

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「早期診断マルチバイオマーカー開発」
(循環腫瘍細胞捕捉診断システムの研究開発)
2. 研究開発代表者： 山本 信之 (公立大学法人和歌山県立医科大学内科学第三講座)
3. 研究開発の成果

平成 26 年度に確立した自動化 CTC 診断装置での CTC 検出法を用いて、CTC の質的診断の検討および確立を進めた。具体的には CTC における programmed death-ligand 1 (PD-L1) の発現検出法を確立した。H820、H441、A549、H23 の PD-L1 発現の異なる肺がん細胞株を用いてスパイクイン実験を経た後に、肺がん 65 例において、CTC の検出及び PD-L1 の発現検討を行った。65 例中 64 例において CTC を検出し、43 例にて PD-L1 発現陽性を認めた。特徴的なこととして、CTC で PD-L1 陽性を認める症例において、PD-L1 発現陽性と陰性の CTC が混在することが観察された。また、検出された CTC についていくつかの特徴が観察された。多くの CTC はシングルセルとして単独で存在しているが、一部の CTC はクラスターを形成していることが観察された。そして一部の CTC は正常白血球と結合して存在していることも観察された。また正常白血球と結合する CTC は、シングルセルよりも、クラスターを形成している CTC に有意に多い傾向が示された。これらのクラスターCTC における PD-L1 発現や正常白血球との結合については、その生物学のおよび臨床的意義は現在のところ不明である。

前向きのコホートにて CTC の効果予測バイオマーカーとしての評価を行う試験を行った。「免疫チェックポイント阻害剤における効果・副作用予測因子を検討する、腫瘍組織・血液を用いたバイオマーカー研究」として研究計画を立て、和歌山県立医科大学倫理委員会にて承認を得た。試験デザインは以下である。病理診断にて肺癌と診断され、本研究に腫瘍組織や血液検体を提供でき、抗 PD-1/PD-L1 抗体にて治療を受ける症例を対象とし、治療開始前、治療開始後 4 週、8 週、12 週、24 週及び増悪時に CTC の検出を行い、CTC における PD-L1 発現の測定を行う。加えて、可能な限り治療開始直前に再生検を行い、CTC 測定と同じポイントでの組織検体の採取を試み、PD-L1 発現の評価を行う。登録症例数は 22 例であった。

今後は本研究事業において確立した技術基盤を用いて、抗 PD-1/PD-L1 抗体治療における CTC の効果予測バイオマーカーとしての検討をさらに推し進める。具体的には、次世代シーケンサーによる CTC 及び血漿 DNA を用いての全エクソーム解析もしくはホットスポット解析により non-synonymous mutation の検出を行い、これら mutation の総量 (mutation burden) と抗 PD-L1 抗体の奏功との相関について検討を行う。これらの探索的ゲノム解析を進めるためには、CTC のシングルセル解析が可能である必要があるが、本事業において基板上でのマニピュレーターを用いての CTC の採取に取り組み、技術的に可能であることを確認している。また、CTC から抽出した DNA の全ゲノム増幅については、臨床的に重要ながん関連遺伝子に限定したターゲットシーケンシングにおいては問題ないことについても本事業において確認した。今後は腫瘍組織と CTC での変異プロファイルの比較を進める。腫瘍組織については可能な限り、治療直前に再生検を実施することで、同じ採取ポイントでの腫瘍組織と CTC の比較検討を可能とする予定である。