

小児科抄読会

2018/12/27

岩井/真部先生

本日の論文

Science

REPORTS

Cite as: J. D. Cohen *et al.*, *Science*
10.1126/science.aar3247 (2018).

Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test

Joshua D. Cohen,^{1,2,3,4,5} Lu Li,⁶ Yuxuan Wang,^{1,2,3,4} Christopher Thoburn,³ Bahman Afsari,⁷ Ludmila Danilova,⁷ Christopher Douville,^{1,2,3,4} Ammar A. Javed,⁸ Fay Wong,^{1,2,3,4} Austin Mattox,^{1,2,3,4} Ralph H. Hruban,^{3,4,9} Christopher L. Wolfgang,⁸ Michael G. Goggins,^{3,4,9,10,11} Marco Dal Molin,⁴ Tian-Li Wang,^{3,9} Richard Roden,^{3,9} Alison P. Klein,^{3,4,12} Janine Ptak,^{1,2,3,4} Lisa Dobbyn,^{1,2,3,4} Joy Schaefer,^{1,2,3,4} Natalie Sillman,^{1,2,3,4} Maria Popoli,^{1,2,3,4} Joshua T. Vogelstein,¹³ James D. Browne,¹⁴ Robert E. Schoen,^{15,16} Randall E. Brand,¹⁵ Jeanne Tle,^{17,18,19,20} Peter Gibbs,^{17,18,19,20} Hui-Li Wong,¹⁷ Aaron S. Mansfield,²¹ Jin Jen,²² Samir M. Hanash,²³ Massimo Falconi,²⁴ Peter J. Allen,²⁵ Shubin Zhou,^{1,3,4} Chetan Bettegowda,^{1,2,3,4} Luis Diaz,^{1,3,4} Cristian Tomasetti,^{3,6,7*} Kenneth W. Kinzler,^{1,3,4*} Bert Vogelstein,^{1,2,3,4*} Anne Marie Lennon,^{3,4,8,10,11*} Nickolas Papadopoulos^{1,3,4*}

背景①

悪性腫瘍の治療において限局している腫瘍の多くは全身的な治療(化学療法、放射線療法)なしに、外科的治療のみで、良好な治療成績を得られることが知られている。

一方で、遠隔転移を伴う悪性腫瘍では外科的治療による切除は非常に困難である。



遠隔転移を来す前に腫瘍を発見することが腫瘍研究の一つのゴールである。

背景②

成人の腫瘍では、進行がんに至るまでに20-30年の期間を有すると考えられている。

Clin. Cancer Res. 18, 6339–6347

経過の中の最後の数年のみが転移病変として出現し、認知できるようになると考えられている。

Engl. J. Med. 373, 1895–1898 (2015)



腫瘍の出現から転移巣の出現までには長い期間があると推測される。

転移巣が出現しても画像的に明らかでない腫瘍であれば、全身治療によって50%は治癒できるとの報告もある。

背景③

- ・現行の腫瘍検索の手段としてはPSAに代表される血液検査に加えて、内視鏡やマンモグラフィーなどが利用されている。
- ・その中で血液検査は偽陽性も多く、不必要なフォローアップや患者への心理的負担を増加させている原因となっている。
- ・そのため腫瘍検索のための血液検査においては、より特異度の高い検査の開発が望まれている。



Liquid Biopsyは体細胞の遺伝子変異を調べることで腫瘍検索において高い特異度をえられる事が期待されている。

背景④

Liquid Biopsyにおける現行の問題点としては

- ① **正常人での大規模な研究**が実施されておらず、特異度が明確でない点
- ② **早期がんにおいて、ミューテーションが少ない例では、検査能力の限界で検出が困難**である点
- ③ Liquid Biopsyにおいては腫瘍の存在は判明しても、**どの臓器に腫瘍が存在しているかの検索は困難**である点。

の3つが大きな問題点である。

本研究の目的

前述のLiquid Biopsyの問題を解決可能な新しいLiquid Biopsy (CancerSEEK) を企画し、その感度と特異度の評価を行うことで有用性を評価する。

CancerSEEK

先行研究から

- ・血漿DNAでの検査は腫瘍の限局場所の検索には限界があり
- ・タンパクの発現と遺伝子マーカーを組み合わせることで腫瘍の所在の検索感度を上昇させることが可能であることが知られている。



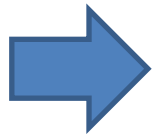
本研究では、**プロテインパネル**と**遺伝子マーカー**を併用して評価することで腫瘍の存在および所在を検索する方法を採用した。

CancerSEEK : PCR

CancerSEEKにおいて

プライマーは以下の4点を可能にすることを目標としてデザインされた。

- ① **複数の腫瘍の検索**ができるのに十分な塩基数をもち
- ② **低頻度の遺伝子変異**も十分に検出でき
- ③ **人工的な変異に伴うノイズ頻度を低減**させるために最低限の塩基数で
- ④ **費用対効果の高い**検査である事。



卵巣癌・肝癌・胃癌・膵癌・食道癌・大腸癌・肺癌・乳癌
の8つのがんの変異を検出する最低限の塩基数の**増幅**
産物の検索を公開シーケンスデータから行った。

CancerSEEK: 増幅産物数と感度について

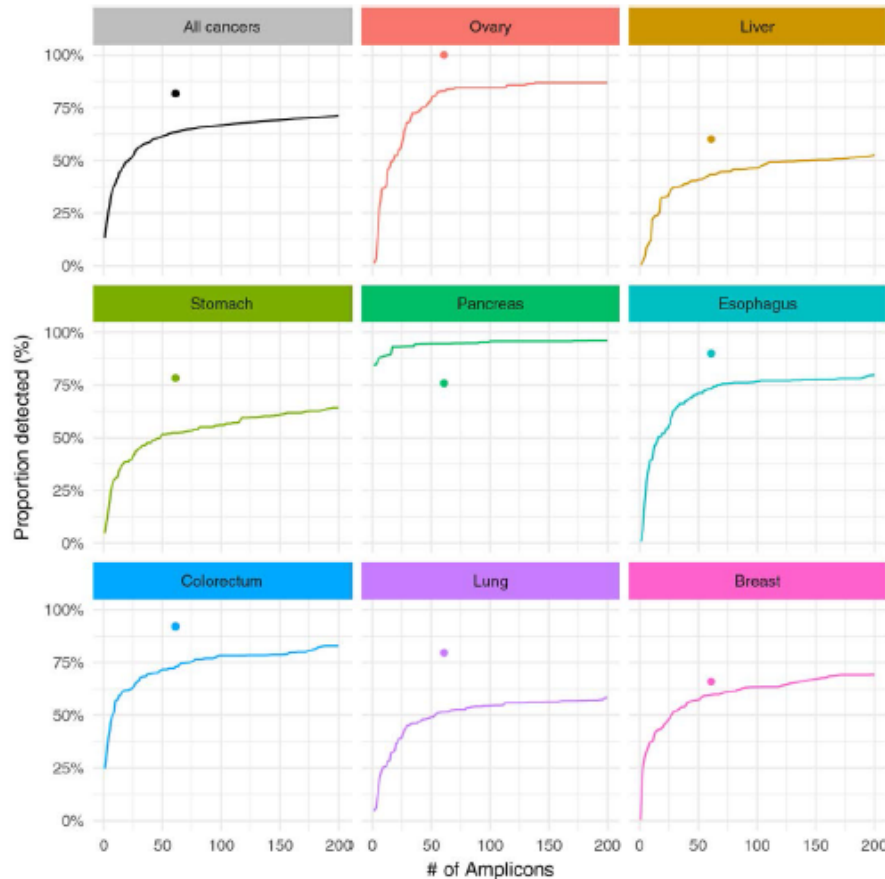


Fig. 1. Development of a PCR-based assay to identify tumor-specific mutations in plasma samples. Colored curves indicate the proportion of cancers of the eight types evaluated in this study that can be detected with an increasing number of short (< 40 bp) amplicons. The sensitivity of detection increases with the number of amplicons but plateaus at ~ 60 amplicons. Colored dots indicate the fraction of cancers detected using the 61-amplicon panel used in 805 cancers evaluated in our study, which averaged 82% (see main text). Publicly available sequencing data were obtained from the Catalog of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) repository.

本研究において、増幅産物数と検出感度はべき乗則の関係にあることが明らかになった (Fig.1)。

増幅産物数が60を超えると検出感度はプラトーになり、偽陽性が増加する。

増幅産物数 (Amplicon) の設定について

- ・前述のデータより本研究では増幅産物数について61個の増幅産物数パネルを使用した。
- ・増幅産物数の平均塩基数は33で、16の遺伝子のうち1つ以上を含むように設定された。



- ・本研究で解析された805例のがん症例に対する今パネルでの結果は、
 - 82%で1遺伝子変異
 - 47%で2遺伝子変異
 - 8%で3つ以上の遺伝子変異を認めた。

CancerSEEK: 蛋白マーカー解析

・早期がんではctDNAの放出が少なく、検出には非常に高い感度が必要であることが知られている

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, 10202–10207 (2017).

・一方で一部の蛋白は、早期がんの発見において有用であることが報告されている。

Clin. Adv. Hematol. Oncol. 1, 460–462 (2003)



PCRでの解析に加えて、蛋白での検査を実施することで、より早期がんの検出精度が上昇すると考えられた。

CancerSEEK: 蛋白マーカー解析

・過去の文献から、前述の8つのがんの検出において、**感度10%以上、特異度99%以上**と報告されている蛋白マーカーを**41個**を分析した。

免疫分析にて再現性のある分析のできる蛋白は上記のうち**39個**であった。

上記39個のうち、**8個**の蛋白が、健常人と担癌患者の弁別に有用であった。(CEA/HGF/Myeloperoxidase/OPN/Prolactin/CA19-9/CA-125/TIMP-1)

分析①

- ・ステージI~IIIの前述の8つのがんと診断された1005例の患者群についてCancerSEEKを用いて検査を行った。
- ・採血以前にネオアジュバンド化学療法を施行した例はいなかった。
- ・症例の年齢中央値は64歳(22-93歳)であった。
- ・病期については下記表のとおりであった。

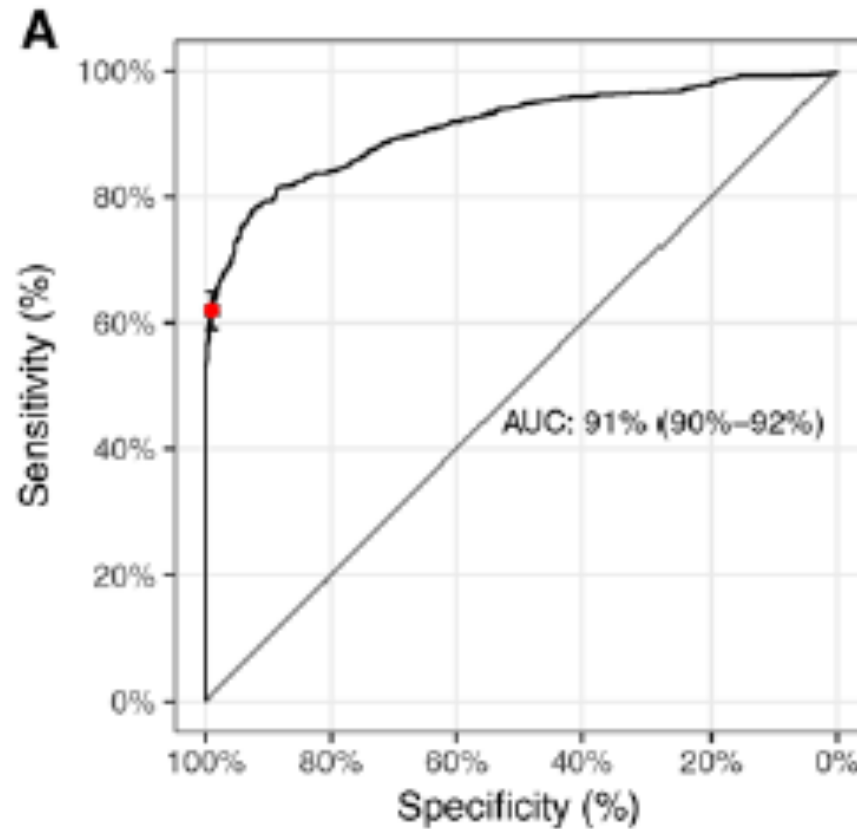
Stage	割合(%)
I	20
II	49
III	31

- ・対照群として812例の健常人のサンプルと比較を行った。
- ・対照群の年齢中央値は55歳(17-88歳)であった。
- ・対照群は、癌/高度異形成/自己免疫疾患/CKDの既往がない症例が選択された。

分析①

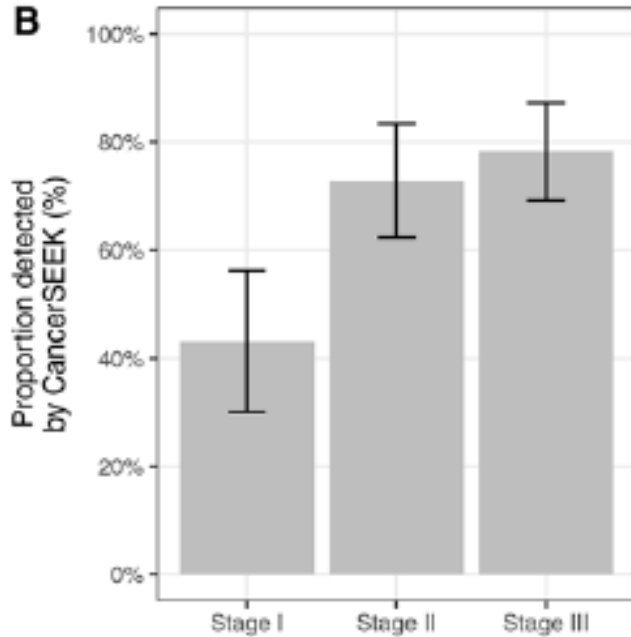
- ・ 前述の、癌症例群と対照群をCancerSEEKにて、8個の蛋白と2001のゲノム位置の変異の存在を評価した。
- ・ 8個の蛋白のいずれかの上昇あるいは、遺伝子変異の存在があるものすべてを陽性として判断した。
- ・ 統計学的解析は、ロジスティック回帰分析を使用し、感度と特異度に関しては交差検証を使用した。

結果①

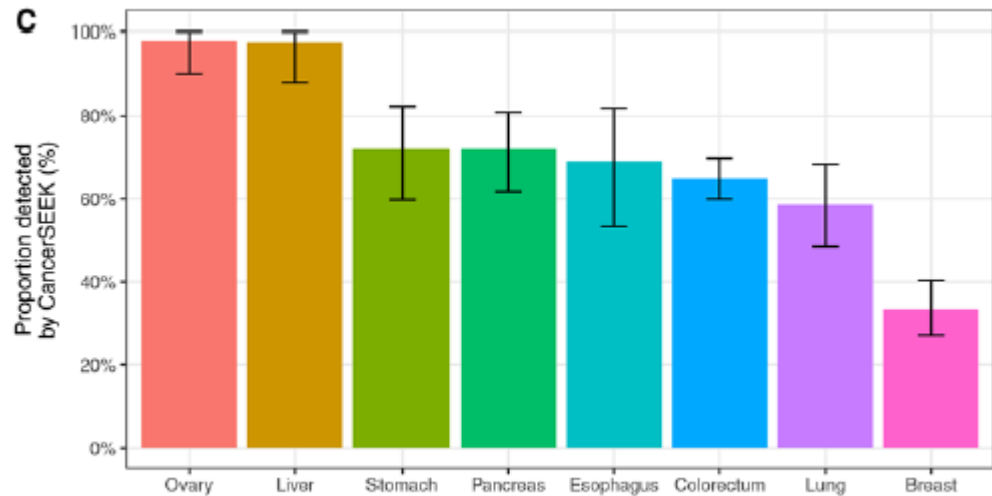


ROC曲線において赤点の場所が特異度99%以上で感度が最大(62%)になる点。
AUCは91%であった。
この点では812例のコントロール群のうち7例のみが陽性と判断された。

結果



Stage別の感度では、
Stage I : 43%
Stage II : 73%
Stage III : 78%であった。
Stage I で最も感度が高かったのは
肝臓 : 100%で
最も低かったのは
食道癌 : 20%であった。



疾患別の感度では、
卵巣癌が98%で最も高く
乳癌が33%で最低であった。

分析②

- Liquid Biopsyの基本概念としてctDNAは細胞死した腫瘍細胞から放出されると考えられている。
- CancerSEEKにおいても、原発巣とctDNAの遺伝子変異が一致するか、検討を行う必要性があると考えられた。



▪ 153例のctDNAが十分に評価できるレベルまで採取できた群で原発巣とctDNAの遺伝子変異の比較を行った。



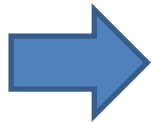
153例中138例(90%)で同様の遺伝子変異が認められ、
卵巣癌と膵癌では100%の一致率であり
胃癌では82%一致率であった。

分析③

- Liquid Biopsyの限界の一つに、検査陽性群において腫瘍の原発巣の特定までは至れない点がある。

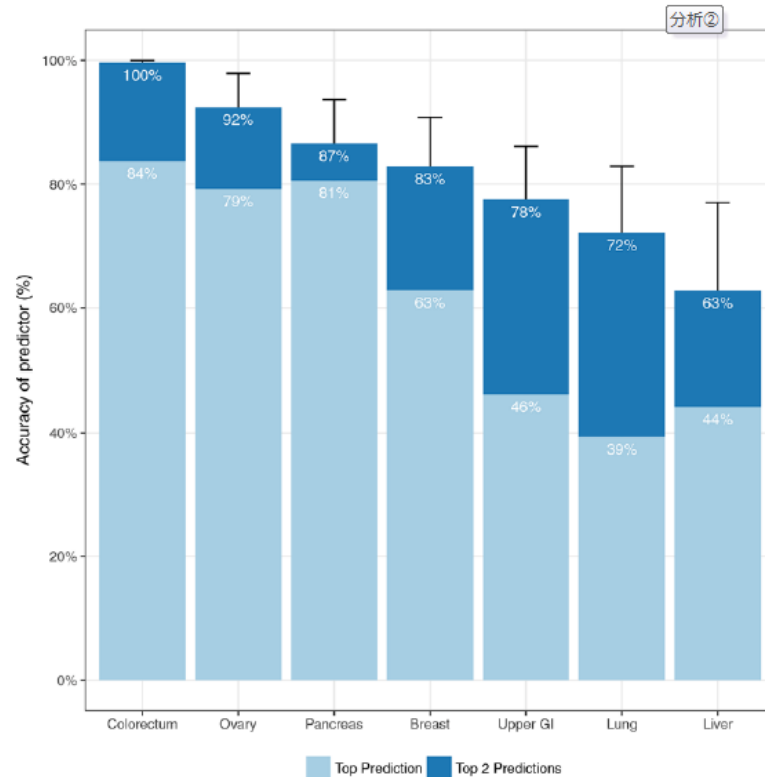


- CancerSEEKにおいて、機械学習を併用することで、原発巣の特定および、陽性群の適切なフォローアップ法の決定の補助となりうるか検討を行った。



- 機械学習のアルゴリズムに、ctDNA及び蛋白マーカーの結果と性別のみをインプットし、CancerSEEKにて陽性となった626例について分析を行った。

結果③



- 全体の83%で原発巣を2か所まで限定することができ、全体の63%で原発巣を1か所まで限定することができた。
- 大腸がんが最も正確性が高く
肺癌が最も正確性が低い結果となった。

考察

- ・本研究は、ctDNAと蛋白マーカーという機序の違う要素の検査を組み合わせることで、特異度を下げることなく感度の上昇を得られるという点を明らかにした。
- ・今後は、同様に代謝物やmRNA転写物、メチル化DNAなどの検査も同様の分析をすることで、感度を上昇や原発腫瘍の的中率に貢献すると考えられる。
- ・また費用としては、\$500程度となると考えられており、従来のスクリーニング検査と比較して安価であると考えられる。

考察: Limitation

①本研究の症例群は、既に診断のついている症例であり、実臨床でのスクリーニングの機会としては、より病期の進んでいない症例群が対象となると考えられる。

→実際の感度は本結果よりも低下すると考えられる。

②本研究の対照群は、健康な症例群を選択しているが、実臨床では、より多くの背景疾患を持つ患者数が比較となると考えられる。

→実際の偽陽性率は本結果よりも上昇すると考えられる。

③本研究の症例群の個々の疾患の割合は、実際の疫学的な割合とは異なっている。疫学のデータにて補正をかけると、感度は55%程度になると予想される。

→日本とも患者群が異なるために、検討が必要か。

結論

- CancerSEEKによって主要な固形癌の早期発見が可能になれば、癌による死亡率を低下されることが期待される。
- しかし、実臨床への導入や効果の検証のためにはより多くの種類の腫瘍での前向き研究が施行される必要性があると考えられる。