

氏 名	高 山 裕 司
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 547 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	大腸癌における治療中の KRAS 遺伝子変異の動態と臨床応用
論文審査委員	(委員長) 教授 亀 崎 豊 実
	(委 員) 教授 武 藤 弘 行 准教授 富 永 薫

論文内容の要旨

1 研究目的

切除不能進行大腸がんの標準的な治療である化学療法において、薬剤選択のためにはがんの遺伝子情報が必要となる。がん原遺伝子である *KRAS* 遺伝子に変異があると、下流の細胞内シグナル伝達は抑制されず、重要な分子標的治療薬である抗 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 抗体の効果が無い。しかし近年、治療中に *KRAS* 遺伝子を含む遺伝子変異状態が変化する可能性が報告され、薬剤選択に関わる重要な遺伝子変化として注目を集めている。本研究は、切除不能進行大腸がん (mCRC) 症例を対象に、治療中の変異型 *KRAS* 遺伝子の動態と臨床的特徴を明らかにすることを目的とする。

2 研究方法

遺伝子変異状態をモニタリングするためにリキッドバイオプシーとしてがん由来の血中遊離 DNA (ctDNA) の測定を行った。本研究においては、ctDNA として codon12/13 の変異型 *KRAS* 遺伝子 (MctDNA) を解析した。まず、血中遊離 DNA のサイズの測定やリキッドバイオプシーを行うために必要な血漿からの DNA 抽出、デジタル PCR の条件検討を行った。適切なカットオフ値の検討を行ったのち、がん組織で *KRAS* 変異型の症例を対象に MctDNA の感度と特異度を明らかにし、次に切除不能進行大腸がんに対して化学療法を施行されている全症例を対象に MctDNA のモニタリングを行い、MctDNA の動態を明らかにするとともに、臨床的な有用性を検討した。また、観察された変化の原因を検証するため、組織の高感度変異検索をデジタル PCR で行うとともに、*KRAS* 野生型のヒト大腸がんセルラインに抗 EGFR 抗体を投与して経時的な変異解析を行った。

3 研究成果

非担がん状態の症例の血漿において、血中遊離 DNA は 150-200bp の長さで観察された。切除不能進行大腸がん症例由来の血中遊離 DNA は 150-200bp と 250-350bp の 2 峰性に観察された。デジタル PCR でリキッドバイオプシーを行うために必要な検出感度を満たすための条件検討を行ったところ、抽出する血漿量と PCR 反応液にアプライするサンプル量はそれぞれ 2ml、8 μ l が最適だった。デジタル PCR のカットオフ値を幾つに設定するのが適切か、という問題に関して、On-chip

Sort を用いた検証を行ったところ、陽性ドロップレット数を 2 以上に設定すると疑陽性が排除されたため、今回の研究では 2 以上をカットオフ値とした。MctDNA の感度と特異度の検証では、がん組織で *KRAS* 変異型と判断された 22 症例、健常人 16 人を対象として検索したところ、感度は 86%、特異度は 100%であった。

次に、全症例（組織変異型 29 例、変異のない野生型 56 例）を対象とした MctDNA のモニタリングの結果を解析した。組織の変異率を反映するように、MctDNA の定量値や変異率（がん由来血中遊離 DNA/総血中遊離 DNA ×100）は組織変異型で有意に高く、前者では約 7 倍、後者では約 50 倍の差があった。

組織変異型では 23 症例（79.3%）で MctDNA が検出され、1st line で治療中の患者において検出群と非検出群で PFS（Progression Free Survival）を比較したところ、検出群で有意に PFS が短い結果となった（ $p<0.01$ ）。また、モニタリングの結果から MctDNA は病勢増悪の際に上昇、治療効果が高い際に低下、病勢が安定している際には横ばいで推移しており、すなわち臨床的な病勢の推移を反映していることが分かった。

野生型では 28 症例（50.0%）で検出され、組織変異型と同様に検出群では 1st line における PFS が有意に短い結果となった（ $p<0.01$ ）。モニタリングの結果を線グラフにして推移の形状を観察すると、野生型における MctDNA の出現には 3 つのパターンがあり、すなわち持続的、スパイク状、間欠的な出現に分類された。持続的な出現は CT（Computed Tomography）scan で判断される病勢増悪時に検出されており、治療耐性を示す可能性が示唆された。スパイク状に出現した症例の多くは治療効果が高く、すなわち治療効果を反映する可能性が示唆された。

治療開始後に肝転移巣において CT scan で形態学的な変化がみられた際に MctDNA のスパイクが出現した症例や、スパイクの出現後に、抗 EGFR 抗体を再度投与する re-challenge で 5th line にもかかわらず病勢安定を得た症例を経験した。

変化の機序を明らかにするため、MctDNA で同定された点変異と同じ変異が、がん組織の高感度変異検索で検出できるかどうか検証したところ、15 症例中 11 症例（73.3%）で検出された。しかし、MctDNA とがん組織では一致しない点変異も多くみられた。また、*KRAS* 野生型の大腸がんセルライン 3 種に抗 EGFR 抗体であるセツキシマブを投与したところ、投与後 1 ヶ月で Lim1215 において範囲割合 5.5%まで上昇し、投与 2 ヶ月では変異割合 14.2%まで上昇した。

4 考察

組織変異型において、MctDNA の動態は臨床的な病勢の推移を示しており、また、検出群では PFS が短くなる予後予測因子のバイオマーカーとなる可能性が示された。組織野生型においては変化のパターンを考慮する必要がある、スパイク状の出現は高い治療効果を示唆し、持続的な出現は治療耐性を示す可能性が示された。変化のメカニズムの検証では、多くの症例において血中で同定された点変異と同じ変異ががん組織で認められた一方、血漿と組織で一致しない点変異も多く同定され、MctDNA で確認された変化は潜在的な変異細胞の増殖に由来するもの、獲得変異に由来するもののどちらの可能性も示唆する結果となった。In vitro の検証では抗 EGFR 抗体による *KRAS* 変異株の増加が明らかとなった。

5 結論

MctDNA のモニタリングは、治療中の *KRAS* 変異状態の動態を明らかにするとともに、治療選択

に有益となる臨床的な特徴を示した。プレシジョンメディシンを行ううえで、治療標的となる遺伝子情報をモニタリングすることは非常に重要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

高山裕司氏の論文「大腸癌における治療中の KRAS 遺伝子異変の動態と臨床応用」は、切除不能進行大腸癌症例を対象として、治療中の変異型 KRAS 遺伝子の動態をリキッドバイオプシーとデジタル PCR を利用してモニタリングを行い、その臨床的特徴を明らかにした。

最初に、腫瘍由来の血中遊離 DNA サイズとリキッドバイオプシーに必要な DNA 抽出やデジタル PCR 条件を検討し、最適条件とカットオフ値を明らかにした。次に、癌組織において KRAS 変異型を持つ患者を対象に、リキッドバイオプシーにおけるデジタル PCR 感度と特異度を明らかにした。以上の設定条件により、患者 85 例の経時的なモニタリングを実施し、癌組織で変異型を有する患者の病勢と並行して検出され、progression free survival(PFS)低下の予測因子となる可能性を明らかにした。また、癌組織で野生型を有する患者においては、スパイク上の一過性の検出が高い治療効果を反映し、持続的な検出が治療耐性を示唆することを明らかにした。また、野生型から変異型出現についても、大腸癌セルラインを用いた in vitro の実験系で検証し、出現機序の仮説を提唱した。

上記結果については、現在 Oncotarget 誌に投稿中である。

審査会において、学位論文の記載の一部、特に実験条件の設定や登録患者背景について、より正確な記述の追加が必要であることや図表の記載様式や内容の追加修正が必要との比較的多くの指摘がなされた。

指摘された追加・修正点につき改訂され再提出された論文では、適切に修正追加がなされていることを全審査委員が確認した。

以上を審査委員全員で総合的に再審議した結果、本学の医学博士の資格に値するとの結論に達した。

最終試験の結果の要旨

審査会において、「大腸癌における治療中の KRAS 遺伝子異変の動態と臨床応用」として、大腸癌診療における現状や課題、切除不能進行大腸癌症例における変異型 KRAS 遺伝子動態のモニタリングの重要性、リキッドバイオプシーとデジタル PCR 技術の必要性とその条件、大腸癌治療における変異型 KRAS 遺伝子動態の臨床的特徴とその有用性、さらに野生型から変異型出現機序の仮説について非常に分かりやすく明確な発表が行われた。

その後の諮問においては、登録患者の人数や背景が図表間で整合性がとれていないことや実験的な検討条件の不明瞭な点など多くの質問がなされたが、それぞれの質問に対して誠実かつ適切に対応することができた。また、研究発表内容や諮問に対する応答内容から、十分な周辺知識と見識を備えていると考えられた。さらに、大学院での研究の前半を学外社会人として実施してきた意欲と今後の研究の継続と発展への意気込みについても審査委員全員が高く評価し、合格と判定した。