

表 題 膵癌患者における血中 *KRAS* クローンモニタリングの有用性

論文の区分 博士課程

著 者 名 渡部 文昭

担当指導教員氏名 力山 敏樹 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系専攻  
総合医学分野  
外科系総合医学

2019年1月10日申請の学位論文

## 目次

はじめに	P 2-5
研究対象と方法	P 6-13
結果	P 14-36
考察	P 37-41
結論	P 42
謝辞	P 43
参考文献	P 44-50

## はじめに

膵がんは、Siegel ら<sup>1</sup>によると米国において男女ともにがんによる死因の第4位と重要な位置にあり、日本の2016年集計の全国がん（成人病）センター協議会の調査によると、同様に死因の第4位である。加えて、膵がん5年相対生存率（2004年～2007年）は9.2%、10年相対生存率（1999年～2002年）は4.9%であり、固形がんの中でも非常に予後不良な疾患であることが知られている<sup>2</sup>。膵がんの根治的治療としては、主に外科的切除が選択されるが、多くの場合進行期に発見されるため、外科的手術が可能な患者は全体の15～20%に留まっている<sup>3</sup>。また根治切除できたとしても、多くの患者で1年以内に再発する可能性が高く、切除後の5年生存率も25%に留まっている<sup>1</sup>。そのため、最近では予後を改善するために術前化学療法などの臨床試験が試みられている。さらに、切除不能膵がん患者の予後は切除可能膵がんより一層悪く、その予後の中央値は5-9ヶ月とされる<sup>3</sup>。近年、日本国内での新たな治療法として、2013年、2014年に切除が不能な患者を対象としたオキサリプラチン、イリノテカン、ロイコボリンと5FUの併用療法であるFOLFIRINOX<sup>4</sup>を用いた化学療法およびゲムシタビンとナブパクリタキセルを併用した化学療法<sup>5</sup>がそれぞれ保険収載された。これらの化学療法はゲムシタビン単独の効果と比較して生存期間の延長が認められている。一方で、これらの化学療法は副作用も強いため、予後に応じて、薬剤強度を考慮した抗がん剤の選択が重要と考えられる。従って、抗がん剤の選択の基準となる予後を判断する膵がんのバイオマーカーの発見は非常に重要な課題と言える。

これまでの膵がんに対する既存の血液バイオマーカーとしては CA19-9 (carbohydrate antigen 19-9)や CEA (carcinoembryonic antigen)、DUPAN2 などが挙げられる。CA19-9 は大腸がん培養細胞 SW116 を免疫源として、マウスを免疫して作製したモノクローナル抗体 NS19-9 が認識する抗原であり、異常高値を示す疾患として膵がんや胆道がんが挙げられる。また CEA は大腸がんから抽出され、正常胎児大腸にも存在することから上記の名称で呼ばれ、糖質を約 50%含む、分子量約 18 万～20 万ダルトンの糖蛋白群であり多くの臓器がんで陽性となる。DUPAN2 はヒト膵がん培養細胞 HPAF-1 を免疫抗原として作成したモノクローナル抗体が認識する抗原で、血清中で膵がん、胆道系がん、肝臓がんで高い陽性率を示す。この中でも CA19-9 は、膵がんの診断や切除やフォローアップの際に使用する最も一般的なバイオマーカーであるが<sup>6</sup>、胆管炎や膵炎、肝炎などの良性疾患でも上昇する。また、CA19-9 は血液型抗原の一種であるルイス A にシアル酸が付加した糖鎖抗原であるため、ルイス式血液型陰性者では偽陰性となる<sup>7</sup>。さらにこれまでに膵癌の進行度や予後による CA19-9 のカットオフの検討も多数の文献で行われており<sup>7,8</sup>、CA19-9 のみで膵がん患者を選別し、個別化医療に応用することは困難と考えられる。

最近になり、CA19-9 などの既存の腫瘍マーカーに替わるバイオマーカーとして注目されているのが血中の循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA; 以下 ctDNA と表記)や循環腫瘍細胞、または正常細胞やがん細胞から分泌される脂質二重膜に包まれた細胞外小胞であるエクソソームであり、それらを探索するいわゆる“リキッドバイオプシー”は浸潤癌における診断や化学療法中の治療効果の評価に有効と言われている<sup>9-13</sup>。しかし、その

中でも腫瘍細胞のネクロシスやアポトーシス時に放出される ctDNA の量は血液内で微量であるため<sup>14</sup>、その評価には高感度の PCR システムが必要であった。しかし、高い感度で検索可能な BEAMing、デジタル PCR、次世代シーケンスなどの技術が開発されることにより、様々な浸潤癌において ctDNA の有用性が示されてきた<sup>15,16</sup>。また、リキッドバイオプシーは血液や尿などの体液を利用するため、内視鏡や経皮的生検に比較すると低侵襲である。そのため複数回採取し、長期的なモニタリングを行うことでリアルタイムに腫瘍の動態を捉えることが可能であり、当科でも大腸がんにおける *KRAS* 変異型 ctDNA (*KRAS*-mutated ctDNA)の長期的モニタリングを行い、様々な化学療法に対する患者個別の腫瘍動態を報告した<sup>17</sup>。ところで、大腸がんの症例において *KRAS* 遺伝子の変異は全体の約 50%に認められるが、膵がんでの変異は 90%に見出される<sup>3</sup>。また、膵がんの場合、腫瘍内における *KRAS* 遺伝子変異の heterogeneity はごく少数でのみ観察されること<sup>18</sup>、さらに原発巣と転移した腫瘍間での *KRAS* 遺伝子変異の不均衡は少ないことが報告されている<sup>19</sup>。従って、膵がんの転移の有無や予後を予測する因子として血中の *KRAS* 遺伝子をモニタリングすることは、膵がんの個別治療に対するバイオマーカーとして有効と考えられる。膵がん患者の *KRAS*-mutated ctDNA の探索は、1999 年に Castells ら<sup>20</sup>により初めて行われて、*KRAS*-mutated ctDNA の出現する膵がん患者は予後不良であると報告している。その後いくつかの同様の報告がなされているものの、再発の予測や化学療法の効果に対する一定の見解はなく<sup>21-26</sup>、その理由として手術前後や化学療法前後などの 1 回もしくは数回の評価の結果しか報告されておらず、長期的なモニタリングが行われていないことが原因ではないかと考えられた。そこで本研究では膵がん患者における *KRAS*-mutated ctDNA の有用性を示すために、長期的なモニタリン

グを行い、予後や化学療法に対する奏効を検討した。また、同時に血清 CA19-9 値も比較検討した。

## 研究対象と方法

### 研究デザイン

2014年3月から2017年12月の期間に自治医科大学附属さいたま医療センターで手術、化学療法または緩和医療が施行された78名の膵がん患者を対象として、手術あるいは内視鏡下生検で得られたがん組織と422の血液検体を用いた。図1に研究デザインを示す。78名の膵がん患者の内訳は手術群39名と化学療法または緩和医療を施行した非手術群39名である。その患者背景を表1と表2に示す。また最終観察期間は2018年6月までとした。手術群では術後に少なくとも3回連続して採血した患者を対象とした。非手術群では少なくとも2回連続して採血した患者を対象としたが、原病死のため1回しか採血が行えなかった4名の患者を含めた。非手術群の内訳としては、American Joint Committee on Cancer (AJCC) ガイドラインで定義される stage III/IV 35名と再発4名であり、治療時期との関連では26名は本研究開始後に化学療法が導入されたが、8名においては既に治療が開始されていた。また残りの5名は緩和医療であった。

本研究は自治医科大学遺伝子解析倫理委員会において承諾を得たもので、研究目的などの研究内容の概略、組織採取による合併症などについて書面および口頭で対象者に対して説明を行い、研究に関する同意を書面で得た。また、本研究において開示すべき利益相反はない。

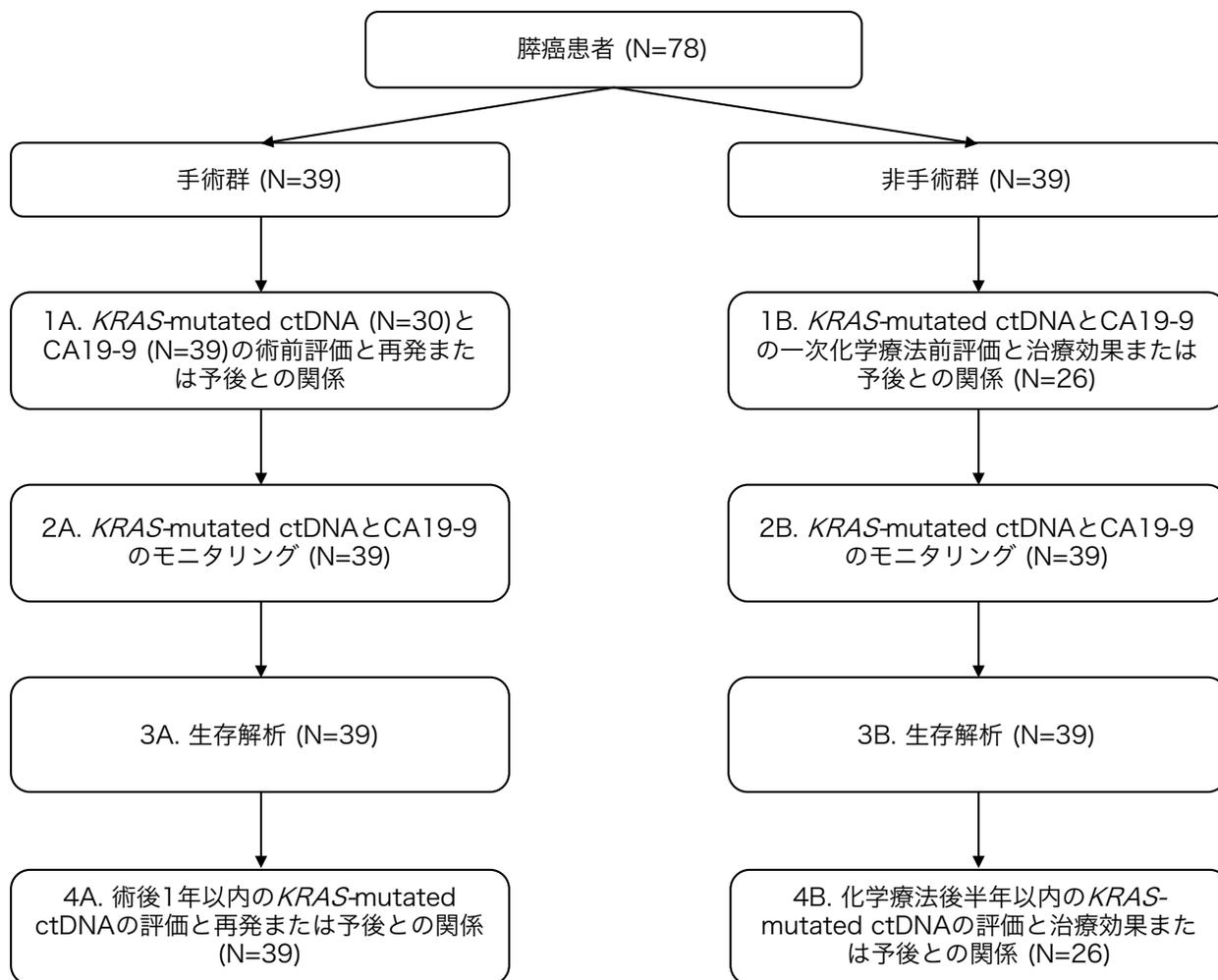


図1. 研究デザイン；患者選別とエンドポイント

表 1 . 手術群における患者背景

Characteristic	Value (N=39)
Sex	
Male	21 (53.8%)
Female	18 (46.2%)
Age at operation (median, 69.5 years)	
<70 years	19 (48.7%)
≥70 years	20 (51.3%)
Neo adjuvant chemotherapy	
Yes	7 (17.9%)
No	32 (82.1%)
Operation methods	
SSPPD and total pancreatectomy	23 (59.0%)
Distal pancreatectomy	16 (41.0%)
Tumor size	
≤2 cm	10 (25.6%)
>2 cm	29 (74.6%)
Pathological differentiation	
Well	26 (66.7%)
Moderately and *others	13 (33.3%)
AJCC T factor	
T1/T2	6 (15.4%)
T3/T4	33 (84.6%)
Lymph node metastasis	
Positive	25 (64.1%)
Negative	14 (35.9%)
AJCC stage	
IA/IB/IIA	14 (35.9%)
IIB/III/IV	25 (64.1%)
Pre-operative CA19-9 status	
≤37 U/mL	11 (28.2%)
>37 U/mL	28 (71.8%)
Recurrence	
Yes	22 (56.4%)
No	17 (43.6%)
Chemotherapy after recurrence	
Yes	18 (46.2%)
No	4 (10.3%)

Date presented as n (%). \*Others include poorly, scirrhous and adenosquamous; SSPPD, subtotal stomach-preserving pancreaticoduodenectomy; AJCC, American Joint Committee on Cancer; FOLFIRINOX, oxaliplatin+irinotecan+folinic acid and fluorouracil.

表 2. 非手術群における患者背景

Characteristic	Value (N=39)
Sex	
Male	16 (41.0%)
Female	23 (59.0%)
Age (median, 69.5 years)	
<70 years	21 (53.8%)
≥70 years	18 (46.2%)
AJCC stage	
Stage III	13 (33.3%)
Stage IV	22 (56.4%)
Treatment	
Chemotherapy-naïve status	26 (66.7%)
Treated chemotherapy	8 (20.5%)
Palliative treatment	5 (12.8%)
Regimen of 1st line chemotherapy (N=26)	
FOLFIRINOX	7 (26.9%)
Gemcitabine+nab-paclitaxel	17 (65.4%)
Gemcitabine	2 (7.7%)

Date presented as n (%). AJCC, American Joint Committee on Cancer; FOLFIRINOX, oxaliplatin+ irinotecan+ folinic acid+fluorouracil.

### 組織の *KRAS* 遺伝子変異検索

リンパ節や生検検体も含め、膵がん組織における *KRAS* 遺伝子変異解析は、FFPE (Formaline-Fixed Paraffin-Embedded tumor tissues) を用いて RASKET<sup>27</sup> とドロップレット デジタル PCR (droplet digital Polymerase Chain Reaction, ddPCR) で行った。RASKET は

臨床現場では大腸がんの *KRAS* 遺伝子変異を探索する方法で、*RAS* 遺伝子のエクソン 2, 3, 4 の変異解析を行うことが可能であり、マルチプレックス PCR により、コドン 12, 13, 61 などの点変異解析を行い、その感度は 1%とされている<sup>27,28</sup>。まず、その RASKET で膵がん組織 67 症例に対して変異解析を行った。解析は臨床で変異解析時に委託している SRL (Special Reference Laboratories) 社で行われた。その後 73 症例の膵癌組織から QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen 社製)を用いて DNA を抽出し、リキッドバイオプシーと同様の方法で ddPCR を用いて点変異を解析した。膵がん組織においては G12V, G12D, G12R の点変異が 90%以上で、その他の点変異は稀であることから<sup>21,29</sup>、<sup>30</sup>、全症例において G12V, G12D, G12R の点変異を解析し、さらに RASKET で Q61H の点変異が同定された 4 症例に関しては ddPCR で Q61H の点変異を解析した。5 症例においては組織からの DNA 抽出が難しく解析困難とした。

### **膵癌における heterogeneity 解析**

39 症例の手術検体の腫瘍細胞が含まれる FFPE 検体より、自治医科大学附属さいたま医療センター病理部に委託し、10 $\mu$  の厚さの Hematoxyline-Eosin 染色標本の作成を依頼した。標本作成の際のスライドは Leica microsystems 社の PEN membrane slides を使用した。図 2 のように腫瘍の中心を Tumor center (TC)、腫瘍の辺縁を Invasion front (IF)として LMD7000 (Leica microsystems 社製)を用いて、39 症例それぞれの 2 カ所のレーザーマイクロダイセクションを行なった。採取された組織は QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen 社製)を用いて DNA を抽出し、主に G12V, G12D, G12R の点変異解析を ddPCR

で行った。さらに、転移巣や局所再発が採取できた 13 症例の FFPE より DNA を抽出し、同様に ddPCR で解析した。

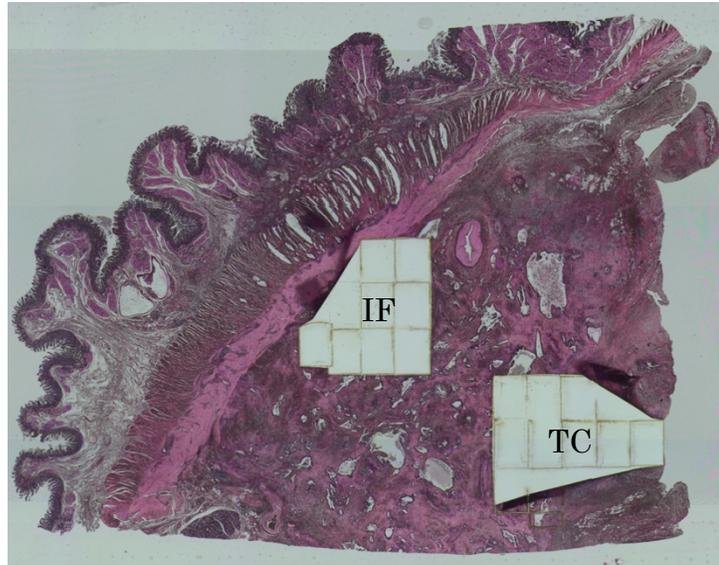


図 2. 組織標本 (Hematoxyline-Eosin 染色) : Tumor center (TC) と invasion front (IF)

### 血中遊離 DNA の抽出

採血時に追加で 7ml を研究用として採血し、原則として 5 時間以内に 3000g 20 分の遠心分離後、さらに 16000g 10 分の遠心分離にかけ、分離された血漿を解析まで -80°C で保存した。血漿 2ml から QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen 社製) を用いて DNA を抽出し、溶出量は 80 $\mu$ l で行なった。

### デジタル PCR を用いた *KRAS* 変異解析

血中遊離 DNA の変異解析には QX200 Droplet Digital PCR システム (Bio-Rad 社製) を用いた。血中の *KRAS* 変異解析は組織の変異と一致する点変異で解析した。プライマーとプローブは ddPCR *KRAS* assay (Bio-Rad 社製) を用いた。反応組織は 10 $\mu$ l of 2 $\times$ ddPCR™

Supermix、250nM of forward and reverse primers、62.5 nM mutant and wild-type probe、10 $\mu$  サンプル、計 22 $\mu$  で行なった。DG8™ Cartridge (Bio-Rad 社製)に反応液をアプライし、推奨プロトコールに沿って、Droplet Generator (Bio-Rad 社製)でドロップレットを作成した。作成したドロップレットを 96 ウェルプレート (Eppendorf 社製)に移し、シーリング後に Verti thermal cycler (Thermo Fisher Scientific 社製)で PCR を行なった。PCR 条件は、95°C 10 分、94°C 30 秒、55°C 90 秒を 39 サイクルで行なった。励起光の照射によって蛍光を発する蛍光色素である FAM で変異型を、HEX で野生型を標識し、ドロップレットの解析は QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad 社製)を用いて蛍光強度を測定し DNA 量を測定した。また、本研究では我々が以前に報告しているカットオフに従って、ポジティブドロップレット数が 2 つ以上の場合を *KRAS*-mutated ctDNA が陽性と判断した<sup>17</sup>。

### 統計学的解析

本研究のエンドポイントとして、recurrence-free survival (RFS), progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) の評価を行った。手術群における RFS, OS の解析は術前の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無と CA19-9 status (37 U/ml > CA19-9 versus 37 U/ml  $\leq$  CA19-9) の 2 群に分けて解析を施行し、1 年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の変化に伴う RFS, OS の解析は、術後 1 年以内に *KRAS*-mutated ctDNA が出現した群と出現しない群の 2 群に分けて解析を行った。また非手術群において、本研究で一次化学療法が施行された 26 症例を対象に治療前 *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無と CA19-9 status (37 U/ml > CA19-9 versus 37 U/ml  $\leq$  CA19-9) の 2 群に分けて PFS, OS の比較を行った。さらにその 26 名を対象に化学療法を開始して 3 ヶ月から半年以内に *KRAS*-mutated ctDNA が出現し

ている群と、出現のないまたは消失した群の2群に分けて PFS, OS の比較を行った。なお、予後に関わると考えられる危険因子を手術群と非手術群で単変量解析と多変量解析で解析した。モニタリングの途中で出現した *KRAS*-mutated ctDNA や CA19-9 status の変化 (CA19-9 > 37 U/ml) は時間依存性変数とした。また、CA19-9 のカットオフ値は 37 U/ml のみで検討を行った。時間依存性変数を用いない生存曲線は Kaplan-Meier 法でグラフを作成し、時間依存性変数を用いた生存曲線は Simon-Makuch 法でグラフを作成した。カテゴリーデータの解析には Fisher's exact test を使用し、いずれも  $P < 0.05$  を統計学的有意差ありとし、統計学的解析には EZR version 1.31 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University) と R commander (The R Foundation for Statistical Computing, version 3.5.1 version 1.6-3) を用いた。腫瘍の化学療法による効果は RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) で判定した<sup>31)</sup>。

## 結果

### 組織の *KRAS* 変異解析と膵癌における heterogeneity

ctDNA の *KRAS* 変異解析を行う前に、まず膵がん組織 67 症例における *KRAS* 変異解析を RASKET で施行した。変異型は 59 例に認められ、野生型が 8 例であり、変異率は 88.1%であった。さらに ddPCR による 73 症例の組織の *KRAS* 変異解析を行い、RASKET の変異型と ddPCR による 1%以上の変異は 100% (59/59)で一致した (図 3)。

No.	Treatment	RASKET	ddPCR			
			G12V	G12D	G12R	Q61H
1	Operation	G12D		G12D		N. D
2	Operation	Q61H				Q61H
3	Chemotherapy	Q61H				Q61H
4	Operation	G12V+G12R	G12V			
5	Operation	G12D+G12R		G12D		
6	Operation	G12V+G12R	G12V			
7	Operation	G12V	G12V			
8	Operation	G12V	G12V			
9	Operation	G12V	G12V			
10	Operation	G12V	G12V			
11	Operation	G12V	G12V			
12	Operation	G12V	G12V			
13	Operation	G12V	G12V			
14	Operation	G12V	G12V			
15	Operation	G12V	G12V			
16	Operation	G12V	G12V			
17	Operation	G12V	G12V			
18	Chemotherapy	G12V	G12V			N. D
19	Chemotherapy	G12V	G12V			
20	Chemotherapy	G12V	G12V			
21	No treatment	G12V	G12V			
22	No treatment	G12V	G12V			
23	Operation	G12D		G12D		
24	Operation	G12D		G12D		
25	Operation	G12D		G12D		
26	Operation	G12D		G12D		
27	Operation	G12D		G12D		
28	Chemotherapy	G12R			G12R	
29	Chemotherapy	G12R			G12R	
30	Chemotherapy	G12R			G12R	
31	Chemotherapy	G12R			G12R	
32	Chemotherapy	G12R			G12R	
33	Chemotherapy	Q61H				Q61H
34	Operation	G12V	G12V			
35	Operation	G12V	G12V			
36	Chemotherapy	G12V	G12V			
37	Chemotherapy	G12V	G12V			
38	Chemotherapy	G12V	G12V			
39	Chemotherapy	G12V	G12V			
40	Chemotherapy	G12V	G12V			
41	No treatment	G12V	G12V			
42	Operation	G12D		G12D		
43	Operation	G12D		G12D		
44	Operation	G12D		G12D		
45	Operation	G12D		G12D		
46	Operation	G12D		G12D		N. D
47	Operation	G12D		G12D		
48	Operation	G12D		G12D		
49	Operation	G12D		G12D		
50	Operation	G12D		G12D		
51	Chemotherapy	G12D		G12D		
52	Chemotherapy	G12D		G12D		
53	Chemotherapy	G12D		G12D		
54	Chemotherapy	G12D		G12D		
55	Chemotherapy	G12D		G12D		
56	Chemotherapy	G12D		G12D		
57	No treatment	G12D		G12D		
58	Operation	G12R			G12R	
59	Chemotherapy	Q61H				Q61H
60	Operation	Wild				
61	Operation	Wild				
62	Chemotherapy	Wild				
63	Operation	Wild		G12D		
64	Operation	Wild				
65	Operation	Wild				
66	Chemotherapy	Wild				
67	Chemotherapy	Wild				
68	Operation	N. D			G12R	
69	Chemotherapy	N. D	G12V			
70	Chemotherapy	N. D	G12V			
71	Chemotherapy	N. D		G12D		
72	Chemotherapy	N. D		G12D		
73	No treatment	N. D		G12D		

■ KRAS mutation by RASKET or ddPCR, ■ KRAS mutation <1% by ddPCR, ■ wild type by RASKET

図 3. 膵がん組織における RASKET と ddPCR による *KRAS* 変異探索の比較。RASKET による変異型と ddPCR による 1%以上の *KRAS* 変異は赤、ddPCR による 1%未満の *KRAS* 変異はピンク、野生型は水色で示した。ddPCR で変異なしは空白とした。未解析の項目は N.D (not determined) と記載した。

さらに、手術群 39 症例の膵がん組織における TC と IF、13 症例の原発巣と転移巣のそれぞれに対して ddPCR を用いて *KRAS* 変異解析を行った。腫瘍内 TC と IF における 1%以上の *KRAS* 変異の一致率は 94.7%であり(図 4)、原発巣と遠隔転移巣における 1%以上の *KRAS* 変異の一致率は 90.9% (図 5)であり、膵がん組織において *KRAS* 変異の heterogeneity は稀であった。

No.	Tumor Center				Invasion Front			
	G12V	G12D	G12R	Q61H	G12V	G12D	G12R	Q61H
1				N. D				N. D
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21				N. D				N. D
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
29								
30								
31								
32								
33								
34								
35								
36								
37								
38								
39								

■ KRAS mutation ≥ 1%, 
 ■ KRAS mutation < 1%

図 4. ddPCR を用いた手術検体の Tumor center と Invasion front における *KRAS* 変異探索。ddPCR による 1%以上の *KRAS* 変異は赤、ddPCR による 1%未満の *KRAS* 変異はピンクで示した。変異なしは空白とした。未解析の項目は N.D (not determined) と記載した。No. 18, No. 36 の症例以外の全ての 1%以上の *KRAS* 変異が一致し、一致率は  $36/38=94.7\%$ であった。

No.	KRAS mutation of primary tumor				Metastasis or recurrence	KRAS mutation of metastasis or recurrence			
	G12V	G12D	G12R	Q61H		G12V	G12D	G12R	Q61H
1					Liver				
2				N. D	Bone				N. D
3					LN				
4					LN				
5					No.16LN				
6					Liver				
7					Lung				
8					Liver				
9					Local				
10					No.16LN				
11					Liver				
12				N. D	Local			N. D	
13					LN				

■ KRAS mutation ≥ 1%, ■ KRAS mutation < 1%

図 5. ddPCR を用いた原発巣と転移巣、再発における *KRAS* 変異探索。ddPCR による 1% 以上の *KRAS* 変異は赤、ddPCR による 1%未満の *KRAS* 変異はピンクで示した。空白は変異なし、未解析の項目は N.D (not determined) と記載した。No. 10 の症例以外の全ての 1%以上の *KRAS* 変異が一致し、一致率は 10/11=90.9%であった。LN lymph node. Local; local recurrence in residual pancreas.

### 手術群における *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9

#### 1A. *KRAS*-mutated ctDNA (N=30)と CA19-9 (N=39)の術前評価と再発または予後との関係

手術群において術前に *KRAS*-mutated ctDNA が認められた症例は 7 例 (7/30, 23.3%)で、一方で CA19-9 が高値の(CA19-9> 37 U/ml) 症例は 28 例 (28/39, 71.8%) であった。ま

た、術前の *KRAS*-mutated ctDNA の出現と CA19-9 が高値であること (CA19-9> 37 U/ml) は術後の再発や予後予測因子ではなかった (図 6 と図 7)。

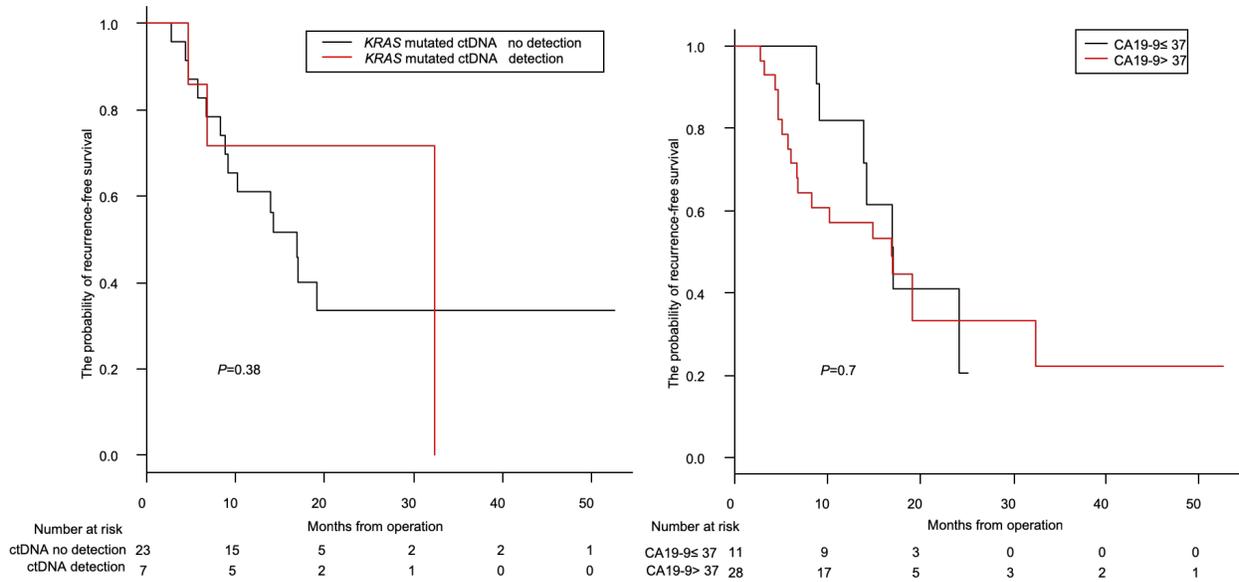


図 6. 術前の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無と CA19-9 status (CA19-9≤ 37 U/ml versus CA19-9> 37 U/ml)による無再発生存曲線。それぞれ再発予測因子ではなかった (*KRAS*-mutated ctDNA の有無; 中央値 16.9 ヶ月 versus 32.4 ヶ月,  $P=0.38$ ), (CA19-9≤ 37 U/ml versus CA19-9> 37 U/ml; 中央値 17.1 ヶ月 versus 16.9 ヶ月,  $P=0.7$ )。

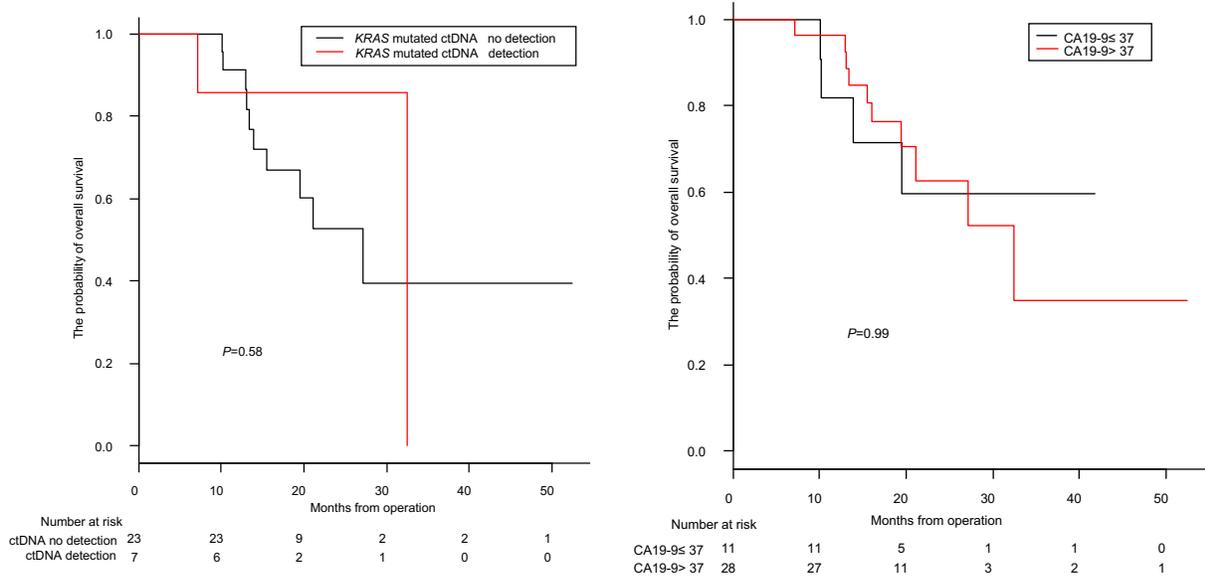


図 7. 術前の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無と CA19-9 status (CA19-9 ≤ 37 U/ml versus CA19-9 > 37 U/ml) による生存曲線。いずれも予後予測因子ではなかった (*KRAS*-mutated ctDNA の有無; 中央値 27.2 ヶ月 versus 32.4 ヶ月,  $P=0.58$ ), (CA19-9 ≤ 37 U/ml versus CA19-9 > 37 U/ml; 中央値 17.1 ヶ月 versus 16.9 ヶ月,  $P=0.99$ )。

## 2A. *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9 のモニタリング (N=39)

図 8 に手術群における *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9 の長期的モニタリングと再発、予後との関係を示す。手術群における術後の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無と CA19-9 status (CA19-9 ≤ 37 U/ml versus CA19-9 > 37 U/ml) の長期的モニタリングを行い、予後との比較を行った。手術群では 39 例中 25 例が生存しており、そのうち *KRAS*-mutated ctDNA はモニタリング中に 2 例のみに出現したが、死亡した 14 例では、*KRAS*-mutated ctDNA はモニタリング中に 12 例に出現していた。また CA19-9 status は、生存



図 8. 手術群における *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9 の長期的モニタリング。モニタリングした CA19-9 と *KRAS*-mutated ctDNA は“CA19-9” and “*KRAS*-mutated ctDNA “の下のセルに術後に採取された血液の順に (1→12)に記載している。CA19-9 $\leq$  37 U/ml と *KRAS* mutated-ctDNA が検出されない場合は青、CA19-9 $>$  37 U/ml と *KRAS*-mutated ctDNA が検出された場合は赤で記載している。治療効果は“Prognosis” と“Recurrence”の下のセルに記載しており、生存または再発なしは白、死亡または再発は灰色である。セルの一つが約 3 ヶ月を示しており、4 つのセルで約 1 年を表している。未解析の項目は N.D (not determined) と記載した。

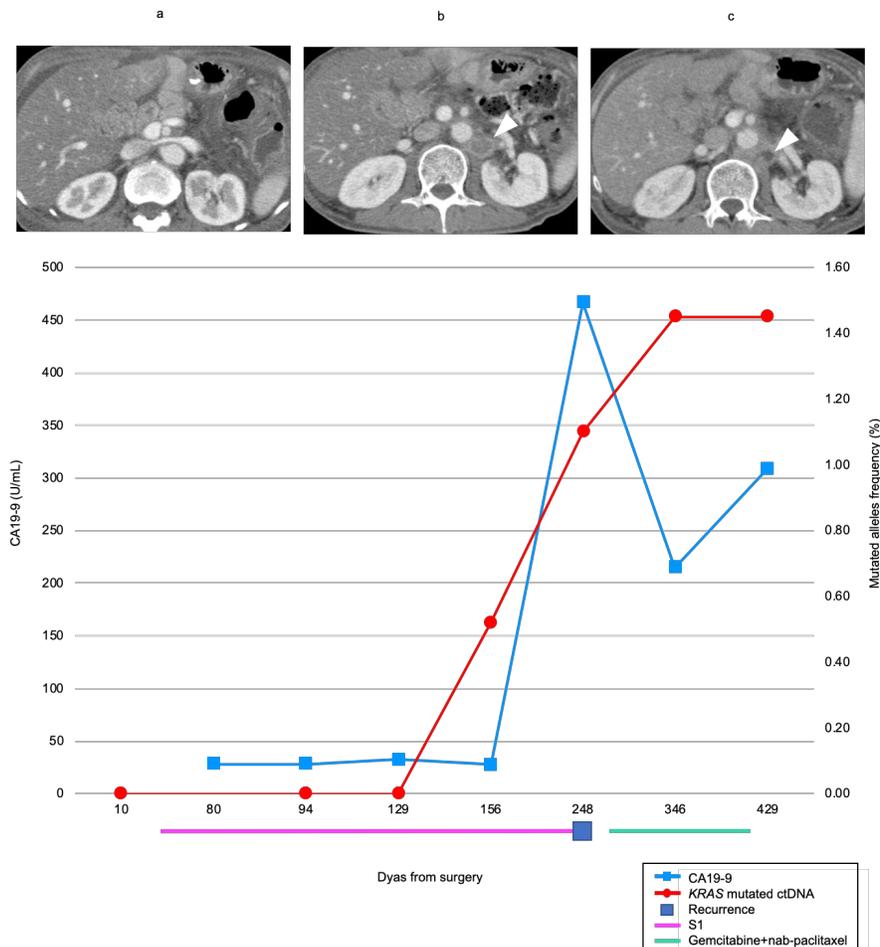


図 9. 膵頭部がんに対して、subtotal stomach-preserving pancreaticoduodenectomy が施行され術後補助療法が施行された患者。当初術後再発はなかったが (a)、画像診断や CA19-9 の上昇の前に *KRAS*-mutated ctDNA が検出された。その後 CT でリンパ節再発を認め (b, 白矢頭)、ゲムシタビンとナブパクリタキセルを併用した化学療法が施行された。一時リンパ節転移は縮小したが(c)、その後、原病死した。

### 3A. 生存解析 (N=39)

手術群において、13 の臨床的病理学的因子を用いて overall survival に対する単変量解析と多変量解析を行った。単変量解析で、術前化学療法有りと分化度 (moderately and others > well)、モニタリング中の CA19-9 > 37.0 U/ml、モニタリング中の *KRAS*-mutated ctDNA の出現が予後因子として抽出された。モニタリング中の CA19-9 > 37.0 U/ml を除いて多変量解析を行ったところ、モニタリング中の *KRAS*-mutated ctDNA 出現が有意差を持った予後因子であった ( $P < 0.001$ , 表 3)。なお、モニタリング中の *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9 の 2 つの時間依存性変数を用いた多変量解析を行うには症例数が少ないと判断されたので、モニタリング中の CA19-9 の時間依存性変数による多変量解析は行わなかった。またこれらを Simon-Makuch 法でグラフを作成した (図 10)。

表 3. 手術群における単変量解析と多変量解析

Prognostic factors	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Hazard ratio (95% CI)	P Value	Hazard ratio (95% CI)	P Value
Sex				
Male	1	Reference		
Female	0.76 (0.26-2.21)	0.61		
Age at surgery (median, 69.5 years)				
<70 years	1	Reference		
≥70 years	1.31 (0.45-3.80)	0.62		
Neo adjuvant chemotherapy				
No	1	Reference	1	Reference
Yes	3.10 (0.82-11.7)	0.09	0.62 (0.13-2.85)	0.53
Operation methods				
SSPPD and total pancreatectomy	1	Reference		
Distal pancreatectomy	0.72 (0.24-2.21)	0.57		
Tumor size				
≤2 cm	1	Reference		
>2 cm	2.98 (0.66-13.5)	0.16		
Pathological differentiation				
Well	1	Reference	1	Reference
Moderately and *others	4.12 (1.38-12.3)	0.01	1.93 (0.57-6.49)	0.29
AJCC T factor				
T1/T2	1	Reference		
T3/T4	3.05 (0.397-23.37)	0.28		
Lymph node metastasis				
Negative	1	Reference		
Positive	0.81 (0.28-2.33)	0.69		
AJCC stage				
IA/IB/IIA	1	Reference		
IIB/III/IV	0.81 (0.27-2.33)	0.69		
Pre-operative CA19-9 status				
≤37 U/ml	1	Reference		
>37 U/ml	0.99 (0.31-3.16)	0.98		
Presence of ctDNA before surgery				
Negative	1	Reference		
Positive	0.66 (0.14-3.0)	0.58		
CA19-9 status in monitoring	9.4 (1.23-72.2)	0.03		
Emergence of ctDNA in monitoring	57.2 (7.4-442.4)	<0.001	54.5 (6.64-447.6)	<0.001

\*Others include poorly, scirrhous, and adenosquamous; CI, confidence interval; SSPPD, subtotal stomach-preserving pancreaticoduodenectomy; AJCC, American Joint Committee on Cancer;

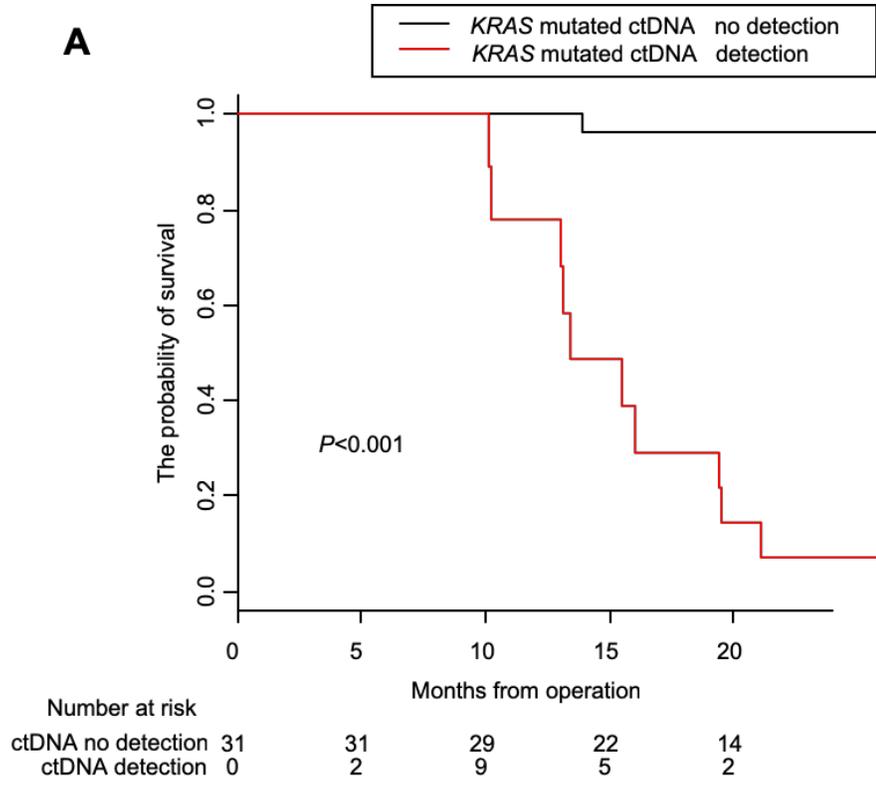
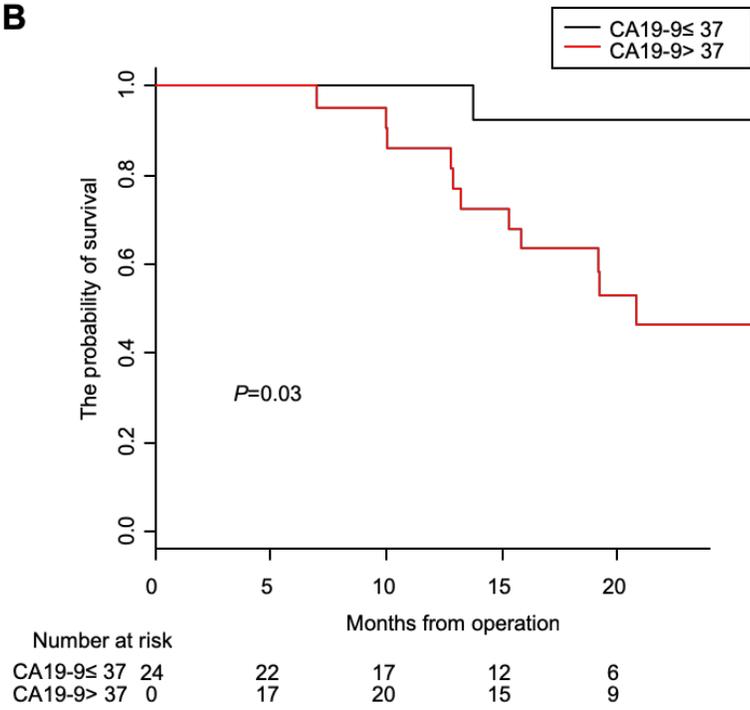
**A****B**

図 10. (A) 手術群における Simon-Makuch 法による *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無による予後曲線。(B) 手術群における Simon-Makuch 法による CA19-9 status による予後曲線。

4A. 手術群における術後 1 年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無と CA19-9 status による再発または予後との関係

長期的モニタリングを臨床的に応用するためにまず手術群における術後 1 年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無で再発または予後との関連を検討したところ、1 年以内に *KRAS*-mutated ctDNA が出現することは有意差を持って再発または予後予測因子となることが示された (図 11 と図 12)。

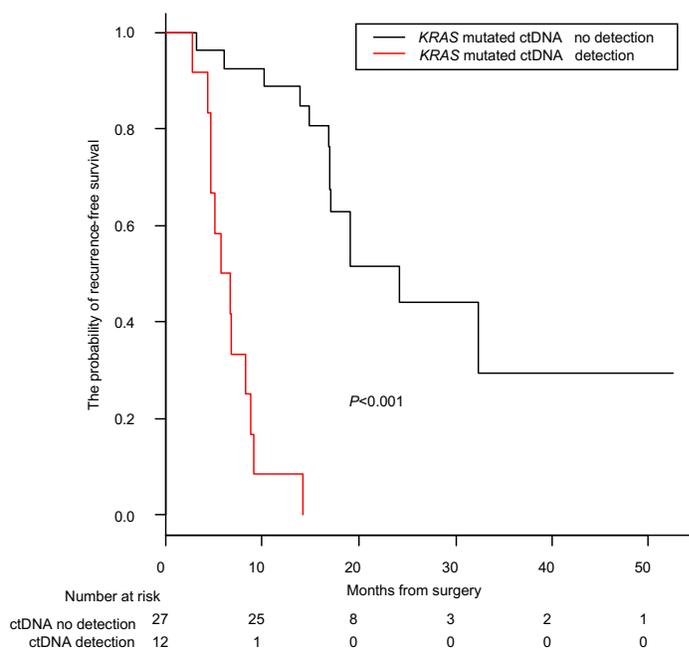


図 11. 手術群による 1 年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無による無再発生存曲線。( *KRAS*-mutated ctDNA の有 versus 無; 中央値 6.2 ヶ月 versus 24.2 ヶ月,  $P<0.001$  )。

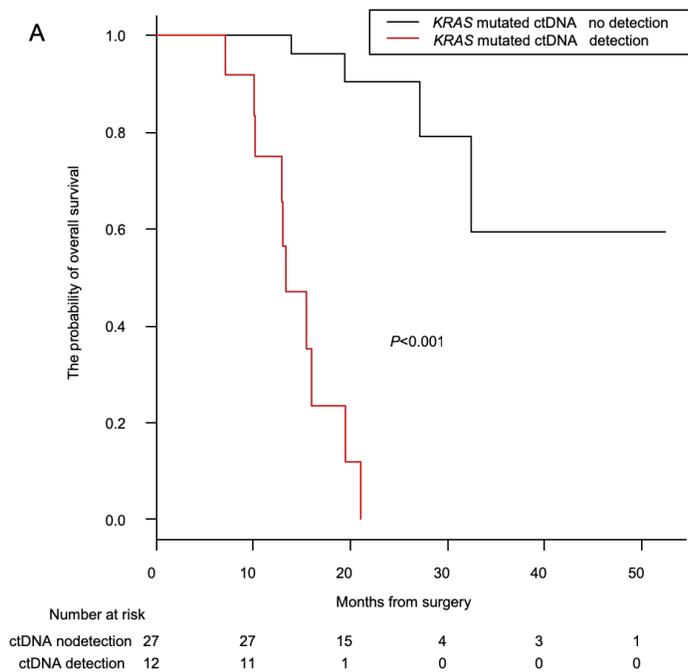


図 12. 手術群による 1 年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無による生存曲線。( *KRAS*-mutated ctDNA の有 versus 無; 中央値 13.4 ヶ月 versus not applicable,  $P<0.001$  )。

## 非手術群における *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9

### 1B. *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9 の一次化学療法前評価と治療効果と予後との関係

非手術群で一次化学療法が導入された 26 例において治療前に *KRAS*-mutated ctDNA が認められた症例は 12 例 (12/26, 46.2%) で、CA19-9 が高値である症例(CA19-9 > 37 U/ml) は 20 例 (20/26, 76.9%) であった。化学療法前の *KRAS*-mutated ctDNA の出現は治療効果

予測因子や予後不良因子の可能性が認められたが、CA19-9 status は治療効果予測因子や予後予測因子とはならなかった (図 13 と図 14)。

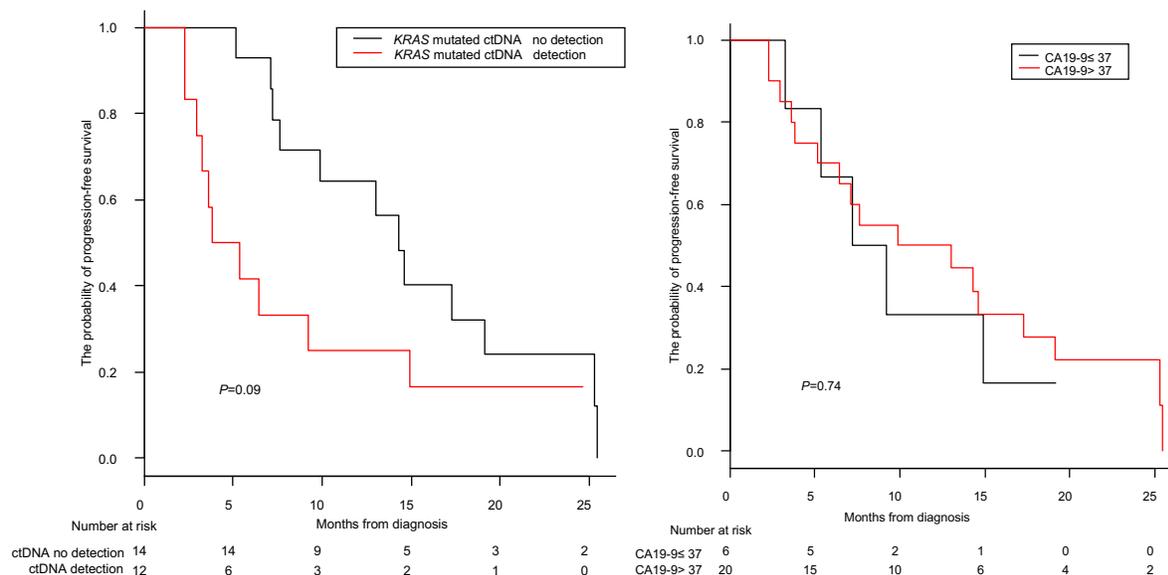


図 13. 化学療法群による治療前 *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無と CA19-9 status (CA19-9≤ 37 U/ml versus CA19-9> 37 U/ml)による無増悪生存曲線。それぞれ治療効果予測因子ではなかった (*KRAS*-mutated ctDNA の有無; 中央値 14.3 ヶ月 versus 4.6 ヶ月,  $P=0.09$ ), (CA19-9≤ 37 U/ml versus CA19-9> 37 U/ml; 中央値 19.8 versus 16.6 ヶ月,  $P=0.74$ )。

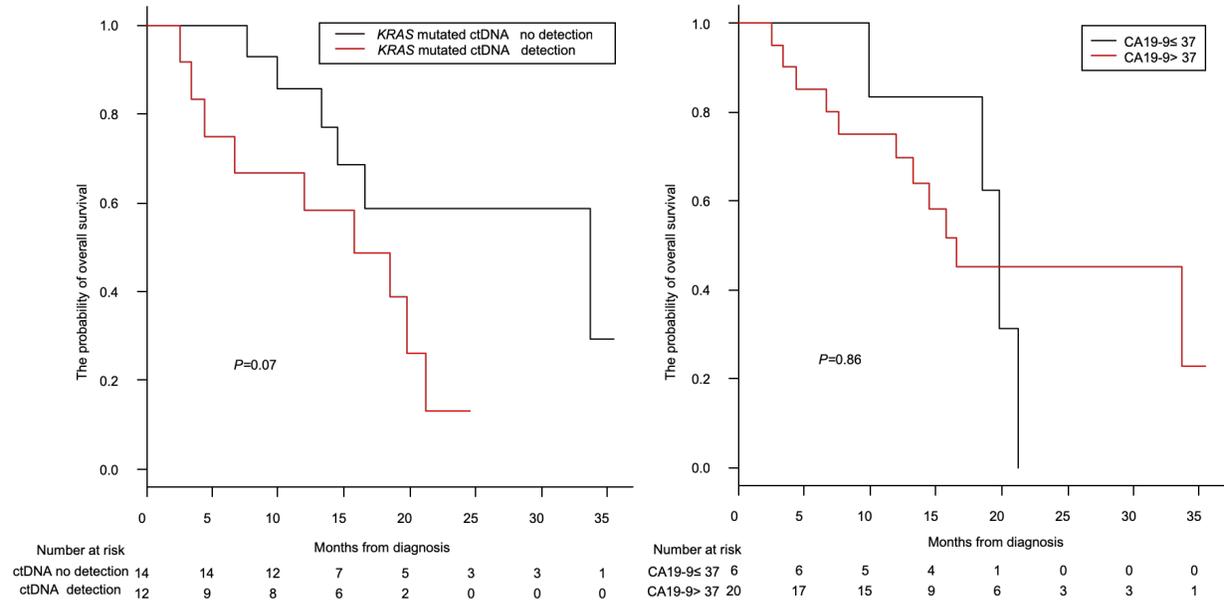


図 14. 化学療法群による治療前 *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無と CA19-9 status

(CA19-9 ≤ 37 U/ml versus CA19-9 > 37 U/ml)による生存曲線。それぞれ予後因子ではなかった (*KRAS*-mutated ctDNA の有無; 中央値 33.7 ヶ月 versus 15.8 ヶ月,  $P=0.07$ ), (CA19-9 U/ml ≤ 37 versus CA19-9 > 37 U/ml; 中央値 19.8 ヶ月 versus 16.6 ヶ月,  $P=0.86$ )。

## 2B. *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9 のモニタリング (N=39)

図 15 に非手術群における *KRAS*-mutated ctDNA と CA19-9 の長期的モニタリングと予後との関係を示す。手術群と同様に Fisher's exact test で検定を行うと *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無は有意差を持って予後と関連したが ( $P=0.005$ )、CA19-9 は多くの症例で高値(CA19-9 > 37 U/ml)となり、予後と関連しなかった ( $P=0.692$ )。また、この長期的モニタリングにより *KRAS*-mutated ctDNA が腫瘍動態を示した症例を示す (図 16)。



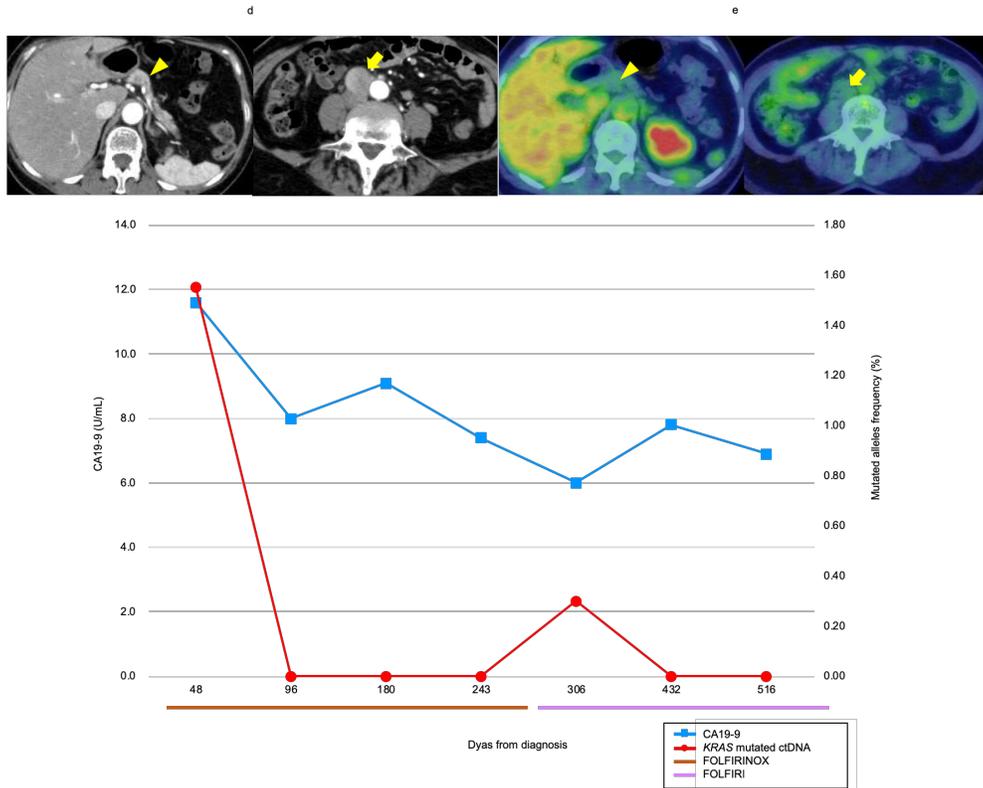


図 16. 超音波内視鏡下生検で、病理学的に膵体部がん (d, 黄矢頭)と傍大動脈リンパ節転移 (d, 黄矢印)と診断された患者。1次治療として FOLFIRINOX が開始され速やかに *KRAS*-mutated ctDNA は消失した。その後 17 サイクル後に末梢神経障害のために FOLFIRI に変更した。評価の PET で集積なく、画像上完全奏効の診断となった (e, 黄矢印と黄矢頭)。PET, Positron emission tomography; FOLFIRI, irinotecan, folinic acid and fluorouracil

### 3B. 生存解析 (N=39)

非手術群においても手術群と同様に 6 の臨床病理学的因子を用いて単変量解析と多変量解析を行ったところ、モニタリング中の *KRAS*-mutated ctDNA 出現が唯一の予後因子として抽出された ( $P < 0.001$ , 表 4)。非手術群においてはほとんどの症例でモニタリング開始から CA19-9 > 37 U/ml であり、時間依存性変数としての解析は行わなかった。生存曲線を Simon-Makuch 法でグラフを作成した (図 17)。

表 4. 非手術群における単変量解析と多変量解析

Prognostic factors	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Hazard ratio (95%CI)	<i>P</i> Value	Hazard ratio (95%CI)	<i>P</i> Value
Sex				
Male	1	Reference		
Female	0.82 (0.38-1.78)	0.61		
Age (median, 69.5 years)				
<70 years	1	Reference		
≥70 years	1.73 (0.80-3.71)	0.16		
AJCC stage				
Stage III	1	Reference		
Stage IV	1.27 (0.55-2.92)	0.58		
CA19-9 status*				
≤37 U/ml	1	Reference		
>37 U/ml	1.02 (0.45-2.28)	0.97		
Presence of ctDNA*				
Negative	1	Reference		
Positive	2.12 (0.99-4.57)	0.05	0.55 (0.22-1.39)	0.21
Emergence of ctDNA in monitoring	6.75 (2.23-19.9)	<0.001	10.4 (2.95-37.0)	<0.001

CI, confidence interval; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9; ctDNA, circulating tumor DNA; AJCC, American Joint Committee on Cancer; \*Initial evaluation in a monitoring

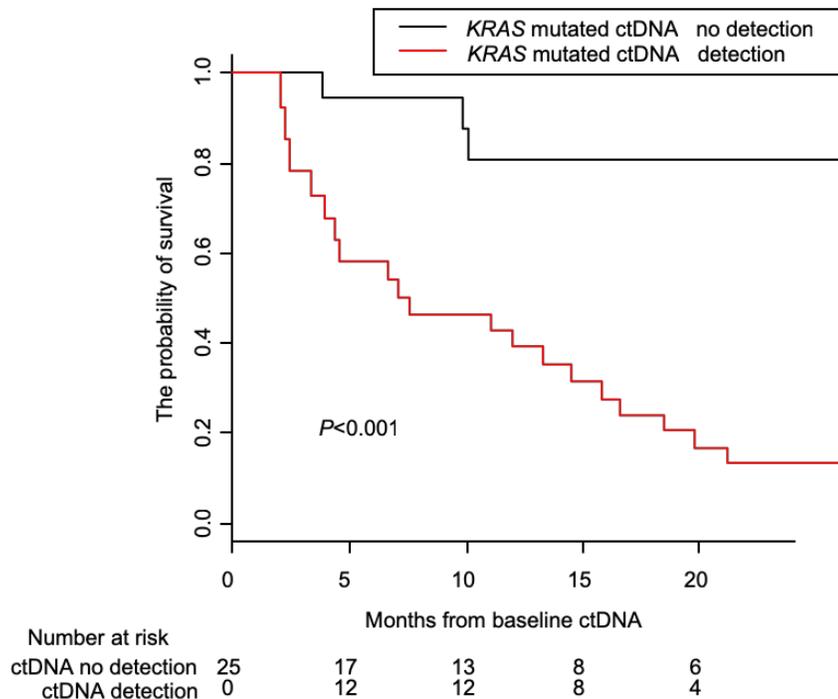


図 17. 非手術群における Simon-Makuch 法による *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無による予後曲線。

4B. 化学療法後、半年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の評価と治療効果または予後との関係 (N=26)

さらに、非手術群における長期的モニタリングを臨床的な意義を検討するために 3 ヶ月から半年以内に *KRAS*-mutated ctDNA が出現しているか、出現していないまたは消失した 2 群に分けて予後との関連を検討したところ、3 ヶ月から半年以内に *KRAS*-mutated ctDNA が出現することは化学療法に奏効せず、予後が改善しないことが示された (図 18 と図 19)。

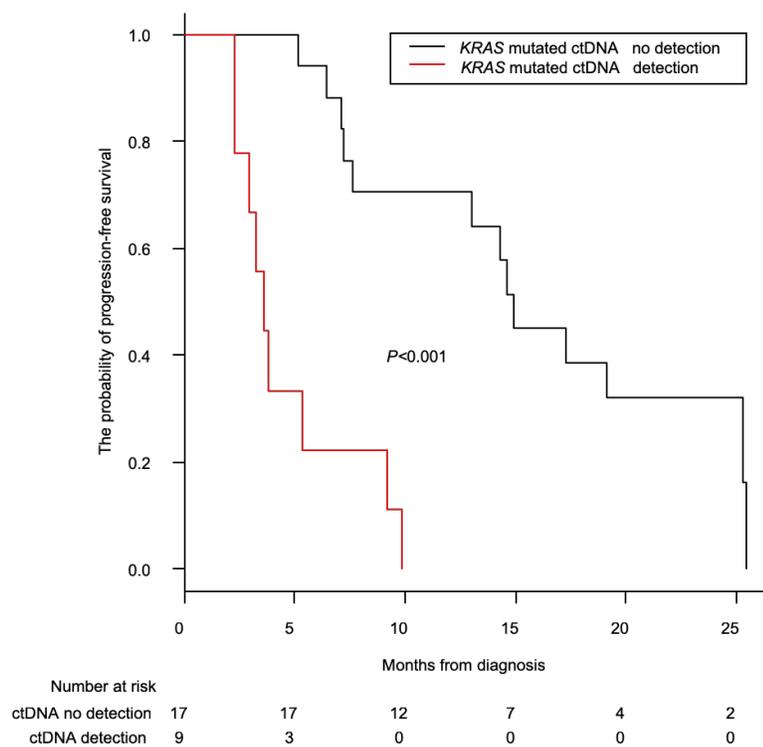


図 18. 非手術群のうち本研究時に一次治療が開始された 26 名における 3 ヶ月から半年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の出現と出現なしまたは消失の 2 群による無増悪生存曲線。 (*KRAS*-mutated ctDNA の有 versus 無; 中央値 3.8 versus 14.9 ヶ月,  $P < 0.001$ )。

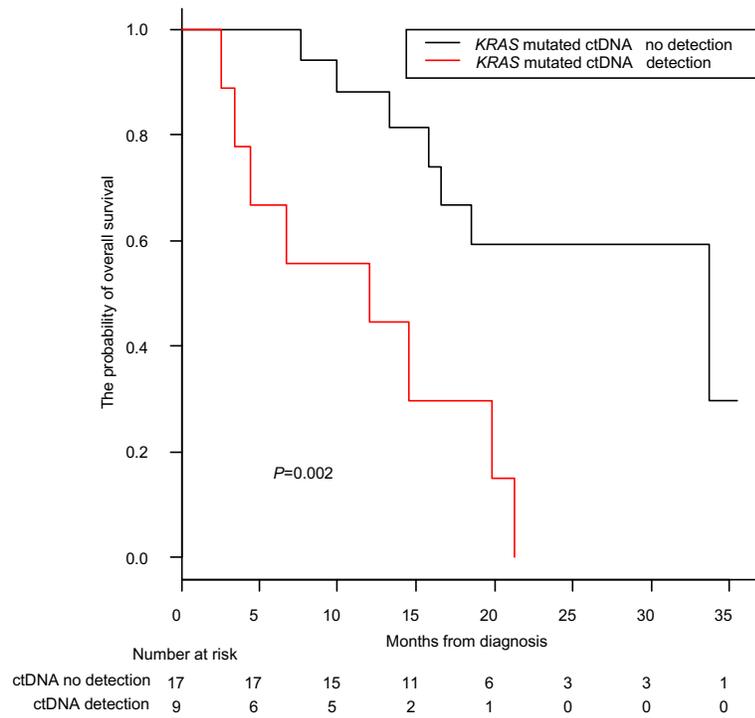


図 19. 非手術群のうち本研究時に一次治療が開始された 26 名における 3 ヶ月から半年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の出現と出現なしまたは消失の 2 群による生存曲線。  
 (*KRAS*-mutated ctDNA の有 versus 無; 中央値 12.0 ヶ月 versus 33.7 ヶ月,  $P=0.002$ )。

## 考察

本研究では、膵がん患者の *KRAS*-mutated ctDNA を長期的にモニタリングすることで、その出現は手術群でも非手術群でも予後予測因子となることを示した。さらに、手術群では、1年以内に *KRAS*-mutated ctDNA が出現しない症例は予後がよく、非手術群では半年以内に *KRAS*-mutated ctDNA 出現しないまたは消失した症例は、治療に奏効し予後が良いことを示し、一定間隔でのモニタリングがその後の治療効果を予測することを示した。

今回、膵がん患者の *KRAS*-mutated ctDNA を探索するにあたり、まず膵がん組織の *KRAS* 評価と heterogeneity の検証を行った。腫瘍内や原発巣と転移先の heterogeneity は以前から報告されているが<sup>32-34</sup>、それらは様々な治療に対する抵抗性に関係していると言われている<sup>35</sup>。一方で、橋本ら<sup>18</sup>は膵がんにおいて腫瘍内や原発巣とリンパ節転移間において *KRAS* 変異の heterogeneity は少ないと報告しており、さらに Makohon<sup>19</sup> にも *KRAS* や *SMAD4* などのドライバー遺伝子は、膵癌において原発巣と遠隔転移巣での heterogeneity は少ないと報告している。本研究でも、膵がん組織の腫瘍内と原発巣と転移先の *KRAS* 変異は90%以上で一致しており、膵がん組織においてその heterogeneity は稀であると考えられた。これらの結果より、*KRAS*-mutated ctDNA を探索する際に、原発巣の *KRAS* 変異で評価を行うこととした。

我々の研究では、手術前の *KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無で再発を予測することはできなかった。これまでに術前の ctDNA の評価で再発を予測する報告はないものの、術前の ctDNA の出現は予後予測因子であるという報告がある<sup>36</sup>。この報告は手術

症例 105 例での検討で、その術前の *KRAS*-mutated ctDNA の検出率は 31%であったが、我々の検討では手術群 39 例のうち術前に *KRAS*-mutated ctDNA を検索した 30 例の中で検出率は 23.3%と先行論文と比較すると症例数が少なく、かつ検出率がやや低いために予後予測因子とならなかった可能性がある。また、非手術群においても我々の結果からは治療前の *KRAS*-mutated ctDNA の出現は予後予測因子とはいえ、Del Re ら<sup>25</sup>や Tjensvoll ら<sup>26</sup>も同様の報告を行っていることから、ワンポイントの評価だけで予後予測することは難しいと考えられる。そこで我々は、リキッドバイオプシーは低侵襲であるため、複数回採取することができるという利点に着目し、*KRAS*-mutated ctDNA の長期的モニタリングを行った。その結果、手術の有無にかかわらず、*KRAS*-mutated ctDNA の出現の有無が膵がんの予後に関連すること示し、また *KRAS*-mutant ctDNA を時間依存性変数として扱い、その出現は膵がんの切除にかかわらず、予後と関連することも示した。これまでに膵がんの *KRAS*-mutated ctDNA に着目し、長期的モニタリングを行っている報告はほとんどなく、膵がん患者に対する手術群と非手術群の *KRAS*-mutated ctDNA のモニタリングがそれぞれ一報ずつ報告されている。手術群におけるモニタリングは Sausan<sup>37</sup>らが 20 人の膵がん患者を対象として術後の複数回のタイミングで *KRAS*-mutated ctDNA の評価を行い、その 20 人の膵がん患者のうち 10 人に術後のいずれかのタイミングで *KRAS*-mutated ctDNA が出現しており、その出現している患者は再発予測因子であると報告している ( $P=0.0199$ )。しかし彼らの報告は *KRAS*-mutant ctDNA を時間依存性変数として扱っていない。本来、生存解析を行う場合、術後に出現する *KRAS*-mutant ctDNA は時間依存性変数として扱い、解析しなければならないので、彼らの結果から術後の *KRAS*-mutant ctDNA の出現が再発予測因子であるとは正し

くは言えない。また、Bernard ら<sup>24</sup>は膵がんの *KRAS*-mutated ctDNA と exosome DNA の長期的モニタリングを行い化学療法との治療効果に対する検討を行っているが、彼らは exosome DNA のモニタリングの化学療法の治療効果に対する有用性を示す一方で *KRAS*-mutated ctDNA の有用性を示すことはできなかった。これらの違いの理由として、彼らは exosome DNA と *KRAS*-mutated ctDNA の検出率の差と結論付けており、その検出率は転移性膵がんでは exosome DNA は 85%、*KRAS*-mutated ctDNA は 57.9%、局所膵がんの検出率は exosome DNA で 67%、*KRAS*-mutated ctDNA で 45.5%であった。さらに *KRAS*-mutated ctDNA の血中の出現の機序は腫瘍が自発的に分泌する他に、ネクロシスやアポトーシスにより腫瘍から放出されるが、exosome DNA は循環している viable な細胞から分泌されることから腫瘍動態を反映しやすいとし、exosome DNA が有用としている。このように、exosome DNA が腫瘍動態を反映したという報告がある一方で、我々は長期モニタリングを行い、その結果、*KRAS*-mutated ctDNA の変化が腫瘍動態と関連していると思われた手術症例と化学療法症例の 2 症例を経験した。手術症例では、画像で再発が同定されるよりも早く、*KRAS*-mutated ctDNA が上昇し、化学療法症例では一次治療後、速やかに *KRAS*-mutated ctDNA が消失し、画像上、完全寛解であった。また、これまでに大腸がん患者において *KRAS*-mutated ctDNA と腫瘍動態の関連について当科からも報告をしたが<sup>17</sup>、Tjensvoll<sup>26</sup>らも化学療法を行なった膵がん患者において、腫瘍が増大した症例は、*KRAS*-mutated ctDNA が増加すると報告している。

今回の検討では、我々は、切除群では 1 年以内に *KRAS*-mutated ctDNA が出現しない症例は予後がよく、非切除群では半年以内に出現しない、消失する症例は、化学療法に

奏効することを示し、これらの結果から *KRAS*-mutated ctDNA を一定期間評価することで、予後に応じた膵癌患者の選別が可能であること示した。Marzia<sup>25</sup> にも化学療法患者に関して、化学療法後早期の *KRAS*-mutated ctDNA の変化が予後に関連すると報告しており、これは我々の結果を支持するものである。

一方で、カットオフ値を 37 U/ml とした場合の術前や化学療法前の CA19-9 の値は手術群においても非手術群においても再発や予後を予測することはできなかった。また、手術群において CA19-9 を時間依存性変数として扱った場合、CA19-9 が 37 U/ml より高値は予後予測因子であるが、非手術群ではほとんどの症例で治療開始時から CA19-9 は異常値であるため予後予測因子としては成り立たない。これまでも膵がんに対する CA19-9 のカットオフに関する論文は多数報告されている<sup>8</sup>。Ferrone ら<sup>6</sup> の報告では AJCC のステージ別による CA19-9 の中央値は、I A; 20.5 U/ml, I B; 86 U/ml, II A; 105 U/ml, II B; 164 U/ml, IV; 182 U/ml であるが、一方で Kim ら<sup>38</sup> は I A; 40.05 U/ml, II A; 469.64 U/ml, II B; 747.79 U/ml, IV; 3239 U/ml と報告している。さらに、術前の CA19-9 の値と予後と関係では、37 U/ml をカットオフ値とする報告は少なく<sup>39</sup>、Wasan ら<sup>40</sup> は 1096 U/ml、Maisey ら<sup>41</sup> は 958 U/ml、Kondo ら<sup>42</sup> は 500 U/ml をカットオフ値とし予後との関連を報告している。このように膵癌患者における進行度や予後を予測する CA19-9 の値に関する一定の見解はなく、適格な値の再考は重要であると考えられる。

本研究では、術前や化学療法前の *KRAS*-mutated ctDNA のワンポイントの評価で再発や予後を予測することはできなかったが、その後長期的なモニタリングを行うことにより切除群、非手術群にかかわらず、*KRAS*-mutated ctDNA の出現は予後に関連すること

を示した。現在、次世代シーケンスによる多数の遺伝子変異などの解析を行い、腫瘍情報を臨床現場に取り入れることがすでに米国では FDA で認可されているが、一般的な次世代シーケンスによるコストは 10~40 万円と高額である。従って、この方法でモニタリングすることは現実的ではない。しかし、今回のような *KRAS*-mutated ctDNA のモニタリングで 1 つの点変異を検索するのであれば、イニシャルコストはやや高いが、プライマーとプローブの費用を省いた場合、約 1000 円/回である。従って、今後、治療前に多数の遺伝子情報を次世代シーケンスで評価し、その後ターゲットとなる遺伝子を今回のような方法でモニタリングすることは現実的と考えられる。

また我々は、手術群においては 1 年以内、非手術群においては半年以内の *KRAS*-mutated ctDNA の出現が予後と治療効果に関連することを新たに示した。今後、一定期間の *KRAS*-mutated ctDNA の評価を行い、膵がん患者の選別に応用できる可能性がある。特に化学療法後の 3 ヶ月から 6 ヶ月後に ctDNA 中の *KRAS* 変異が出現した患者については、予後が悪いことが予想される。これらの予後不良が予測される患者の治療については、今後、免疫チェックポイント阻害剤などを含めた新規抗がん剤の導入などの適切な対応につながることを期待される。

## 結論

本研究は、膵がん患者において *KRAS*-mutated ctDNA の長期的なモニタリングを行い、その出現は切除にかかわらず予後に関連することを示し、また術後と化学療法後の一定期間の *KRAS* mutated ctDNA の評価が、治療効果に関連することを明らかにした最初の報告となる。しかし、本研究は、症例数や単施設の研究であることの課題も残している。今後、さらに多くの施設で多くの症例を前向きに集積することで、我々の研究を検証することが必要である。

## 謝辞

本研究は、日本学術振興協会科研費、財団法人日本自転車振興協会の助成を受けたものであり、ご支援いただいた関係各位に感謝いたします。本研究を遂行する機会を賜り、ご指導をいただいた自治医科大学附属さいたま医療センター外科系総合医学 力山敏樹教授、小西文雄前教授、鈴木浩一准教授に心から感謝申し上げます。そして、研究に付随する事務手続きや実験試薬、器具の準備や実験の補助など、本研究に直接、間接的に多大な貢献をしていただいた研究補助員の石坂依津子様にお礼申し上げます。

また、自治医科大学附属さいたま医療センター消化器一般外科、病理部の皆様、誠にありがとうございました。

## 参考文献

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63:11-30, 2013.
2. Hori M, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H, Group JCSR. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol* 45:884-91, 2015.
3. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet* 388:73-85, 2016.
4. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M, Unicancer GTDo, Intergroup P. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364:1817-25, 2011.
5. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Taberero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 369:1691-703, 2013.
6. Ferrone CR, Finkelstein DM, Thayer SP, Muzikansky A, Fernandez-delCastillo C, Warshaw AL. Perioperative CA19-9 levels can predict stage and survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 24:2897-902, 2006.

7. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J Gastrointest Oncol* 3:105-19, 2012.
8. Hartwig W, Strobel O, Hinz U, Fritz S, Hackert T, Roth C, Büchler MW, Werner J. CA19-9 in potentially resectable pancreatic cancer: perspective to adjust surgical and perioperative therapy. *Ann Surg Oncol* 20:2188-96, 2013.
9. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* 635:105-17, 2007.
10. De Mattos-Arruda L, Olmos D, Tabernero J. Prognostic and predictive roles for circulating biomarkers in gastrointestinal cancer. *Future Oncol* 7:1385-97, 2011.
11. Mead R, Duku M, Bhandari P, Cree IA. Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. *Br J Cancer* 105:239-45, 2011.
12. Kim K, Shin DG, Park MK, Baik SH, Kim TH, Kim S, Lee S. Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res* 86:136-42, 2014.
13. Kato S, Janku F. Cell-free DNA as a novel marker in cancer therapy. *Biomark Med* 9:703-12, 2015.
14. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 14:985-90, 2008.

15. Bidard FC, Madic J, Mariani P, Piperno-Neumann S, Rampanou A, Servois V, Cassoux N, Desjardins L, Milder M, Vaucher I, Pierga JY, Lebofsky R, Stern MH, Lantz O. Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int J Cancer* 134:1207-13, 2014.
16. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D, Caldas C, Rosenfeld N. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 368:1199-209, 2013.
17. Takayama Y, Suzuki K, Muto Y, Ichida K, Fukui T, Kakizawa N, Ishikawa H, Watanabe F, Hasegawa F, Saito M, Tsujinaka S, Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Konishi F, Rikiyama T. Monitoring circulating tumor DNA revealed dynamic changes in. *Oncotarget* 9:24398-24413, 2018.
18. Hashimoto D, Arima K, Yokoyama N, Chikamoto A, Taki K, Inoue R, Kaida T, Higashi T, Nitta H, Ohmuraya M, Hirota M, Beppu T, Baba H. Heterogeneity of KRAS Mutations in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* 45:1111-4, 2016.
19. Makohon-Moore AP, Zhang M, Reiter JG, Bozic I, Allen B, Kundu D, Chatterjee K, Wong F, Jiao Y, Kohutek ZA, Hong J, Attiyeh M, Javier B, Wood LD, Hruban RH, Nowak MA, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA. Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer. *Nat Genet* 49:358-366, 2017.
20. Castells A, Puig P, Móra J, Boadas J, Boix L, Urgell E, Solé M, Capellà G, Lluís F, Fernández-Cruz L, Navarro S, Farré A. K-ras mutations in DNA extracted from the

- plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 17:578-84, 1999.
21. Chen H, Tu H, Meng ZQ, Chen Z, Wang P, Liu LM. K-ras mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 36:657-62, 2010.
  22. Däbritz J, Preston R, Hänfler J, Oettle H. K-ras mutations in the plasma correspond to computed tomographic findings in patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 41:323-5, 2012.
  23. Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, Morimoto Y, Dohi C, Tsutsumi K, Kato H, Matsubara T, Okada H, Yamamoto K. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer* 121:2271-80, 2015.
  24. Bernard V, Kim DU, San Lucas FA, Castillo J, Allenson K, Mulu FC, Stephens BM, Huang J, Semaan A, Guerrero PA, Kamyabi N, Zhao J, Hurd MW, Koay EJ, Taniguchi C, Herman JM, Javle M, Wolff R, Katz M, Varadhachary G, Maitra A, Alvarez HA. Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 2018.
  25. Del Re M, Vivaldi C, Rofi E, Vasile E, Miccoli M, Caparello C, d'Arienzo PD, Fornaro L, Falcone A, Danesi R. Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci Rep* 7:7931, 2017.
  26. Tjensvoll K, Lapin M, Buhl T, Oltedal S, Steen-Ottosen Berry K, Gilje B, Soreide JA, Javle M, Nordgard O, Smaaland R. Clinical relevance of circulating KRAS mutated DNA in plasma from patients with advanced pancreatic cancer. *Mol Oncol* 10:635-43, 2016.

27. Yoshino T, Muro K, Yamaguchi K, Nishina T, Denda T, Kudo T, Okamoto W, Taniguchi H, Akagi K, Kajiwara T, Hironaka S, Satoh T. Clinical Validation of a Multiplex Kit for RAS Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET (RAS KEy Testing) Prospective, Multicenter Study. *EBioMedicine* 2:317-23, 2015.
28. Taniguchi H, Okamoto W, Muro K, Akagi K, Hara H, Nishina T, Kajiwara T, Denda T, Hironaka S, Kudo T, Satoh T, Yamanaka T, Abe Y, Fukushima Y, Yoshino T. Clinical Validation of Newly Developed Multiplex Kit Using Luminex xMAP Technology for Detecting Simultaneous RAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET-B Study. *Neoplasia* 20:1219-1226, 2018.
29. Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin WC, Mansour J, Mollae M, Wagner KU, Koduru P, Yopp A, Choti MA, Yeo CJ, McCue P, White MA, Knudsen ES. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* 6:6744, 2015.
30. Yachida S, White CM, Naito Y, Zhong Y, Brosnan JA, Macgregor-Das AM, Morgan RA, Saunders T, Laheru DA, Herman JM, Hruban RH, Klein AP, Jones S, Velculescu V, Wolfgang CL, Iacobuzio-Donahue CA. Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res* 18:6339-47, 2012.
31. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45:228-47, 2009.

32. Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467:1114-7, 2010.
33. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, Kinzler KW, Oliner KS, Vogelstein B. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486:537-40, 2012.
34. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366:883-892, 2012.
35. Rothé F, Laes JF, Lambrechts D, Smeets D, Vincent D, Maetens M, Fumagalli D, Michiels S, Drisis S, Moerman C, Detiffe JP, Larsimont D, Awada A, Piccart M, Sotiriou C, Ignatiadis M. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol* 25:1959-65, 2014.
36. Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, Sueda T, Hiyama E. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 115:59-65, 2016.
37. Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, Anagnostou V, Parpart-Li S, Murphy D, Kay Li Q, Hruban CA, Scharpf R, White JR, O'Dwyer PJ, Allen PJ, Eshleman JR, Thompson CB, Klimstra DS, Linehan DC, Maitra A, Hruban RH, Diaz

- LA, Jr., Von Hoff DD, Johansen JS, Drebin JA, Velculescu VE. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun* 6:7686, 2015.
38. Kim YC, Kim HJ, Park JH, Park DI, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Shin JH. Can preoperative CA19-9 and CEA levels predict the resectability of patients with pancreatic adenocarcinoma? *J Gastroenterol Hepatol* 24:1869-75, 2009.
39. Waraya M, Yamashita K, Katagiri H, Ishii K, Takahashi Y, Furuta K, Watanabe M. Preoperative serum CA19-9 and dissected peripancreatic tissue margin as determiners of long-term survival in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 16:1231-40, 2009.
40. Wasan HS, Springett GM, Chodkiewicz C, Wong R, Maurel J, Barone C, Rosbrook B, Ricart AD, Kim S, Spano JP. CA 19-9 as a biomarker in advanced pancreatic cancer patients randomised to gemcitabine plus axitinib or gemcitabine alone. *Br J Cancer* 101:1162-7, 2009.
41. Maisey NR, Norman AR, Hill A, Massey A, Oates J, Cunningham D. CA19-9 as a prognostic factor in inoperable pancreatic cancer: the implication for clinical trials. *Br J Cancer* 93:740-3, 2005.
42. Kondo N, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Hashimoto Y, Nakashima A, Sakabe R, Shigemoto N, Kato Y, Ohge H, Sueda T. Prognostic impact of perioperative serum CA 19-9 levels in patients with resectable pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 17:2321-9, 2010.