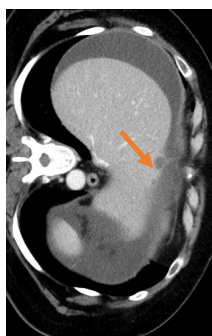
SCAN1



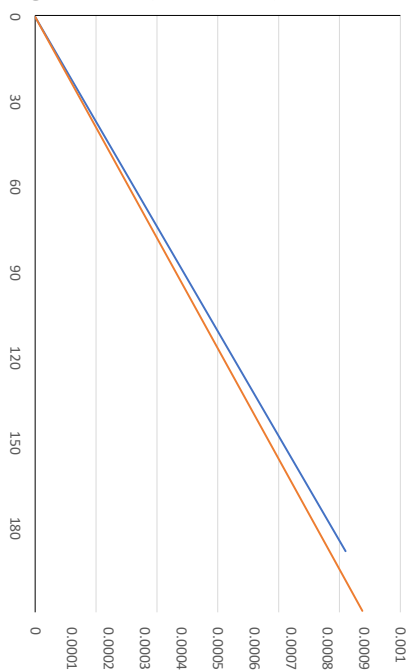
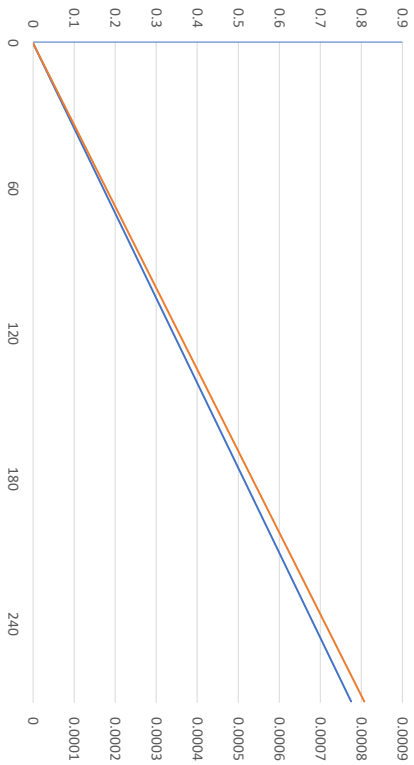
SCAN2



SCAN1

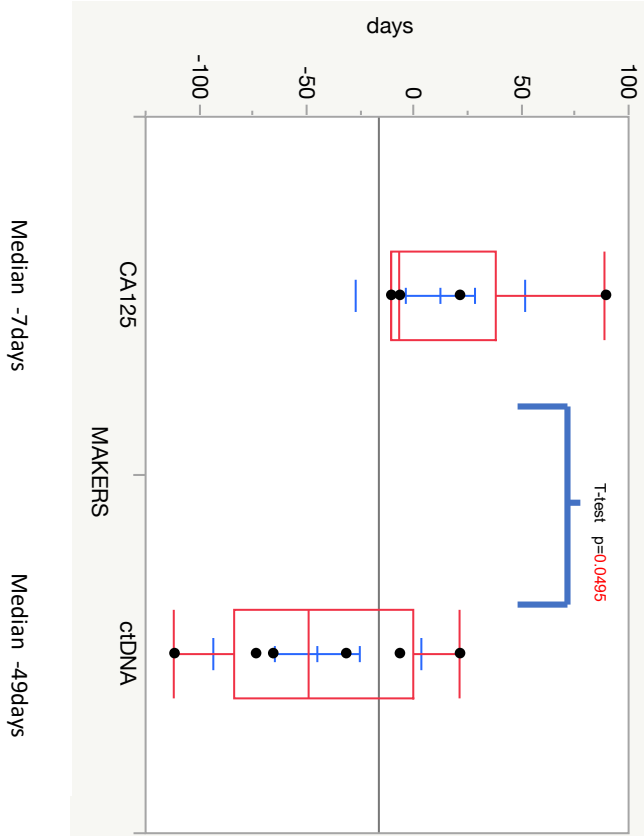


SCAN2

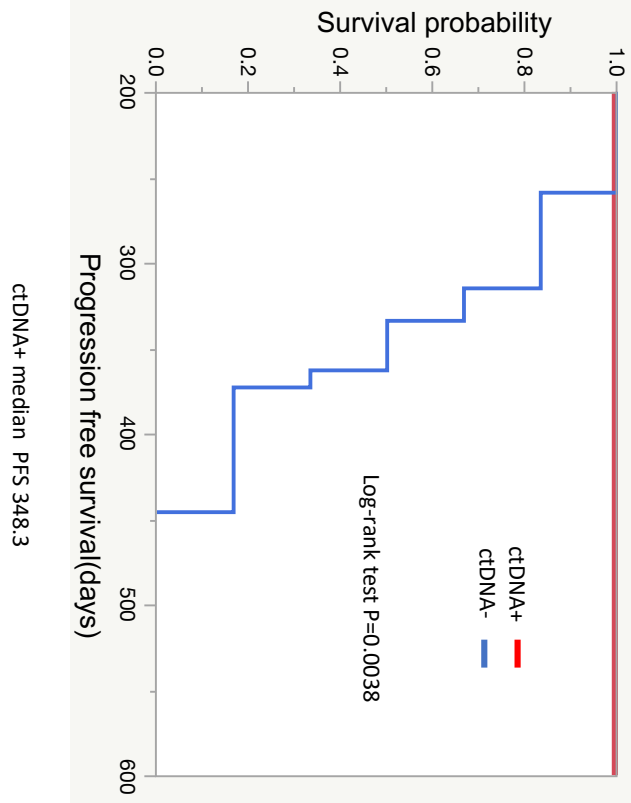


Time(days) — Tumor volume — cDNA  7 (2)

A



B



図表説明

図 1. 本研究のシェーマ

図 2.FFPE 検体からの DNA 抽出

FFPE 検体（HE 染色）から AVENIO Millisect System(Roche, Basel, Switzerland) を使用しマイクロダイセクションを行った。その切片を回収し QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit（Qiagen GmbH, Hilden, Germany）のプロトコールに従って抽出した。

図 3. エクソーム解析。

A.エクソーム解析パイプラインの模式図。矩形はその手順を示す。

B：本研究で解析した卵巣腫瘍の変異スペクトルを示す。この図は CBioportal の oncoPrint を用いて作図された。

図 4. Digital drop let PCR の補足説明図

ddPCR の特徴としては DNA サンプルを微細な仕切りの中に分配し PCR を行う点である。この仕切りの仕様には油滴を利用したドロップレット技術などが用いられている。ドロップレット技術では、PCR 反応させる仕切りとして 20,000 個もの分画が可能であり、各仕切りは 1 分子単位の分画が可能である。PCR 反応後、各分画ごとに、目的の分子を含むか（シグナルが陽性：デジタル的に【1】）、含まないか（シグナルが陰性：デジタル的に【0】）をシグナルの有無で計測し、それぞれの分画のシグナル数を、ターゲットのコピー数として換算し、絶対定量が可能となる

図 5. FFPE 検体より抽出した DNA 量一覧

11 名の腫瘍、正常組織の検体から抽出した 22 検体を QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を使用して抽出した。

合計で 590ng~4,480ng の全ゲノム DNA が得られた。

図 6. 再発卵巣癌における CA125、ccfDNA、ddPCR のコピー数の時間経過。

パネル A から F は、調査期間中の 6 例の再発例の時系列を示す。横軸は日付、左縦軸は CA125 値 (U/dl : 青線) と ccfDNA 濃度 (ng/ml : 灰色線) を示す。ctDNA の

AF を右縦軸（%：赤線）で示した。横の両面矢印と点線は、化学療法の期間を示す。縦の点線は、CT スキャンや外科的切除などの臨床イベントを示す。

図 7 (1)、(2) 再発腫瘍の大きさと ctDNA の対立遺伝子の頻度の比較。

パネル A. 腫瘍の大きさと対立遺伝子頻度 (AF) の変化の相関関係。縦軸は腫瘍の大きさ、横軸は各症例の AF の変化を示す。各症例のデータ取得点は、CT 画像で目視できる転移病巣の変化に基づいて選択した (パネル B および C 参照)。分母と分子はそれぞれ、転移病巣の体積が変化する前と後のデータ (腫瘍体積と AF) とした。パネル B と C. 症例 1 (パネル B: 外科的切除) と症例 5 (パネル: 化学療法) の治療後の腫瘍体積と AF の相関関係。各パネルの上段の画像は、変更前と変更後の CT 画像である。撮影のタイミングは画像の下に示した。下のグラフは、時間経過 (横軸) に伴う AF (縦軸) の変化を示す。CT 画像の赤い矢印は、再発した腫瘍を示す。

図 8. 卵巣癌のフォローアップにおける ddPCR による ctDNA 検出の臨床的意義。

パネル A. CT 画像で卵巣癌の再発を検出するまでの ctDNA と CA125 の潜伏期間の比較。横軸はマーカー、縦軸は CT 画像での再発発見までの潜伏期間を示す。各ドットはマーカーの値を示し、ヒゲは 95%CI を示す。

パネル B. 無増悪生存率の Kaplan-Meier 曲線。赤と青の線は、それぞれ ddPCR により ctDNA が検出された患者と検出されなかった患者を示す。