



Title	膵臓癌のリキッドバイオプシーによる循環腫瘍DNAの臨床的有用性に関する研究
Author(s)	渡邊, 一永
Description	配架番号 : 2929
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16437号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16437
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95973
Type	doctoral thesis
File Information	WATANABE_Kazunori.pdf



学 位 論 文

膵臓癌のリキッドバイオプシーによる
循環腫瘍 DNA の臨床的有用性に関する研究
(A study on the clinical utilities of liquid biopsy
circulating tumor DNA in pancreatic cancer)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

渡邊 一永

学 位 論 文

膵臓癌のリキッドバイオプシーによる
循環腫瘍 DNA の臨床的有用性に関する研究

(A study on the clinical utilities of liquid biopsy
circulating tumor DNA in pancreatic cancer)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

渡邊 一永

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語集	5 頁
緒言	6 頁
実験方法	8 頁
実験結果	23 頁
考察	45 頁
総括および結論	49 頁
利益相反	50 頁
謝辞	51 頁
引用文献	52 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kazunori Watanabe, Toru Nakamura, Yasutoshi Kimura, Masayo Motoya, Shigeyuki Kojima, Tomotaka Kuraya, Takeshi Murakami, Tsukasa Kaneko, Yoshihito Shinohara, Yosuke Kitayama, Keito Fukuda, Kanako C Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Fabio Pittella Silva, Toshikazu Yamaguchi, Satoshi Hirano, Yusuke Nakamura, Siew-Kee Low
Tumor-informed approach improved ctDNA detection rate in resected pancreatic cancer
International Journal of Molecular Sciences, 23 (19) :11521・2022

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Kazunori Watanabe, Siew-Kee Low, Toru Nakamura, Yasutoshi Kimura, Masayo Motoya, Kimitaka Tanaka, Aya Matsui, Yoshitsugu Nakanishi, Toshimichi Asano, Takehiro Noji, Takahiro Tsuchikawa, Satoshi Hirano
Detection of ctDNA in pancreatic cancer using ultradeep targeted NGS using unique molecular index
第 34 回肝胆膵外科学会・学術集会, 2022 年 6 月 10-11 日・愛媛

要旨

【背景と目的】

膵臓癌は非常に予後不良な癌の 1 つであり、診断時に 8 割の症例が手術不能とされる。手術が唯一の根治的治療であるが、化学療法や放射線療法の奏効率が低く術後に有効な治療法が少ない。根治切除症例でも 2 年以内に 8 割が再発するため早期診断・再発の検出方法の探索、更なる治療法の開発が急務である。

現在、膵臓癌におけるモニタリングは腫瘍マーカーである CA19-9、画像検査で行われているが、CA19-9 は上昇しない症例（Lewis 抗原陰性）があり、また、画像検査はある程度の増大を認めて初めて検出が可能となる。

近年、次世代シーケンサー（next generation sequencing : NGS）によるリキッドバイオプシー（Liquid biopsy : LBx）解析が進められているが、膵臓癌においては *KRAS* 変異を対象とした ddPCR（droplet digital polymerase chain reaction）による評価が多く、NGS による LBx の有用性を評価した報告は少ない。

本研究は根治切除を施行した膵臓癌を対象とし、LBx の臨床的有用性を NGS で評価することを目的とした。ctDNA（circulating tumor deoxyribonucleic acid）の検出率を明らかにすると共に、ctDNA 検出率を向上させる方策として、腫瘍のゲノムプロファイリングに基づいたアプローチ（Tumor informed approach : TIA）の有用性に関しても検討を行った。

【材料と方法】

2019 年 6 月から 2020 年 12 月に北海道大学病院、札幌医科大学附属病院の二施設で手術を受けた膵臓癌患者 152 症例の内、基準を満たさなかった 7 症例を除いた 145 症例を対象とした。原発巣検体と術前に採取した血漿から gDNA（genome DNA）、cfTNA（cell free total nucleic acid）を抽出し、遺伝子パネルを用いたターゲットシーケンスを施行し、血漿サンプルを用いた LBx のみでの評価と TIA を基にした評価を行った。評価した ctDNA、腫瘍のゲノムプロファイリング、CA19-9 を用いて術後再発との関連についても検討した。腫瘍中の *KRAS* については ddPCR でも評価した。

【結果】

LBx のみの評価では、145 症例中 51 症例（35.2%）に変異が検出された。TIA を用いることで 145 症例中 69 症例（47.6%）に検出率が上昇した（ $p=0.0425$ ）。特にサンプル採取が治療介入前の 71 症例では、TIA によって有意に変異検出率が向上したが（ $p=0.0435$ ）、治療介入後の 74 症例では有意な変異検出率の向上を認めなかった（ $p=0.4892$ ）。また、*KRAS* ctDNA 検出率は治療介入前の症例と比較し、治療介入後の症例の方が有意に検出率が低かった（ $p=0.0038$ ）。

病理学的因子のうち T、N 因子は ctDNA の検出と関連を認めず、M 因子のみが ctDNA の検出と有意な関連を認めた ($p=0.0476$)。NGS では腫瘍中から *KRAS* 変異が 112 症例 (77.2%) 検出され、*TP53* は 76 症例 (52.4%)、*SMAD4* が 25 症例 (17.2%)、*CDKN2A* が 12 症例 (8.3%) に検出された。*KRAS* ddPCR では 133 症例 (91.7%) で検出され、NGS よりも検出率が高かった。NGS と ddPCR で検出された変異頻度は高い相関を認めた ($R^2=0.82$)。腫瘍組織のゲノムプロファイリングでは *TP53* 変異のみが再発と有意な関連を認めており ($p=0.0245$)、*KRAS* 変異と *CDKN2A* 変異を併せ持つ症例は再発しやすい傾向を認めた ($p=0.0971$)。LBx において TIA で検出された ctDNA すべてを対象とすると再発との関連を認めなかったが ($p=0.5283$)、TIA で一致した ctDNA のみを対象とした場合、ctDNA が検出された症例は、検出されなかった症例と比較して有意に再発が見られ ($p=0.0094$)、その中でも *KRAS* ctDNA が最も関連があることが示された ($p=0.0082$)。*KRAS* 以外の ctDNA は予後と関連を認めなかった ($p=0.4746$)。また、*KRAS* ctDNA と *TP53* ctDNA を併せ持つ症例はさらに予後不良であった ($p<0.0001$)。CA19-9 単独では再発しやすい傾向を示すのみであったが ($p=0.0618$)、TIA で一致した ctDNA を有しかつ CA19-9 高値の症例は有意に予後不良であった ($p=0.0213$)。

【考察】

本研究では膵臓癌における LBx の有用性を明らかにすべく、145 の膵臓癌切除症例を対象に、409 のがん関連遺伝子を対象とした遺伝子パネル、52 のがん関連遺伝子を対象とした遺伝子パネルの 2 つを用いたターゲットシーケンス、*KRAS* を対象とした ddPCR を行った。その結果 LBx 単独ではなく TIA を用いる方が変異の検出率向上と予後の予測に有用であることが示された。特に治療介入前のサンプルの方が TIA での変異検出率が有意に高くなっており、サンプル採取のタイミングが重要であると考えられた。また、*KRAS* ctDNA は、治療介入前の症例と比べ、治療介入後の症例の方が有意に検出率が低かった。このことから *KRAS* ctDNA が術前治療によって消失しており、ctDNA の評価は術前、術後の治療効果判定に有効であることが示唆された。また、LBx で検出された ctDNA すべてを対象とした場合予後と関連を認めなかった。これは検出された変異が、ctDNA だけではなく、血漿中の cfDNA を完全に除外できておらず ctDNA の選択性が低くなったためと考えられる。TIA で一致した ctDNA を対象としても *KRAS* を除いた場合は予後と関連を認めなかった。一方 *KRAS* は単独評価でも予後との関連を認め、さらに *TP53* ctDNA と併せ持つことでより予後予測の精度は向上した。しかし検査の簡便さ、感度、費用対効果を考えた際に NGS による評価ではなく ddPCR による *KRAS* 評価が良い可能性が考えられた。

腫瘍マーカーである CA19-9 が術前に基準値である 37 以上であった症例は 86 症例 (61.4%) であった。CA19-9 の上昇は再発しやすい傾向を示すにとどまっていた。基

準値をカットオフとすると CA19-9 が腫瘍自体によって上昇したものだけではなく、腫瘍による胆道狭窄や胆管炎などの非腫瘍原性の CA19-9 による上昇も含まれているためと考えられた。TIA による評価と CA19-9 の測定を組み合わせることで、再発リスクが高い症例を選別することができ、両者を組み合わせて評価するのが有用と考えられた。

【結論】

本研究では切除し得た膵臓癌症例の術前血漿サンプルを NGS 解析し、LBx の有用性を評価した。TIA を行うことで ctDNA 検出率を向上させることが可能であることが示されたが、検出された ctDNA すべてを対象とした場合、予後との有意な関連を認めず、TIA で一致した ctDNA、特に *KRAS* ctDNA が膵臓癌の予後と関連があることが示された。本研究の結果から LBx を用いることで、術前に膵臓癌症例の予後予測が可能であり、治療戦略決定に利用可能であることが示唆された。

略語集

CA19-9	carbohydrate antigen 19-9
CCP	comprehensive cancer panel
cfDNA	cell-free deoxyribonucleic acid
cfTNA	cell-free total nucleic acid
ctDNA	circulating tumor deoxyribonucleic acid
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
ddPCR	droplet digital polymerase chain reaction
ERCP	endoscopic retrograde cholangiopancreatography
EUS-FNA	endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
LBx	Liquid biopsy
MAF	mutation allele frequency
NAT	neoadjuvant therapy
NGS	next generation sequencing
NIPT	non-invasive prenatal testing
TIA	tumor informed approach

緒言

膵臓癌は非常に予後不良な癌とされ、本邦における 2023 年のがん統計予測では、罹患数が 45, 900 名、死亡数が 40, 400 名で部位別 4 位、5 年相対生存率も 8.5% となっている（癌情報サービス. In 国立がん研究センターがん情報サービス, https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/short_pred.html (2024 年 11 月 10 日参照)。膵臓癌は世界中で増加傾向にあり（癌情報サービス. In 国立がん研究センターがん情報サービス, https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/cancer/10_pancreas.html (2024 年 11 月 10 日参照), In United European Gastroenterology | UEG, <https://ueg.eu/files/771/b7ee6f5f9aa5cd17ca1aea43ce848496.pdf> (2022 年 7 月 1 日参照)、2030 年には米国のがん部位別死亡の 2 位になると予想されている (Rahib et al, 2014)。予後不良の理由として膵臓癌の初期は自覚症状に乏しく、診断時におよそ 80% の症例が根治切除不能な病期に進行していること (Gillen et al, 2010, Vincent et al, 2011)、切除症例でも術後 1 年以内の再発率が 51.2%、2 年以内の再発率が 79.5% と術後再発率が高いこと (Groot et al, 2018)、手術が唯一の根治的治療であり、化学療法や放射線療法の奏効率が低く術後に有効な治療法が少ないことが挙げられる

(Neoptolemos et al, 2018)。そのため、早期診断・再発の検出方法の探索、更なる治療法の開発が急務である。

膵臓癌の発癌は主に、*KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A* が関与していることが明らかとなっている (Hruban et al, 2000 ; Bardeesy and Ronald, 2002 ; Pietrasz et al, 2022)。特に、*KRAS* は約 90% で変異しており、*KRAS* の変異は主にコドン G12、GQ61 に集中している (Waters and Der, 2018 ; Pietrasz et al, 2022)。したがって、*KRAS* 変異は膵臓癌の重要なバイオマーカーとなる可能性がある。

腫瘍生検はがん診断のゴールドスタンダードであり、“Precision medicine”に必要な遺伝子変異プロファイリングにも有用であるが、侵襲が大きく繰り返し施行することは困難である。近年、低侵襲な検査であるリキッドバイオプシー (Liquid biopsy : LBx) の研究が盛んに行われている。LBx とは体液を用いた生検であり、尿や脊髄液、唾液や胸腹水、便なども用いられるが、最も研究が進んでいるのが血液を用いた LBx である (Corcoran and Chabner, 2018)。その他にもエクソソームやマイクロ RNA など様々な物質が LBx におけるバイオマーカーになる可能性が検討されている

(Yu W et al, 2019 ; Lin B et al, 2022)。世界で初めて LBx を診断用途で実用化したのは母体血中胎児 cell-free deoxyribonucleic acid (cfDNA) を用いた非侵襲的出生前遺伝学的検査 Non-Invasive Prenatal Testing (NIPT) とされ、2011 年に米国で行われた (Palomaki et al, 2011)。LBx のうち、血液中の cfDNA を用いたものは腫瘍生検の補助や代替法となる可能性があるとされる (Corcoran and Chabner, 2018)。

cfDNA は細胞がアポトーシスやネクローシスを起こした際に放出される

deoxyribonucleic acid (DNA) のことで、腫瘍細胞由来の cfDNA は、circulating tumor deoxyribonucleic acid (ctDNA) と呼ばれる (Corcoran and Chabner, 2018)。ctDNA の検出はがんのスクリーニング、微小残存病変の検出、治療モニタリング、薬剤耐性変異の評価などに臨床応用されている (Wan et al, 2017 ; Dasari et al, 2020)。また、ctDNA のメチル化も膵臓癌を含め様々な癌の特定、早期診断に有用とされている (Shen SY et al 2018 ; Bocanegra V et al 2023)。

ctDNA の検出率は様々な固形癌において病期の進行に伴い高くなることが示されており (Peng et al, 2018 ; Suzuki et al, 2020 ; Chin et al, 2020 ; Zhang et al, 2021)、膵臓癌でも同様に早期癌では検出率が低く、進行癌で高いとされる (Cohen et al, 2017 ; Del Re et al, 2017 ; Cheng et al, 2017 ; Mohen et al, 2019 ; Sugimori et al, 2020 ; Strijker et al, 2020 ; Guo et al, 2020 ; Zhang et al, 2021 ; Affoloter et al, 2021 ; Botrus et al, 2022)。また、膵臓癌では ctDNA の変異対立遺伝子頻度と転移巣を含めた腫瘍体積に相関があることが示されている (Strijker et al, 2020)。

膵臓癌の術前 ctDNA による予後解析では、*KRAS* ctDNA 検出が予後に関与するという報告が多いが (Hadano et al, 2016 ; Lee et al, 2019 ; Groot et al, 2019)、関与しないとする報告もある (Watanabe et al, 2019)。同様に術後 ctDNA による予後解析でも ddPCR による *KRAS* 変異を評価した報告が多い (Nakano et al, 2018 ; Kitahata et al, 2022)。前述のように膵臓癌の発癌には *KRAS* 以外の変異も関与しているため膵臓癌の予後に影響を与える ctDNA が *KRAS* 変異のみなのか評価が必要である。

膵臓癌のモニタリングは、主に超音波検査や CT 検査といった画像検査と、腫瘍マーカーによる評価が行われている。しかし、画像検査は画像で評価が可能であるほど腫瘍が増大した段階でしか評価できない。腫瘍マーカーでは CA19-9 が最も有用なバイオマーカーであり、術後 1 年以内に CA19-9 が正常化 (37U/mL 以下) した症例は高値の症例と比較し有意に全生存率が高いことが示されているが (Ballehaninna and Chamberlain, 2012)、良性膵疾患や胆汁うっ滞、他の癌による偽陽性や、約 10% の症例が Lewis 抗原陰性のため偽陰性となるといった問題点が挙げられる (Goggins, 2005 ; Robert et al, 2018 ; Pietrasz et al, 2022)。

本研究では次世代シーケンサー (next generation sequencing : NGS) を用いたターゲットシーケンス解析によって、*KRAS* 以外の ctDNA も含めた ctDNA 検出率を明らかにすることで、膵臓癌切除症例における LBx の臨床的有用性を評価した。また、ctDNA 検出率を向上させる方策として腫瘍のゲノムプロファイリングに基づいたアプローチ (Tumor informed approach : TIA) の検討を行った。また、TIA のために得られた腫瘍ゲノムプロファイリングと予後の関連も評価した。

実験方法

① 対象症例と検体収集

2019 年 6 月から 2020 年 12 月に北海道大学病院、札幌医科大学附属病院で手術を受けた膵臓癌患者 152 症例のうち、cfTNA 濃度不足、ライブラリ構築不良、病理学的評価で complete response となった 7 症例を除く 145 症例を対象とした。血漿サンプルの収集は術前化学療法前あるいは術前に行った。また、造血幹細胞由来の変異を除外するためにバフィーコート収集も行った。腫瘍のゲノムプロファイリングを行うため、全例切除検体のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded :FFPE) 標本の 5 μ m スライスのスライドを 10 枚収集した。

本研究は北海道大学 (18-053)、札幌医科大学 (302-240)、財団法人がん研究会 (2018-1016、2020-1150) の倫理審査委員会の承認を得て行った。対象患者すべてに十分な説明を行い、書面による同意を得た。

② 血液サンプルからの血漿の抽出

患者から 14ml の血液を EDTA 処理された採血管に採取し、採取後 2 時間以内に 4°C、3,000rpm、15 分の条件で遠心し、血漿と血球をそれぞれ新しいチューブに移し、cfTNA、genomic DNA (gDNA) 抽出まで -80°C で保存した。一部サンプルは BML 社に委託し cfTNA、gDNA の抽出から次世代シーケンサーでのシーケンス解析まで行った。以下、当研究室での方法を説明する。

③ cfTNA の抽出

cfTNA の抽出は MagMAX Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation kit (Applied Biosystems™, Waltham, USA) を用いて行った。保存していた血漿を 1.5mL のチューブに移し、4°C、16,000g、10 分遠心してデブリを沈殿させて得られた血漿を cfTNA 抽出に用いた。

3-1 Proteinase K 処理

遠心して得られた血漿を 50mL チューブに移し、下記の表を参照に MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Proteinase K (Applied Biosystems™, Waltham, USA)、MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Lysis/Binding Solution (Applied Biosystems™, Waltham, USA) を加え、全体が均一になるように攪拌し、65°C、1,000rpm、30 分の条件で、振盪培養機でインキュベートした。終了後 50mL チューブを氷で 5 分間冷却した。

表 1 proteinase K 処理に必要な試薬と量

血漿量	2mL	3mL	4mL	5mL	6mL
MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Proteinase K (20 mg/mL)	30 μ L	45 μ L	60 μ L	75 μ L	90 μ L
MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Lysis/Binding Solution	1mL	1.5mL	2mL	2.5mL	3.0mL

3-2 ビーズと cfTNA の結合処理

下記表 2 を参照し、MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Lysis/Binding Solution, MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Magnetic Beads (Applied Biosystems™, Waltham, USA) を加え、卓上振盪機で 1,000rpm、10 分振盪した。終了後、DynaMag-50 Magnet (Invitrogen, Waltham, USA) に固定し、5 分静置し、上清を廃棄した。

表 2 ビーズと cfTNA の結合に必要な試薬と量

血漿量	2mL	3mL	4mL	5mL	6mL
MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Lysis/Binding Solution	1.5mL	2.25mL	3mL	3.75mL	4.5mL
MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Magnetic Beads	60 μ L	90 μ L	120 μ L	150 μ L	180 μ L

3-3 ビーズの洗浄

50mL チューブを DynaMag-50 Magnet から取り外し、1mL の MagMAX™ Total Nucleic Acid Wash Solution (Applied Biosystems™, Waltham, USA) でビーズを懸濁後、新しい 1.5mL チューブに移した。1.5mL チューブを DynaMag-2 Magnet (Invitrogen, Waltham, USA) (以下マグネットスタンド) に固定し 20 秒間待ち、上清で 50mL チューブを洗浄して残っていたビーズを回収、1.5mL に移して 2 分静置した。上清を除去し、1mL の 80%エタノールを加えて攪拌してビーズを均一にし、卓上遠心機で遠心後にマグネットスタンドに固定して 2 分静置した。この作業を 2 回繰り返した。

3-4 溶出

ビーズを吸わないように注意して上清を完全に除去し、5 分間ビーズを乾燥させた。400 μ L の MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Elution Solution (Applied Biosystems™, Waltham, USA) を加えて攪拌してビーズを均一にし、卓上振盪機で 5 分間振盪後にマグネットスタンドに固定して 2 分静置した。上清を新しい 1.5mL チ

ューブに移した。

④ cfTNA の濃縮

4-1 ビーズと cfTNA の結合処理

溶出して得た上清に 500 μ L の MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Lysis/Binding Solution と 10 μ L の MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Magnetic Beads を加えて卓上振盪機で 1,000rpm、5 分振盪した。卓上遠心機で遠心した後、マグネットスタンドに固定して 5 分静置して上清を除去した。

4-2 ビーズの洗浄

ビーズを吸わないように注意して上清を除去し、1mL の MagMAX™ Total Nucleic Acid Wash Solution でビーズを懸濁し、攪拌した後卓上遠心機で遠心した。その後マグネットスタンドに固定して 2 分静置した。上清を除去し、1mL の 80%エタノールを加えてボルテックスミキサーで攪拌し、ビーズを均一にした。卓上遠心機で遠心後、マグネットスタンドに固定して 2 分間静置した。この作業を 2 回繰り返した。

4-3 溶出

上清を完全に除去し、5 分間ビーズを乾燥させた。15 μ L の MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Elution Solution を加えて攪拌してビーズを均一にし、卓上振盪機で 5 分間振盪した。卓上遠心機で遠心後、マグネットスタンドに固定して 2 分静置した。13-15 μ L の上清を新しい 1.5mL チューブに移し、cfTNA の抽出を終了した。

⑤ 抽出した cfTNA の品質評価

抽出した cfTNA の品質評価は Qubit DNA dsHS Assay kit (Life technologies, Carlsbad, USA) を用いた Qubit Fluorometer (Life technologies, Carlsbad, USA) による評価と High sensitivity D5000 ScreenTape (Agilent, Santa Clara, USA) を用いた Tape station system (Agilent, Santa Clara, USA) による評価を行った。

5-1 Qubit dsDNA HS Assay kit での評価

検量線を引くための 2 つの Standard サンプルも含め、評価予定サンプル数より 3 サンプル多く試薬を調整した。Qubit dsDNA HS Reagent を Qubit dsDNA HS Buffer で 200 倍に希釈してよく攪拌した。

Qubit assay tube を用いて、調整した試薬 199 μ L とサンプル 1 μ L で 200 倍に希釈した。Standard は調整した試薬 190 μ L と Standard サンプル 10 μ L で 20 倍に希釈した。希釈したサンプル・Standard は攪拌後卓上遠心機で遠心して 2 分間静置後に Qubit Fluorometer で測定した。

5-2 High sensitivity D5000 ScreenTape による評価

Qubit Fluorometer で得られた cfTNA 濃度を基に、サンプルを $1\text{ng}/\mu\text{L}$ 程度に Nuclease free water で希釈した。PCR 用 8 連チューブのすべてのチューブに High sensitivity D5000 Buffer を $2\mu\text{L}$ ずつ分注し、はじめのチューブに High sensitivity D5000 Ladder を $1\mu\text{L}$ 、Nuclease free water を $1\mu\text{L}$ 加え、サンプルは $1\text{ng}/\mu\text{L}$ 程度に希釈していた場合は $2\mu\text{L}$ 、希釈していない場合はサンプルを $1\mu\text{L}$ 、Nuclease free water を $1\mu\text{L}$ 加えて攪拌し、卓上遠心機で遠心して 1 分間静置後 Tape station System を用いて測定した。

⑥ バフィーコートからの gDNA の抽出

バフィーコートからの gDNA の抽出は FlexiGene DNA kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行った。

6-1 gDNA の析出

使用する試薬量は下記表 3 を参考にした。各サンプルの血液量に応じて Buffer FG1 を加え、5 回転倒混和し、室温、 $10,000g$ 、20 秒遠心して上清を除去した。Buffer FG2 と QIAGEN Protease を加えて、沈殿が溶けるまで攪拌した。卓上遠心機で遠心し、 65°C のヒートブロックに 5 分間静置後、100% イソプロパノールを加えて DNA が析出するまで転倒混和した。析出されない場合は 100% イソプロパノールを DNA が析出するまで加えた。

表 3 血液からの gDNA 抽出に使用する試薬と量

血液量	$100\mu\text{L}$	$200\mu\text{L}$	$300\mu\text{L}$	$400\mu\text{L}$	$500\mu\text{L}$
Buffer FG1	$250\mu\text{L}$	$500\mu\text{L}$	$750\mu\text{L}$	$1,000\mu\text{L}$	$1,250\mu\text{L}$
Buffer FG2	$50\mu\text{L}$	$100\mu\text{L}$	$150\mu\text{L}$	$200\mu\text{L}$	$250\mu\text{L}$
QIAGEN Protease	$0.5\mu\text{L}$	$1.0\mu\text{L}$	$1.5\mu\text{L}$	$2.0\mu\text{L}$	$2.5\mu\text{L}$
100% イソプロパノール	$50\mu\text{L}$	$100\mu\text{L}$	$150\mu\text{L}$	$200\mu\text{L}$	$250\mu\text{L}$
70% エタノール	$50\mu\text{L}$	$100\mu\text{L}$	$150\mu\text{L}$	$200\mu\text{L}$	$250\mu\text{L}$
Buffer FG3	$100\mu\text{L}$	$200\mu\text{L}$	$200\mu\text{L}$	$200\mu\text{L}$	$200\mu\text{L}$

6-2 gDNA の溶出

70% エタノールを加えて攪拌し、室温、 $10,000g$ 、3 分遠心した。上清を除去し、Buffer FG3 を加えて攪拌後、 65°C のヒートブロックに 1 時間静置し DNA を溶出させた。

⑦ 抽出した gDNA の品質評価

抽出した cfTNA の品質評価は Qubit DNA BR Assay kit (Life technologies, Carlsbad, USA) を用いた Qubit Fluorometer (Life technologies, Carlsbad, USA) による評価と Genomic DNA ScreenTape (Agilent, Santa Clara, USA) を用いた Tape station system による評価を行った。

7-1 Qubit dsDNA BR Assay kit での評価

検量線を引くための 2 つの Standard サンプルも含め、評価予定サンプル数より 3 サンプル多く調整することとした。Qubit dsDNA BR Reagent を Qubit dsDNA BR Buffer で 200 倍に希釈してよく攪拌した。これ以降 Qubit dsDNA HS Assay kit と同様の方法で Qubit Fluorometer で測定した。

7-2 Genomic DNA ScreenTape による評価

Qubit Fluorometer で得られた gDNA 濃度を基に、サンプルを 50ng/ μ L 程度に蒸留水で希釈した。PCR 用の 8 連チューブのすべてのチューブに Genomic DNA Buffer を 10 μ L ずつ分注し、はじめのチューブに Genomic DNA Ladder を 1 μ L 加え、サンプルは 1 μ L 加えてよく攪拌して卓上遠心機で遠心して 1 分間静置し、静置後 Tape station System を用いて測定した。

⑧ 腫瘍組織からの gDNA の抽出

8-1 FFPE のマクロダイセクション

腫瘍組織は病理医によって HE 染色標本の腫瘍部分にマーキングが施されており、そのマーキングを基に未染色標本 10 枚のマクロダイセクションを行った。145 例全てで腫瘍部分の収集を行い、血液の gDNA を収集できなかった 8 症例は隣正常組織部分の収集も行った。FFPE は 1.5ml のチューブに収集した。gDNA の抽出は GeneRead DNA FFPE (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行った。

8-2 gDNA の抽出

160 μ l の脱パラフィン液を加えて 10 秒間攪拌して遠心した。56°C で 3 分間インキュベートした後、室温で冷却した。

55 μ l の RNase-free water、25 μ l の Buffer FTB、20 μ l の Proteinase K を加えてサンプルを攪拌して遠心した。

56°C で 1 時間インキュベートし、その後 90°C で 1 時間インキュベートした。チューブを遠心した後、下層の透明な沈殿を新しい 1.5ml チューブに移し、115 μ l の RNase-free water を加えた。

サンプルに 35 μ l の UNG を加えて攪拌し、50°C で 1 時間インキュベートした。

QIAamp MinElute カラム (QIAGEN, Hilden, Germany) を 1.5ml チューブに入れ、カラムの蓋をあけて、20~40 μ l の Buffer ATE をメンブレン中央に塗布した。RNase A を 2 μ l 加え、室温で 2 分間インキュベートした。

250 μ l の Buffer AL をサンプルに加えて攪拌後、250 μ l エタノール (96-100%) を加え、攪拌した。

700 μ l の溶解液を QIAamp MinElute カラムの縁を濡らさないように移し、16,000g、室温で 1 分間遠心した。遠心後、溶解液がメンブレンを完全に通過していない場合、カラムが空になるまで遠心した。

500 μ l の Buffer AW1 をカラムに添加し、16,000g、室温で 1 分間遠心した。続いて 500 μ l の Buffer AW2 をカラムに添加し、同様の条件で遠心した。250 μ l のエタノール (96-100%) をカラムに添加し、同様の条件で遠心した。カラムを新しい 1.5ml チューブに入れ、同様の条件で遠心した。

⑨ 抽出した gDNA の品質評価

7-1、7-2 と同様に品質評価を行った。

⑩ cfTNA のライブラリ構築

抽出した cfTNA は Oncomine Pan-cancer cell-free assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いてシーケンスのライブラリを構築した。

10-1cfTNA の逆転写

各サンプルと試薬を PCR 用 8 連チューブに以下の表 4 のように加え、チューブに蓋をして攪拌し以下の表 5 の条件でサーマルサイクラーにかけた。終了後サンプルを卓上遠心機で遠心した。

表 4 逆転写に用いる試薬とサンプルの量

Component	Volume
SuperScript VILO Master Mix	2.6 μ L
各サンプル (20ng まで)	$\leq$ 10.4 μ L
Nuclease free water	To 13 μ L
計	13 μ L

表 5 逆転写を行うサーマルサイクラーの条件

Temperature	Time
42°C	30min
85°C	5min
10°C	Indefinite

10-2 ターゲットの増幅

10-1 で使用した PCR 用 8 連チューブの蓋を外し、以下の表 6 の試薬を加えた。サンプルを攪拌し以下の表 7 の条件でサーマルサイクラーにかけた。サーマルサイクラーは 90°C でプレヒートしておいた。終了後サンプルを卓上遠心機で遠心した。

表 6 ターゲットの増幅に用いる試薬とサンプルの量

Component	Volume
Cell-free total nucleic acid reverse transcription products	13 μ L
Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Panel	2 μ L
cfDNA Library PCR Master Mix	15 μ L
計	30 μ L

表 7 ターゲットの増幅を行うサーマルサイクラーの条件

Stage	Temperature	Time
Hold	98°C	1min
2 cycles	98°C	15sec
	64°C	2min
	62°C	2min
	60°C	4min
	58°C	2min
	72°C	30sec
Hold	72°C	2min
Hold	4°C	Up to 1 hour

10-3 ターゲットアンプリコンの精製

PCR 用 8 連チューブを遠心後、PCR 用 8 連チューブ用のマグネットスタンドに置き、100 μ L ピペットを用いて各チューブの反応容量を測定し、反応液量が <30 μ L の場合は Nuclease-free water を加えて各ウェルの容量を 30 μ L にした。

各チューブに 45 μ L の Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (Thermo Fisher Scientific, America) (以下磁気ビーズ) を加え、新しい蓋をした。攪拌後、室温で 5 分間インキュベートした。

インキュベート後再度攪拌して 5 分間インキュベートして卓上遠心機で遠心した。PCR 用 8 連チューブをマグネットスタンドに置き、5 分間または溶液が透明になるまでインキュベートした後上清を除去し、150 μ L の 80%エタノールで磁気ビーズを洗浄した。

室温で溶液が透明になるまで 30 秒間インキュベートした後、上清を除去した。再度 150 μ L の 80%エタノールで磁気ビーズを洗浄し、室温で溶液が透明になるまで 30 秒間インキュベートした後、上清を除去した。

PCR 用 8 連チューブをマグネットスタンドに置いたまま、10 μ L 用ピペットで残ったエタノールを取り除き、室温で 5 分間磁気ビーズを風乾した。

各チューブに 24 μ L の Low TE buffer を加えて蓋をして攪拌し、室温で 5 分間インキュベートした。

PCR 用 8 連チューブを卓上遠心機で遠心し、マグネットスタンドに移し少なくとも 2 分間インキュベートした後、上清のうち 23 μ L を新しい PCR 用 8 連チューブに移した。

10-4 バーコード化されたプライマーを用いたターゲットアンプリコンの増幅

シーケンスの際に各サンプルを識別するバーコードを付与してターゲットアンプリコンを増幅させるため、各チューブに表 8 のように試薬を加えた。サンプルを攪拌し以下の表 9 の条件でサーマルサイクラーにかけた。サーマルサイクラーは 90°C でプレヒートしておく。

表 8 ターゲットの増幅に用いる試薬とサンプルの量

Component	Volume
DNA from the previous procedure	23 μ L
Tag Sequencing BC (#1–48)	1 μ L
cfDNA Library Primer P1	1 μ L
cfDNA Library PCR Master Mix	25 μ L
計	50 μ L

表9 ターゲットの増幅を行うサーマルサイクラーの条件

Stage	Temperature	Time
Hold	98°C	1min
18 cycles	98°C	15sec
	64°C	15sec
	72°C	15sec
Hold	72°C	5min
Hold	4°C	Indefinite

10-5 バーコード化されたライブラリの精製

PCR 用 8 連チューブを短時間遠心後、PCR 用 8 連チューブ用のマグネットスタンドに置き、100 μ L ピペットを用いて各チューブの反応容量を測定し、反応液量が <50 μ L の場合は Nuclease-free water を加えて各ウェルの容量を 50 μ L にした。

各チューブに 57.5 μ L の磁気ビーズを加え、新しい蓋をしてよく攪拌し、室温で 5 分間インキュベートした。

インキュベート後再度攪拌し 5 分間インキュベートして卓上遠心機で遠心した。PCR 用 8 連チューブをマグネットスタンドに置き、5 分間または溶液が透明になるまでインキュベートし、上清を除去した。150 μ L の 80%エタノールで磁気ビーズを洗浄した。

室温で溶液が透明になるまで 30 秒間インキュベートした後、上清を除去した。再度 150 μ L の 80%エタノールで磁気ビーズを洗浄し、室温で溶液が透明になるまで 30 秒間インキュベートした後、上清を除去した。

PCR 用 8 連チューブをマグネットスタンドに置いたまま、10 μ L 用ピペットで残ったエタノールを取り除き、室温で 5 分間磁気ビーズを風乾した。

各チューブに 50 μ L の Low TE buffer を加えてよく攪拌し、室温で 5 分間インキュベートした。

PCR 用 8 連チューブを卓上遠心機で遠心しマグネットスタンドに移し少なくとも 2 分間インキュベートした後、上清 50 μ L 全量を新しい PCR 用 8 連チューブに移した。

10-6 バーコード化されたライブラリのサイズセレクト

PCR 用 8 連チューブを短時間遠心し、マグネットスタンドに置いて蓋を外した。

各チューブに 50 μ L の磁気ビーズを加え、新しい蓋をして攪拌し、室温で 5 分間インキュベートした。

PCR 用 8 連チューブをマグネットスタンドに置き、5 分間または溶液が透明になる

までインキュベートし、上清を除去した。150 μ L の 80%エタノールで磁気ビーズを洗浄した。

室温で溶液が透明になるまで 30 秒間インキュベートした後、上清を除去した。

再度 150 μ L の 80%エタノールで磁気ビーズを洗浄し、室温で溶液が透明になるまで 30 秒間インキュベートした後、上清を除去した。

PCR 用 8 連チューブをマグネットスタンドに置いたまま、10 μ L 用ピペットで残ったエタノールを取り除き、室温で 5 分間磁気ビーズを風乾した。

各チューブに 30 μ L の Low TE buffer を加えて蓋をしてよく攪拌させ、室温で 5 分間インキュベートした。

PCR 用 8 連チューブを卓上遠心機で遠心してマグネットスタンドに移し少なくとも 2 分間インキュベートした後、上清の内 28 μ L をそれぞれ 200 μ L の保存用チューブに移した。

10-7 精製したライブラリの品質評価

High sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent, Santa Clara, USA) による評価を行った。

PCR 用 8 連チューブのすべてのチューブに High sensitivity D1000 Buffer を 2 μ L ずつ分注し、はじめのチューブに High sensitivity D1000 Ladder を 1 μ L、Nuclease free water を 1 μ L 加え、その他のチューブに各サンプルを 2 μ L 加えて攪拌し、卓上遠心機で遠心後 1 分間静置した後、Tape station System を用いて測定した。

⑪ 腫瘍組織のライブラリ構築

腫瘍組織のライブラリは Ion Ampliseq Comprehensive Cancer Panel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて作成した。

11-1 標的 DNA の増幅

サンプルと試薬を 1.5ml チューブに表 10 のように加えてよく攪拌した。

PCR 用 8 連チューブを 4 つ用意してサンプルを 5 μ L ずつ分注した。各チューブに 1 種類のプライマーを 5 μ L ずつ分注した。以下の表 11 の条件でサーマルサイクラーにかけた。

表 10 DNA 増幅に用いる試薬とサンプルの量

Component	Volume
Ion Ampliseq Hifi Mix	9.0 μ L
各サンプル (40ng まで)	$\leq 13.5 \mu$ L
Nuclease free water	To 22.5 μ L
計	22.5 μ L

表 11 DNA の増幅を行うサーマルサイクラーの条件

Stage	Temperature	Time
Hold	99°C	2min
16 cycles	99°C	15sec
	60°C	8sec
Hold	10°C	Up to 2.5hour

11-2 アンプリコンの部分消化

4 つの PCR 用 8 連チューブをよく攪拌して卓上遠心機で遠心した。
 4 つのチューブの各サンプルを 1 つのチューブに集約して、各サンプルに FuPa Reagent を 4 μ L ずつ加えて攪拌し卓上遠心機で遠心した。表 12 の条件でサーマルサイクラーにかけた。

表 12 アンプリコンの部分消化のためのサーマルサイクラーの条件

Temperature	Time
50°C	10min
55°C	10min
60°C	20min
10°C	Up to 1.0hour

11-3 アダプターの結合

PCR 用 8 連チューブをよく攪拌して卓上遠心機で遠心し、表 13 のように各サンプルに試薬を加えた。表 14 の条件でサーマルサイクラーにかけた。

表 13 アダプターの結合に用いる試薬とサンプルの量

Component	Volume
Switch solution	8.0 μ L
Xpress barcode adapter mix	4.0 μ L
DNA ligase	4.0 μ L
各サンプル	44 μ L
計	60 μ L

表 14 アダプターの結合のためのサーマルサイクラーの条件

Temperature	Time
22°C	30min
68°C	5min
72°C	5min
10°C	Up to 24hour

11-4 バーコード化されたライブラリの精製

PCR 用 8 連チューブをよく攪拌して卓上遠心機で遠心した後、90 μ L の磁気ビーズを加えて 100 μ L 用のピペットでよく攪拌し、室温で 5 分間インキュベートした。

インキュベート後マグネットスタンドに置き、さらに 5 分間インキュベートした後上清を除去した。150 μ L の 70%エタノールを加えて磁気ビーズを洗浄し、上清を除去した。再度 150 μ L の 70%エタノールで磁気ビーズを洗浄した。

マグネットスタンドに置いたまま上清を除去し、10 μ L 用ピペットで残ったエタノールを取り除き、室温で 5 分間磁気ビーズを風乾した。

マグネットスタンドから外して各チューブに 30 μ L の Low TE buffer を加えた。20 μ L 用のピペットで磁気ビーズを攪拌させ、マグネットスタンドに置き室温で 5 分間インキュベートした。磁気ビーズを吸わないように注意して 28 μ L を保存用チューブに移した。

11-5 精製したライブラリの品質評価

10-7 と同様に行った。

⑫ qPCR によるライブラリの定量

Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を使用して、qPCR により各ライブラリの濃度を測定した。

68 pM の大腸菌 DH10B Ion Control Library をコントロールとして使用した。コン

コントロールを 10 倍ずつ希釈していき、6.8 pM、0.68 pM、0.068 pM、0.0068 pM、0.00068 pM とした。

各サンプルライブラリを以下のように希釈した。2 μ L のライブラリを 198 μ L の Nuclease-free water で 100 倍希釈し攪拌後、卓上遠心機で遠心した。100 倍希釈したライブラリ 3 μ L を 27 μ L の Nuclease-free water で 1000 倍に希釈して攪拌後、卓上遠心機で遠心した。各サンプルライブラリ、コントロール、No Template Control を 96 ウェルプレートに以下の表 15 のように加え、表 16 のように QuantStudio5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて PCR を行った。

表 15 qPCR によるライブラリ定量に用いる試薬の量

Component	Volume
2X TaqMan™ Master Mix	10 μ L
20X Ion TaqMan™ Assay	1 μ L
1:1000 dilution of the sample	9 μ L
計	20 μ L

表 16 PCR のプロトコル

Stage	Temperature	Time
Hold	50°C	2min
Hold	95°C	20sec
40Cycles	95°C	1sec
	60°C	20sec

PCR で得られたライブラリの濃度を確認し、それぞれ 100pM に希釈した。各サンプルを 200 μ L のチューブに 5 μ L ずつ加えて攪拌して、卓上遠心機で遠心した。同様の手順で qPCR による定量を行った。

⑬ NGS によるシーケンス

12 で定量したサンプルのライブラリから Ion Chef (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) で Ion Chef 540 kit あるいは 550 kit (いずれも Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いてテンプレートを作成し、Ion GeneStudio S5 Prime System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) でシーケンスした。

⑭ 解析

解析は Torrent Suite Software v5.16 と Ion Reporter v5.16 および v5.18 を用いて行った。解析に使用したワークフローは、CH 関連変異を評価するため、cfDNA および バフィーコートには Oncomine TagSeq Pan-Cancer Liquid Biopsy w2.5 を、腫瘍の gDNA には AmpliSeq CCP w1.2 Tumor-Normal pair をデフォルトパラメータで使用した。ctDNA のバリエーションコールのカットオフは 0.065% で、変異アレル数は 2 コピー以上とした。TIA による評価は各患者の腫瘍組織から得られたゲノムプロファイルとその患者の LBx の変異とを一对一对で評価して ctDNA を検出する手法であり、TIA によって腫瘍の変異と一致した変異は、変異アレル数が 1 コピーでも ctDNA と定義した。腫瘍の gDNA から検出された変異のうちカバレッジが 80x 未満の変異は除外した。また、MAF が 5% 以上の変異は、正常組織から検出された一塩基多型を除外した後に陽性と評価された。バフィーコートで検出され、cfDNA で一致して検出された変異は CH 関連変異として評価した。術前化学療法症例が多いため、膵臓癌で頻繁に変異することが知られている 4 遺伝子 (*KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*) の変異が検出された場合は、MAF に関係なく 2 コピー以上を陽性と定義した。

⑮ ddPCR

腫瘍中の *KRAS* 変異の有無を評価するため、ddPCR *KRAS* G12/13 スクリーニングキット (Bio-Rad, Hercules, USA) と QX200 ddPCR システム (Bio-Rad, Hercules, USA) を用いて ddPCR を行った。

表 17 のようにサンプルを調整し、QX200 Droplet Generator (Bio-Rad, Hercules, USA) 用のカートリッジの中段にサンプルを添加した。

表 17 ddPCR の試薬量

Component	Volume
2x ddPCR Supermix for probe (no dUTP)	10 μ L
20x multiplex primers/probes (FAM+HEX)	1 μ L
gDNA sample+ Nuclease free water	9 μ L
計	20 μ L

Droplet Generation Oil 70 μ L をカートリッジの下段に添加し、ガasketを装着して QX200 Droplet Generator にカートリッジをおいてドロップレットを作成した。

カートリッジの上段のウェルに作成されたドロップレットを PCR プレートに移してヒートシールを行った。ヒートシール後に表 18 のプロトコルで PCR を行い QX200 Droplet Reader (Bio-Rad, Hercules, USA) で解析を行った。

表 18 ddPCR のプロトコル

Cycles	Temperature	Time	Ramp Rate
1	95°C	10min	~2°C/sec
40	94°C	30sec	
	55°C	1min	
1	98°C	10min	
Hold	4°C	Infinite	~1°C/sec

変異が検出されなかった症例については、さらに ddPCR *KRAS*Q61 multi screening kit (Bio-Rad, America) を用いて、同じプロトコルで ddPCR を行った。2 回の ddPCR で変異が検出されなかった症例を *KRAS*wild と定義した。NGS で Q61 変異が検出された症例は、ddPCR *KRAS*G12/13 スクリーニングキットの結果にかかわらず、ddPCR *KRAS*Q61 マルチスクリーニングキットで評価した。すべての症例において、10 ng の gDNA を用いて ddPCR を行った。陽性症例は陽性滴数が 2 滴以上、MAF が 0.1%以上と定義した。

⑯ 統計解析

すべての統計解析は JMP Pro version 17.0 を用いて行った。Fisher の正確検定を用いて病理学的情報と ctDNA 検出の有無、LBx のみと TIA での ctDNA の検出を比較した。生存曲線は Kaplan-Meier 法で分析し、ログ・ランク検定を用いて検討した。すべての解析は $p < 0.05$ を統計学的有意差があると判断した。

実験結果

① 145 症例の臨床病理学的特徴

145 症例の臨床病理学的特徴を表 19 にまとめた。145 症例のうち、71 症例（neo adjuvant therapy : NAT 開始前：38 症例、手術先行：33 症例）が治療介入前にサンプルが採取され、74 症例が NAT 後に採取された。評価期間中（範囲：1-36 ヶ月）に臨床的に再発と診断された患者は 145 人中 62 症例（42.8%）であった。NAT を受けた 112 症例のうち 59 症例（52.7%）が resectable、38 症例（33.9%）が borderline resectable、15 症例（13.3%）が unresectable に分類された。手術先行症例は、全症例が resectable であった。

表 19 145 例の臨床病理学的特徴

Characteristics	No. of patients (%)
Sex	
Male	75 (51.7%)
Female	70 (48.3%)
Age	
Median (range)	71 (50-86)
Neoadjuvant therapy	
Yes	112 (77.2%)
No	33 (22.8%)
Preoperative CA19-9 (U/mL) (N=140)	
<37	54 (38.6%)
≥37	86 (61.4%)
Tumor location	
Head	99 (68.3%)
Body	36 (24.8%)
Tale	10 (6.9%)
Resectability	
Resectable	92 (63.4%)
Borderline resectable	38 (26.2%)
Unresectable	15 (10.3%)

UICC pT Stage	
Tis	7 (4.9%)
T1	48 (33.1%)
T2	64 (44.1%)
T3	26 (17.9%)
Lymph node metastasis	
Negative	73 (50.3%)
Positive	72 (49.7%)
Metastasis	
Negative	135 (93.1%)
Positive	10 (6.9%)
UICC Stage	
0	7 (4.9%)
I	54 (37.2%)
II	58 (40.0%)
III	16 (11.0%)
IV	10 (6.9%)
Recurrence	
Yes	62 (42.8%)
No	83 (57.2%)

② 腫瘍組織のゲノムプロファイリング

145 症例中 6 症例が NGS による変異検出のカットオフ値を満たさなかった。本検討で得られた変異頻度が高い上位 10 遺伝子のオンコプロットを図 1 に示す。上位 4 遺伝子は膵臓癌において高頻度に変異することが知られている *KRAS* (112/145、77.2%)、*TP53* (76/145、52.4%)、*SMAD4* (25/145、17.2%)、*CDKN2A* (12/145、8.3%) であった。

KRAS は ddPCR でも評価した (表 20)。145 症例中 128 症例 (88.2%) が *KRAS*G12/13 変異を有していた。*KRAS*G12/13 変異が陰性であった 17 症例のうち 5 症例で *KRAS*Q61 変異を認めたため、ddPCR では 145 症例中 133 症例 (91.7%) で *KRAS* 変異が検出された。

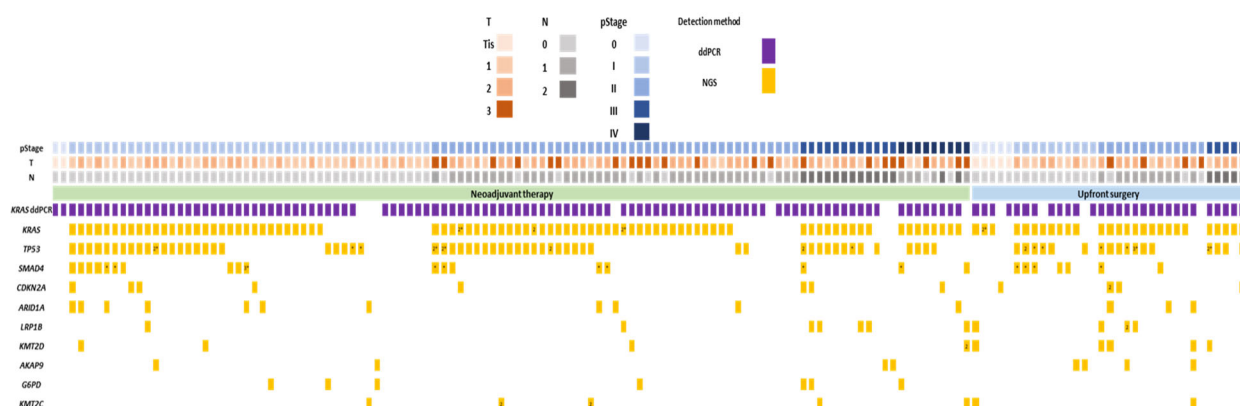


図1 145症例の変異頻度上位10遺伝子のオンコプロット
NGSで検出された変異をオレンジで、ddPCRで検出された *KRAS* を紫で示している。

表20 ddPCRでの *KRAS* 検出

Parient	Type of <i>KRAS</i> screening Kit	Droplets	Positive droplets	Negative droplets	MAF (%)	<i>KRAS</i> status
H001	G12/13	8,472	274	1,260	17.86%	positive
H002	G12/13	8,793	100	1,855	5.12%	positive
H003	G12/13	12,358	25	1,118	2.19%	positive
H004	G12/13	9,246	557	2,361	19.09%	positive
H006	G12/13	8,497	221	2,128	9.41%	positive
H007	G12/13	9,982	506	2,127	19.22%	positive
H008	G12/13	9,910	133	1,365	8.88%	positive
H010	G12/13	9,110	89	894	9.05%	positive
H012	G12/13	11,141	95	2,238	4.07%	positive
H017	G12/13	11,174	1	1,624	0.06%	negative
	Q61	8,561	84	1,196	6.56%	positive
H018	G12/13	10,215	50	1,523	3.18%	positive
H020	G12/13	11,397	27	2,221	1.20%	positive
H021	G12/13	9,275	150	757	16.54%	positive
H023	G12/13	10,752	30	1,505	1.95%	positive
H024	G12/13	12,051	1	1,853	0.05%	negative
	Q61	10,219	145	1,798	7.46%	positive

H025	G12/13	13,045	363	2,414	13.07%	positive
H026	G12/13	9,916	2	2,296	0.09%	negative
	Q61	9,537	0	2,395	0.00%	negative
H030	G12/13	10,186	34	1,985	1.68%	positive
H032	G12/13	10,692	82	1,880	4.18%	positive
H033	G12/13	8,332	714	2,732	20.72%	positive
H034	G12/13	10,433	42	1,711	2.40%	positive
H035	G12/13	12,184	37	1,344	2.68%	positive
H036	G12/13	11,708	457	1,449	23.98%	positive
H037	G12/13	11,356	187	2,941	5.98%	positive
H041	G12/13	8,920	409	1,845	18.15%	positive
H045	G12/13	12,245	182	3,927	4.43%	positive
H047	G12/13	7,943	175	962	15.39%	positive
H049	G12/13	8,740	72	1,223	5.56%	positive
H051	G12/13	9,375	79	1,398	5.35%	positive
H054	G12/13	8,562	57	1,408	3.89%	positive
H059	G12/13	8,281	30	974	2.99%	positive
H061	G12/13	8,305	69	796	7.98%	positive
H066	G12/13	8,307	0	1,101	0.00%	negative
	Q61	10,047	0	1,989	0.00%	negative
H067	G12/13	8,610	67	1,297	4.91%	positive
H070	G12/13	6,784	1	1,883	0.05%	negative
	Q61	9,245	1	2,569	0.04%	negative
H071	G12/13	6,738	48	922	4.95%	positive
H075	G12/13	9,550	558	3,150	15.05%	positive
H076	G12/13	8,320	84	1,069	7.29%	positive
H077	G12/13	9,125	215	1,053	16.96%	positive
H078	G12/13	8,647	263	1,780	12.87%	positive
H080	G12/13	12,085	82	2,490	3.19%	positive
H081	G12/13	10,736	85	1,310	6.09%	positive
H084	G12/13	12,294	1	3,766	0.03%	negative
	Q61	9,677	0	3,856	0.00%	negative
H086	G12/13	9,128	0	942	0.00%	negative
	Q61	11,055	29	1,143	2.47%	positive
H087	G12/13	11,015	3	1,734	0.17%	positive

H089	G12/13	9,075	1	1,029	0.10%	negative
	Q61	9,819	118	1,033	10.25%	positive
H091	G12/13	9,471	246	873	21.98%	positive
H092	G12/13	9,145	244	1,426	14.61%	positive
H094	G12/13	9,500	678	2,221	23.39%	positive
H095	G12/13	12,800	7	1,810	0.39%	positive
H100	G12/13	9,273	46	1,543	2.89%	positive
H102	G12/13	10,441	70	1,243	5.33%	positive
H104	G12/13	9,027	115	2,273	4.82%	positive
H105	G12/13	6,165	99	1,678	5.57%	positive
H106	G12/13	6,321	110	1,120	8.94%	positive
H108	G12/13	10,098	321	1,958	14.09%	positive
H113	G12/13	10,187	2	2,201	0.09%	negative
	Q61	10,469	0	2,383	0.00%	negative
H116	G12/13	7,282	45	737	5.75%	positive
H117	G12/13	6,653	106	956	9.98%	positive
H118	G12/13	8,690	147	1,403	9.48%	positive
H119	G12/13	7,836	102	1,393	6.82%	positive
H123	G12/13	9,225	709	2,351	23.17%	positive
H124	G12/13	7,924	116	2,301	4.80%	positive
H126	G12/13	7,651	90	1,128	7.39%	positive
H127	G12/13	8,894	260	1,359	16.06%	positive
H128	G12/13	10,587	10	2,222	0.45%	positive
H130	G12/13	6,994	64	634	9.17%	positive
H134	G12/13	7,676	1	704	0.14%	negative
	Q61	10,616	0	968	0.00%	negative
H136	G12/13	8,433	123	2,258	5.17%	positive
H142	G12/13	8,540	191	1,893	9.17%	positive
H143	G12/13	10,048	37	1,721	2.10%	positive
H144	G12/13	8,059	187	1,355	12.13%	positive
H145	G12/13	8,820	110	1,305	7.77%	positive
H149	G12/13	8,144	108	1,209	8.20%	positive
H152	G12/13	8,617	406	1,492	21.39%	positive
H155	G12/13	9,531	80	1,322	5.71%	positive
H157	G12/13	9,253	102	596	14.61%	positive

H158	G12/13	7,084	277	2,739	9.18%	positive
H163	G12/13	10,573	38	1,578	2.35%	positive
H173	G12/13	10,413	272	1,575	14.73%	positive
H175	G12/13	10,169	71	1,330	5.07%	positive
H176	G12/13	12,656	313	1,161	21.23%	positive
H177	G12/13	10,770	300	958	23.85%	positive
H178	G12/13	11,946	671	2,191	23.45%	positive
H181	G12/13	10,548	89	1,294	6.44%	positive
H182	G12/13	11,491	141	1,459	8.81%	positive
H185	G12/13	7,851	69	1,970	3.38%	positive
H187	G12/13	7,419	36	1,787	1.97%	positive
H193	G12/13	8,497	77	1,024	6.99%	positive
H195	G12/13	8,029	11	1,274	0.86%	positive
H201	G12/13	10,038	23	2,939	0.78%	positive
H205	G12/13	10,343	528	2,747	16.12%	positive
H207	G12/13	10,203	217	3,144	6.46%	positive
H208	G12/13	11,175	160	3,239	4.71%	positive
H209	G12/13	13,147	442	3,691	10.69%	positive
H211	G12/13	12,563	335	3,689	8.33%	positive
H212	G12/13	12,043	1	4,601	0.02%	negative
	Q61	11,419	1,302	4,421	22.75%	positive
H213	G12/13	12,181	386	2,527	13.25%	positive
H214	G12/13	12,779	0	3,249	0.00%	negative
	Q61	12,242	0	4,954	0.00%	negative
H215	G12/13	10,552	20	2,306	0.86%	positive
H216	G12/13	12,727	322	3,176	9.21%	positive
H217	G12/13	11,025	93	3,345	2.71%	positive
H218	G12/13	8,502	0	2,189	0.00%	negative
	Q61	10,734	0	2,903	0.00%	negative
H219	G12/13	9,907	310	3,105	9.08%	positive
H221	G12/13	12,323	469	3,937	10.64%	positive
H222	G12/13	6,695	540	2,330	18.82%	positive
H224	G12/13	12,397	19	1,665	1.13%	positive
H225	G12/13	7,993	0	1,634	0.00%	negative
	Q61	11,688	0	3,080	0.00%	negative

H226	G12/13	11,909	525	2,595	16.83%	positive
S003	G12/13	9,882	167	2,752	5.72%	positive
S004	G12/13	11,738	11	2,524	0.43%	positive
	Q61	9,363	77	1,662	4.43%	positive
S005	G12/13	10,987	166	2,118	7.27%	positive
S008	G12/13	11,491	198	2,531	7.26%	positive
S009	G12/13	8,331	425	1,193	26.27%	positive
S012	G12/13	14,107	0	3,513	0.00%	negative
	Q61	10,981	0	2,602	0.00%	negative
S018	G12/13	12,180	62	1,896	3.17%	positive
S023	G12/13	10,657	223	1,786	11.10%	positive
S025	G12/13	10,794	144	1,925	6.96%	positive
S026	G12/13	13,894	295	3,276	8.26%	positive
S032	G12/13	9,179	140	739	15.93%	positive
S036	G12/13	11,733	130	2,591	4.78%	positive
S043	G12/13	9,036	72	2,307	3.03%	positive
S044	G12/13	10,199	268	3,174	7.79%	positive
S048	G12/13	9,102	658	2,220	22.86%	positive
S058	G12/13	9,909	614	1,799	25.45%	positive
S064	G12/13	10,148	5	2,656	0.19%	positive
S067	G12/13	9,274	238	3,009	7.33%	positive
S071	G12/13	10,473	27	1,764	1.51%	positive
S072	G12/13	9,527	0	1,840	0.00%	negative
	Q61	10,856	0	2,631	0.00%	negative
S073	G12/13	11,123	1,300	3,008	30.18%	positive
S078	G12/13	10,667	1,131	3,373	25.11%	positive
S082	G12/13	11,343	226	2,447	8.45%	positive
S086	G12/13	11,191	398	5,908	6.31%	positive
S092	G12/13	10,640	634	1,958	24.46%	positive
S096	G12/13	10,582	1	3,476	0.03%	negative
	Q61	9,542	0	2,707	0.00%	negative
S102	G12/13	10,903	309	2,840	9.81%	positive
S123	G12/13	12,135	290	4,687	5.83%	positive
S126	G12/13	9,200	77	4,842	1.57%	positive
S130	G12/13	13,231	2,659	3,557	42.78%	positive

S131	G12/13	13,845	8	3,443	0.23%	positive
S136	G12/13	12,840	434	4,626	8.58%	positive
S139	G12/13	11,508	21	2,983	0.70%	positive
S142	G12/13	10,488	40	3,068	1.29%	positive
S146	G12/13	12,882	3	3,538	0.08%	positive
S155	G12/13	12,991	66	2,854	2.26%	positive

③ NGS と ddPCR での *KRAS* 変異の検出の比較

145 症例中 107 症例 (73.8%) で一致した変異が検出された。(表 21)
検出された MAF の中央値は、NGS で 9.2% (2.2%~38.2%)、ddPCR で 8.5% (1.6%~42.8%) であった。さらに、NGS と ddPCR による MAF は高い相関を認めた。 $(R^2 = 0.82)$ (図 2)。

以上から TIA に利用できる LBx の遺伝子パネルで検出可能な変異は、NGS で 121 症例 (83.4%)、ddPCR では 133 症例 (91.7%) の症例で検出され、NGS と ddPCR を組み合わせることで TIA に利用可能な変異は 139 症例 (95.8%) で検出された。

表 21 NGS と ddPCR で一致して検出された *KRAS* 変異

Parient	Mutation ID	ddPCR		NGS	
		MAF	(%)	MAF	(%)
H001	p.G12D	17.9%		22.2%	
H002	p.G12A	5.1%		4.2%	
H004	p.G12D	19.1%		16.5%	
H007	p.G12D	23.7%		14.3%	
H008	p.G12C	8.9%		8.2%	
H010	p.G12D	9.1%		14.2%	
H012	p.G12R	4.1%		2.5%	
H017	p.Q61H	6.6%		4.7%	
H018	p.G12V	3.2%		9.2%	
H021	p.G12V	16.5%		19.7%	
H023	p.G12V	2.0%		2.2%	
H024	p.Q61H	7.5%		7.7%	
H025	p.G12D	13.1%		15.6%	
H030	p.G12V	1.7%		2.4%	

H032	p.G12D	4.2%	5.2%
H033	p.G12D	20.7%	23.0%
H035	p.G12D	2.7%	2.7%
H036	p.G12D	24.0%	22.1%
H037	p.G12V	6.0%	6.1%
H041	p.G12D	18.1%	26.1%
H045	p.G12C	4.4%	6.5%
H047	p.G12D	15.4%	19.6%
H049	p.G12D	5.6%	5.7%
H051	p.G12V	5.3%	9.1%
H054	p.G12V	3.9%	2.4%
H059	p.G12D	3.0%	2.2%
H061	p.G12V	8.0%	8.5%
H067	p.G12C	4.9%	6.2%
H071	p.G12R	4.9%	5.0%
H075	p.G12R	15.0%	14.0%
H076	p.G12D	7.3%	3.4%
H077	p.G12D	17.0%	19.4%
H078	p.G12R	12.9%	9.6%
H081	p.G12V	6.1%	8.7%
H086	p.Q61R	2.5%	3.5%
H089	p.Q61H	10.3%	11.6%
H091	p.G13D	22.0%	13.8%
H092	p.G12R	14.6%	13.0%
H094	p.G12V	23.4%	19.4%
H100	p.G12D	2.9%	8.4%
H102	p.G12D	5.3%	5.7%
H105	p.G12V	5.6%	5.9%
H106	p.G12V	8.9%	6.6%
H116	p.G12D	5.8%	6.2%
H117	p.G12D	10.0%	6.7%
H118	p.G12D	9.5%	9.3%
H119	p.G12D	6.8%	9.5%
H123	p.G13D	23.2%	26.9%
H124	p.G12D	4.8%	3.0%

H126	p.G12D	7.4%	5.8%
H127	p.G12V	16.1%	13.3%
H130	p.G12D	9.2%	7.6%
H136	p.G12V	5.2%	6.1%
H142	p.G12D	9.2%	10.8%
H144	p.G12V	12.1%	22.1%
H145	p.G12V	7.8%	7.3%
H149	p.G12C	8.2%	6.6%
H152	p.G12R	21.4%	19.9%
H155	p.G12D	5.7%	3.2%
H157	p.G12D	14.6%	23.6%
H158	p.G12V	9.2%	11.5%
H163	p.G12A	2.4%	3.6%
H173	p.G12D	14.7%	19.4%
H175	p.G12V	5.1%	4.1%
H176	p.G12D	21.2%	26.2%
H177	p.G12D	23.8%	20.6%
H178	p.G12C	23.4%	22.9%
H181	p.G12R	6.4%	3.9%
H182	p.G12D	8.8%	11.3%
H185	p.G12V	3.4%	3.4%
H193	p.G12V	7.0%	2.4%
H205	p.G12V	16.1%	15.5%
H207	p.G12V	6.5%	4.8%
H208	p.G12V	4.7%	6.3%
H209	p.G12D	10.7%	10.9%
H211	p.G12V	8.3%	10.8%
H212	p.Q61H	22.8%	18.4%
H213	p.G12V	13.3%	10.7%
H216	p.G12V	9.2%	7.8%
H217	p.G12D	2.7%	3.5%
H219	p.G12D	9.1%	7.4%
H221	p.G12D	10.6%	15.7%
H222	p.G12D	18.8%	21.0%
H226	p.G12D	16.8%	17.9%

S003	p.G12D	5.7%	8.5%
S004	p.Q61H	4.4%	3.0%
S005	p.G12D	7.3%	4.5%
S008	p.G12D	7.3%	13.4%
S009	p.G12D	26.3%	37.6%
S018	p.G12D	3.2%	4.6%
S023	p.G12R	11.1%	15.8%
S025	p.G12D	7.0%	9.6%
S026	p.G12V	8.3%	6.0%
S036	p.G12R	4.8%	7.0%
S044	p.G12V	7.8%	5.3%
S048	p.G12V	22.9%	31.5%
S058	p.G12D	25.4%	29.8%
S067	p.G12V	7.3%	9.8%
S073	p.G12V	30.2%	34.5%
S078	p.G12V	25.1%	28.9%
S082	p.G12D	8.5%	10.3%
S092	p.G12V	24.5%	19.2%
S102	p.G12R	9.8%	11.8%
S123	p.G12D	5.8%	8.4%
S126	p.G12V	1.6%	3.1%
S130	p.G12D	42.8%	38.2%
S136	p.G12D	8.6%	15.6%

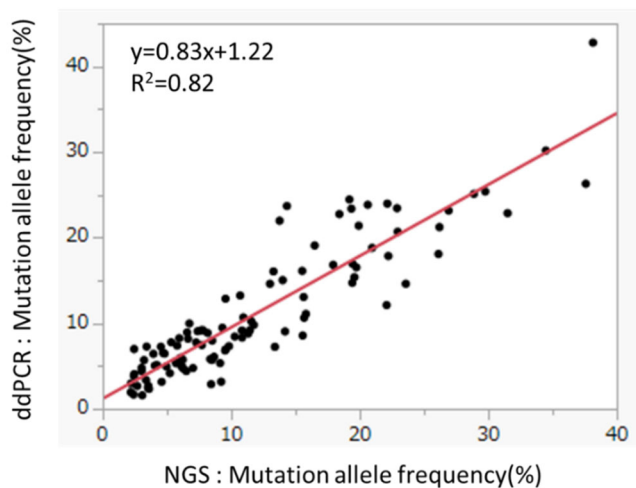


図2 NGS と ddPCR で検出された *KRAS* 変異の MAF の相関

④ 腫瘍のゲノムプロファイリングと再発予測

腫瘍のゲノムプロファイリングで検出された *KRAS*、*TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A* と再発の Kaplan-Meier 曲線を図3に示す。*TP53*が検出された症例のみ再発と有意に関連があった ($p=0.0245$)。*KRAS*とそれぞれの変異の有無でも検討したが有意な差は認めず *KRAS*と *CDKN2A* 変異を併せ持つ症例が再発しやすい傾向 ($p=0.0971$) があるのみであった (図4)。

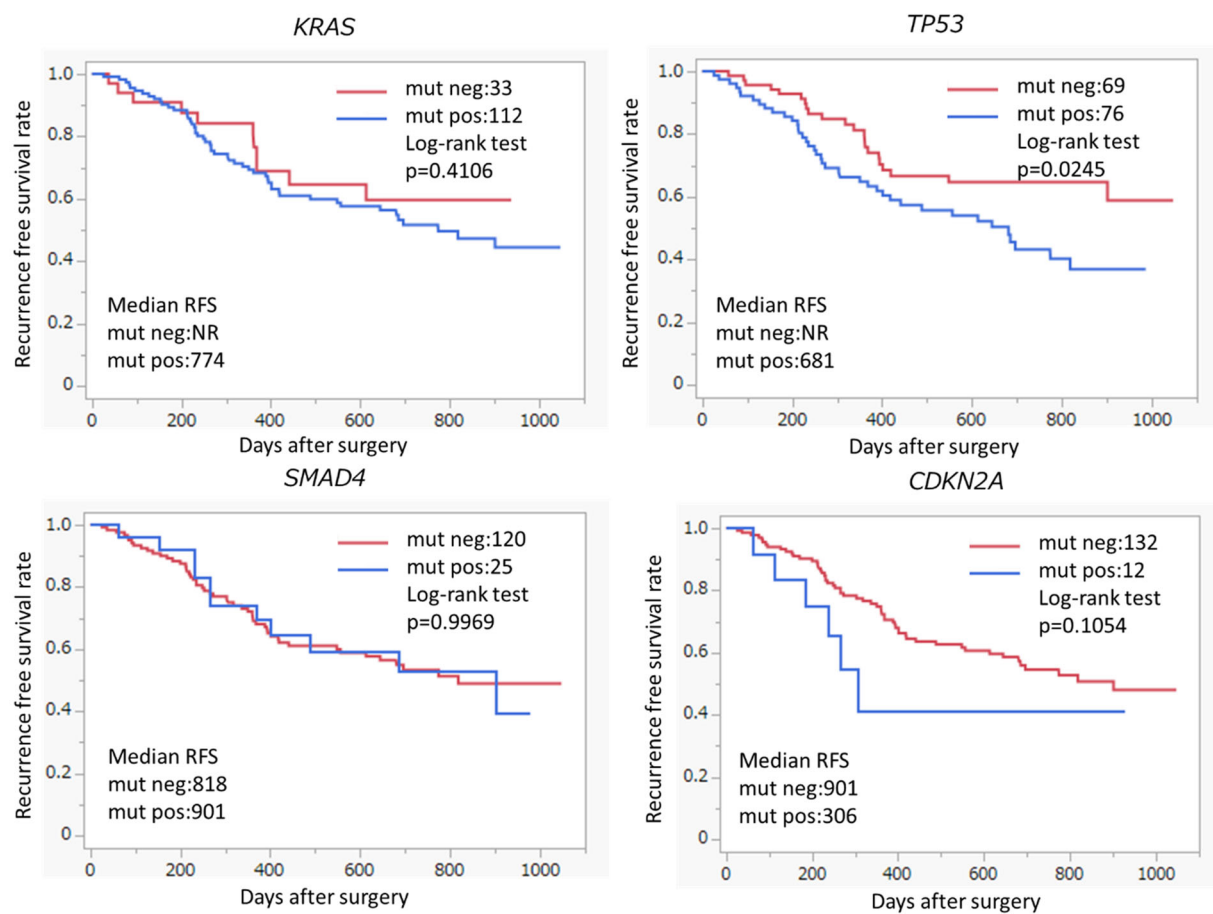


図3 腫瘍組織における *KRAS*、*TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A* 変異と再発の関係

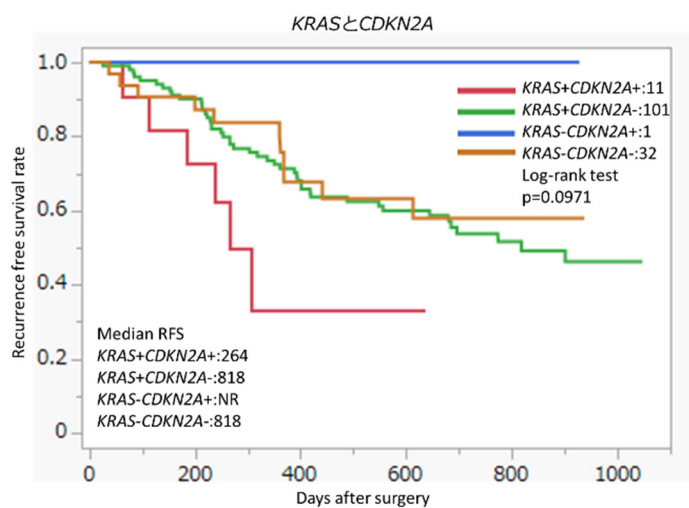
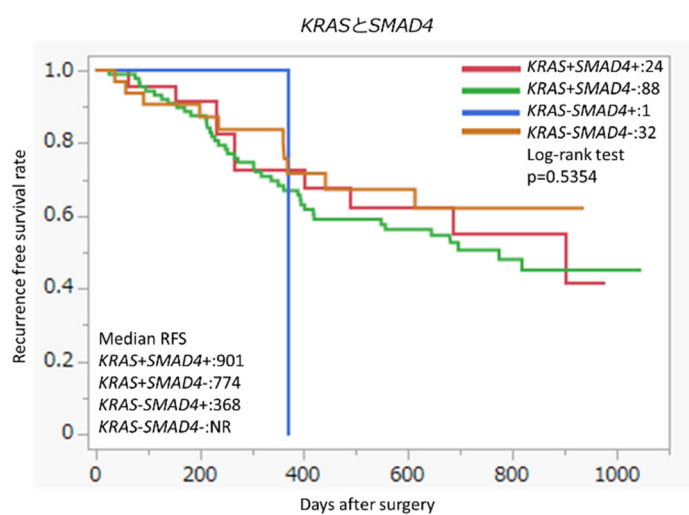
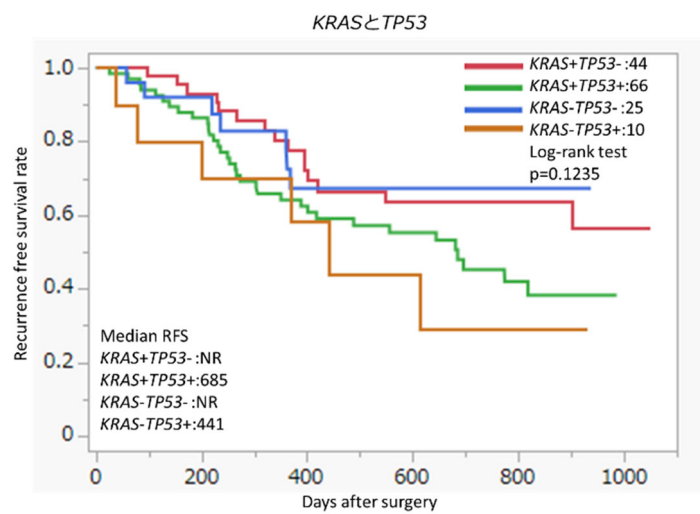


図4 腫瘍組織における *KRAS* と *TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A* 共存変異と再発の関

⑤ LBx での変異検出

LBx で検出された変異のオンコプロットを図 5 に示す。LBx のみの評価では、145 症例中 51 症例（35.2%）に変異が検出された。TIA を用いることで 145 症例中 69 症例（47.6%）に検出率が上昇した（図 6）。

サンプル採取が治療介入前の 71 症例では TIA によって有意に変異検出率が向上したが、治療介入後の 74 症例では有意差を認めなかった（図 6）。*KRAS* は治療介入前の症例の方が有意に検出された（図 7）。検出された *KRAS* を表 22 に示す。

また、TNM 分類と ctDNA の関係性を評価すると、M 因子のみが ctDNA の検出と関連していた（図 8）。

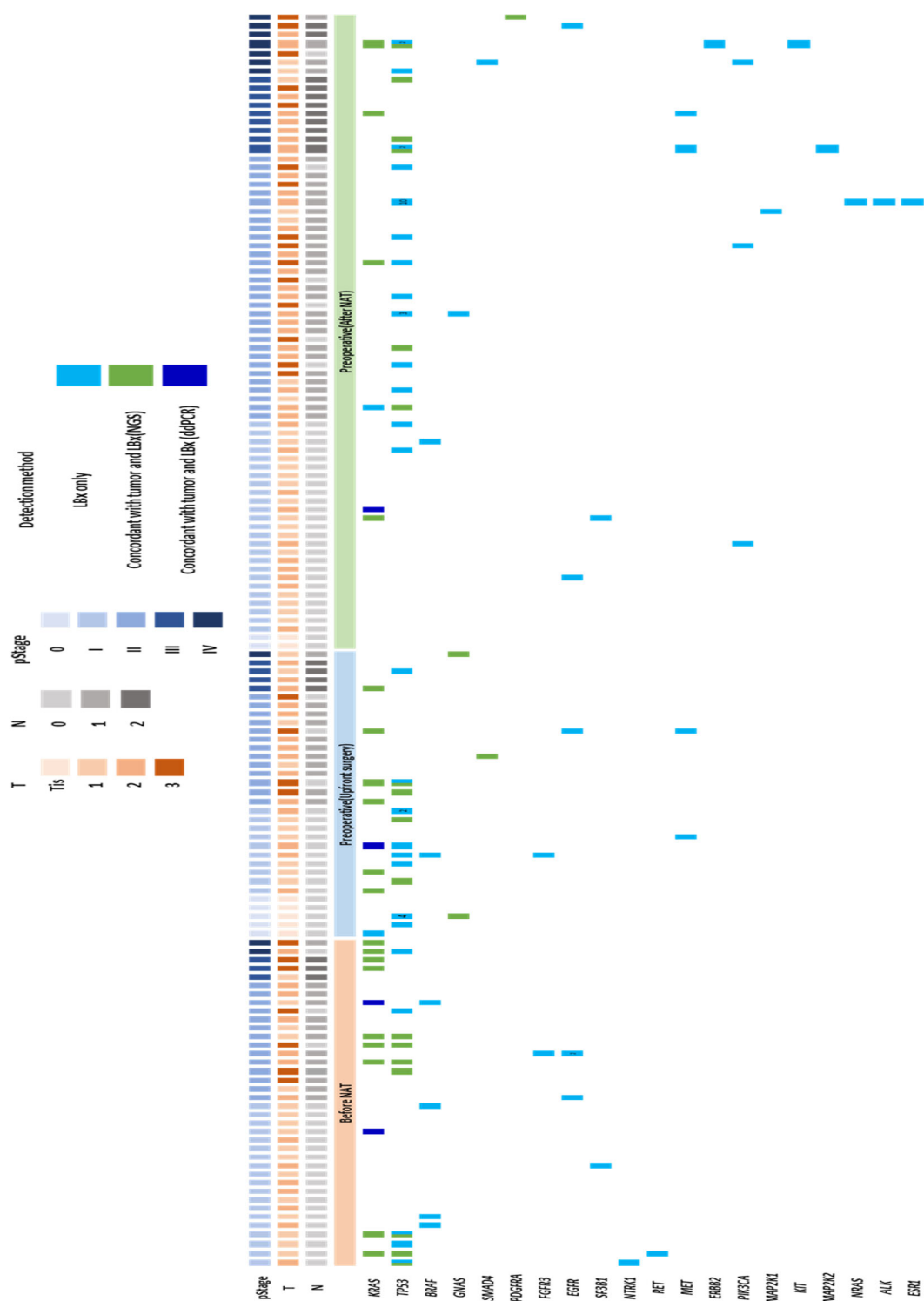


図5 145症例のLBxでのオンコプロット

LBxのみで検出された変異を水色、腫瘍と一致した変異を深緑、特に ddPCR でのみ検出され一致した変異を青で示す。

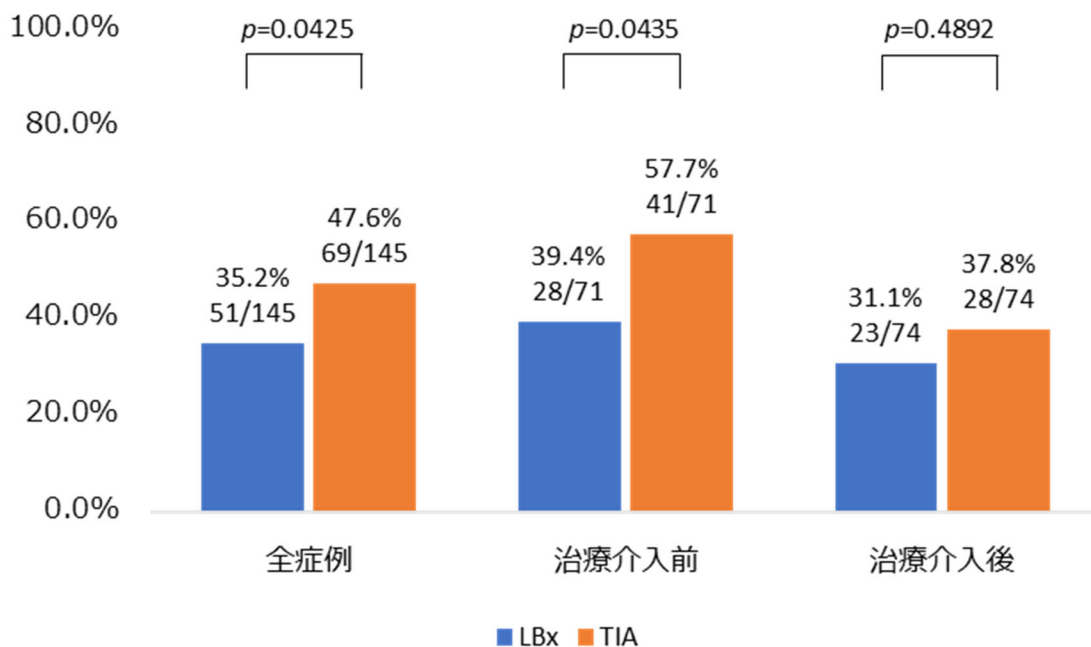


図6 TIA有無別のLBxでの変異検出率

全症例、治療介入前、治療介入後のそれぞれのLBxのみ、TIAを用いた変異検出率を示す。

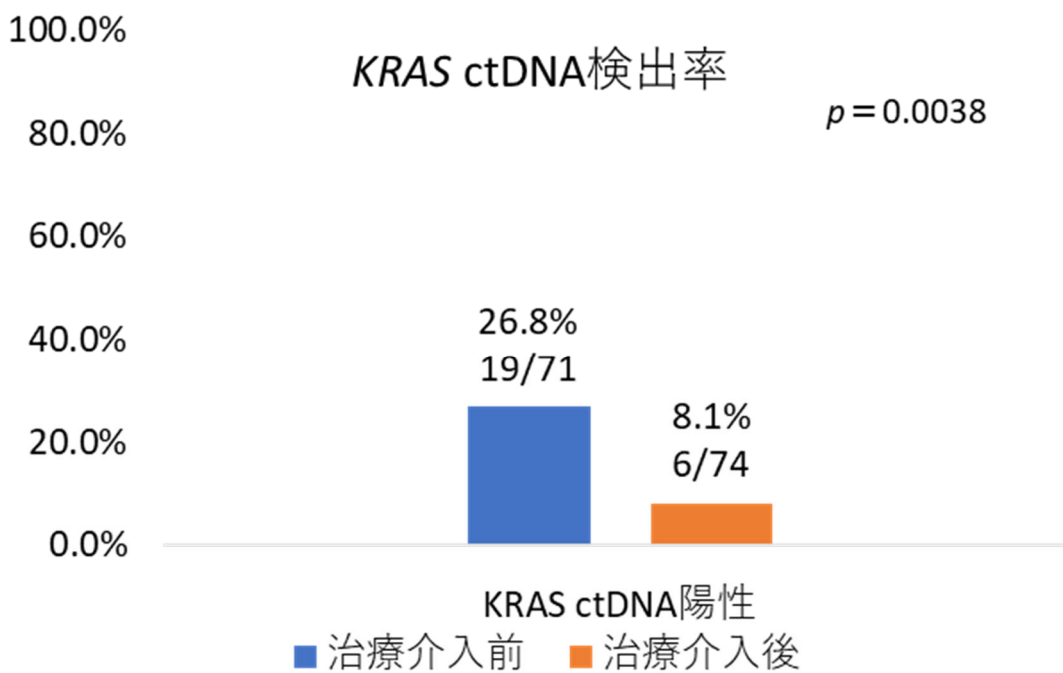


図7 KRAS ctDNA の検出率

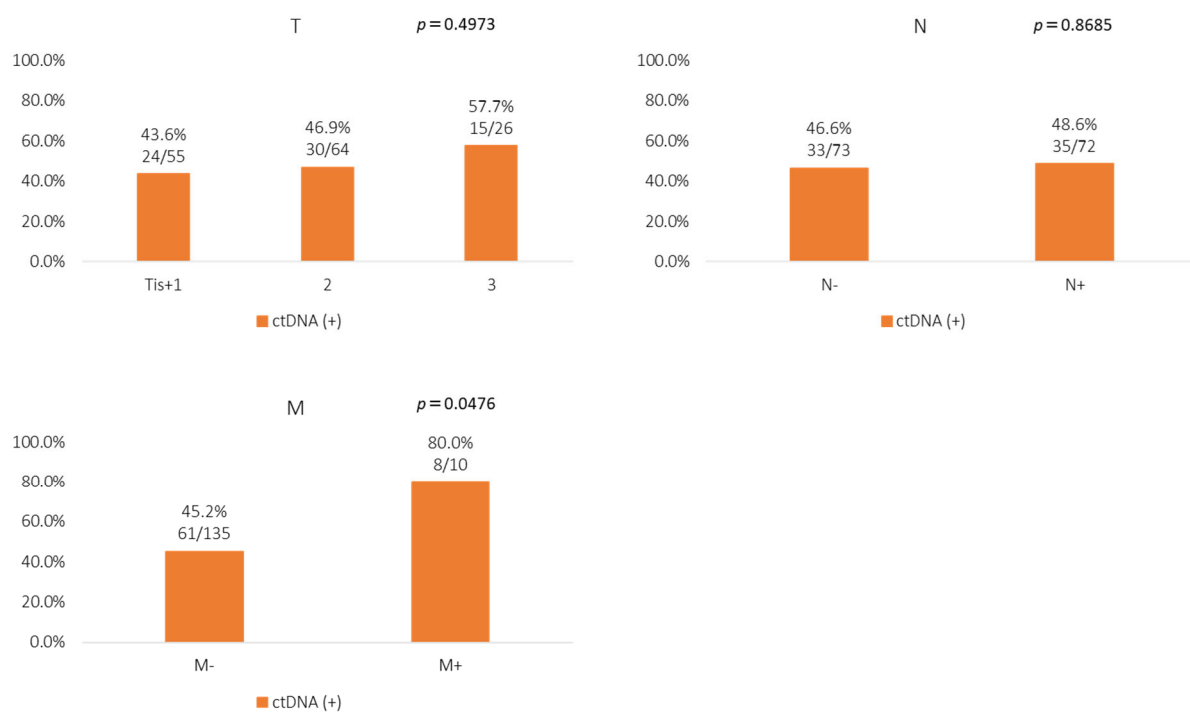


図8 TNM 分類と ctDNA 検出率

T 因子、N 因子、M 因子それぞれの TIA を用いた ctDNA 検出率を示す。

表 22 NGS で検出された *KRAS* ctDNA

Patient	Group	Gene	Mutation ID	MAF (%)
H010	Upfront surgery	<i>KRAS</i>	<i>p.G12D</i>	0.02%
H018	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.04%
H025	Upfront surgery	<i>KRAS</i>	<i>p.G12D</i>	0.05%
H034	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.05%
H037	After NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.Q61H</i>	0.13%
H087	Upfront surgery	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.07%
H102	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12D</i>	0.02%
H105	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.15%
H123	Upfront surgery	<i>KRAS</i>	<i>p.G13D</i>	0.08%
H130	Upfront surgery	<i>KRAS</i>	<i>p.G12D</i>	0.02%
H145	After NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.08%
H152	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12R</i>	0.04%
H175	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.08%
H178	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12C</i>	0.66%
H187	After NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12S</i>	0.02%
H212	Upfront surgery	<i>KRAS</i>	<i>p.Q61H</i>	0.24%
H221	Upfront surgery	<i>KRAS</i>	<i>p.G12D</i>	0.02%
S004	Upfront surgery	<i>KRAS</i>	<i>p.V14I</i>	0.10%
S048	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.08%
S067	After NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.64%
S078	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.03%
S092	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12V</i>	0.05%
S123	After NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12D</i>	0.05%
S130	After NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12D</i>	0.08%
S142	Before NAT	<i>KRAS</i>	<i>p.G12C</i>	0.06%

⑥ ctDNA と再発予測

LBx のみと TIA での ctDNA 検出と再発の Kaplan-Meier 曲線を図 9 に示す。ctDNA 検出と再発に関連を認めなかった。 $(p=0.6638, p=0.5283)$

次に腫瘍と LBx で一致した ctDNA のみを対象とすると、ctDNA 陽性症例は ctDNA 陰性症例よりも有意に再発を認めた。(図 10)

一致した ctDNA のみを対象としても *KRAS* 以外の一致では再発と関連を認めなかった ($p=0.4746$)。また、*KRAS* は一致の有無に関わらず *KRAS* ctDNA 陽性であれば有意に予後不良であった ($p=0.0082$) (図 11)。

さらに *KRAS* と *TP53* を併せ持つ症例は非常に予後が悪いことが示唆された ($p<0.0001$) (図 12)。

腫瘍マーカーである CA19-9 との比較検討では、CA19-9 単独では再発しやすい傾向を示すまでであったが、ctDNA と CA19-9 を組み合わせることで、ctDNA 陽性かつ CA19-9 が基準値以上の症例は再発リスクが高いことが示された (図 13)。

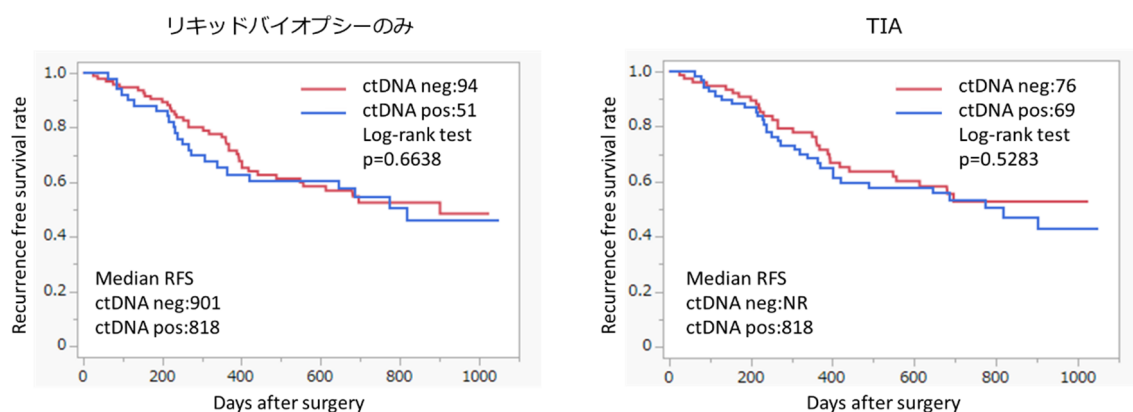


図 9 LBx のみと TIA での ctDNA 検出と再発の関連

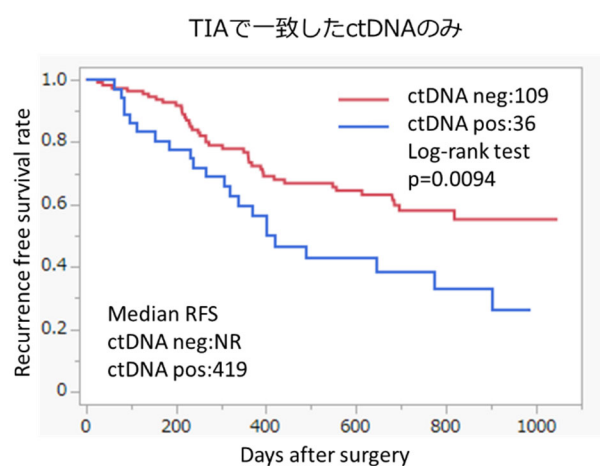


図 10 TIA で一致した ctDNA と再発の関連

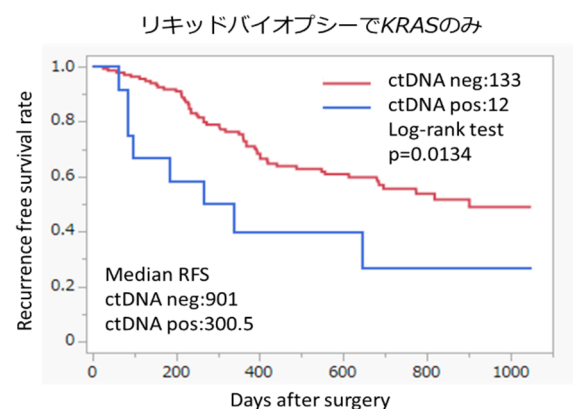
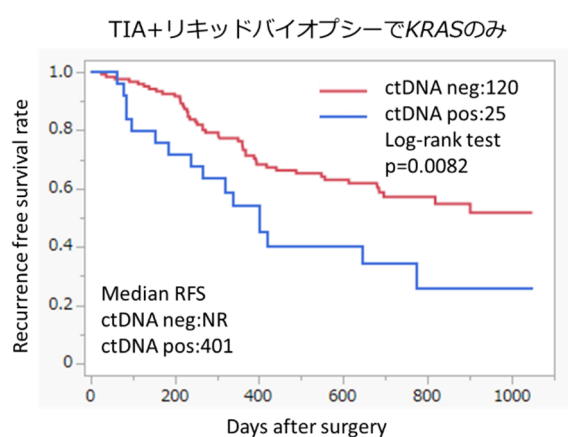
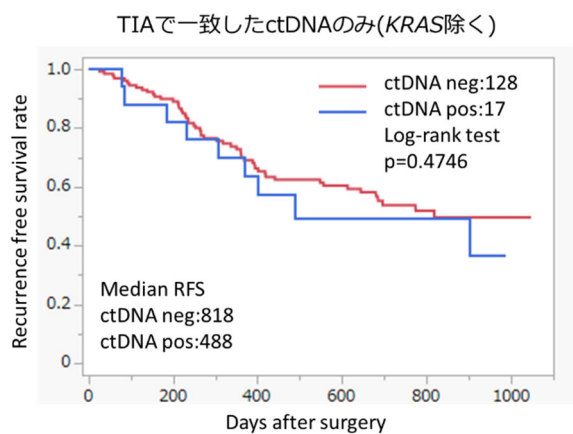


図 11 *KRAS* の有無と再発との関連

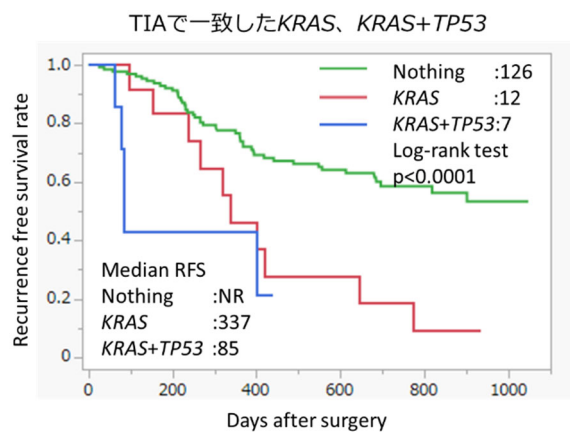


図 12 TIA で一致した *KRAS* のみと *KRAS* と *TP53* を併せ持つ症例の予後について

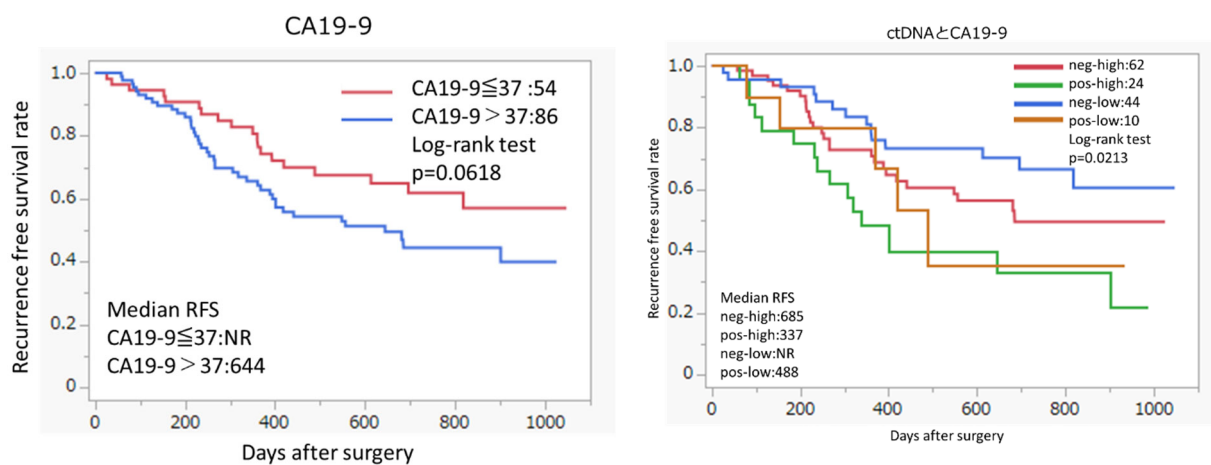


図 13 CA19-9 と TIA で一致した ctDNA との再発の関連

考察

本研究では膵臓癌における LBx の有用性を明らかにすべく、145 の膵臓癌切除症例を対象に 409 のがん関連遺伝子を対象とした遺伝子パネル、52 のがん関連遺伝子を対象とした遺伝子パネルの 2 つを用いたターゲットシーケンス、*KRAS* を対象とした ddPCR を行った。その結果 LBx 単独ではなく TIA を用いる方が変異の検出率向上と予後の予測に有用であることが示された。

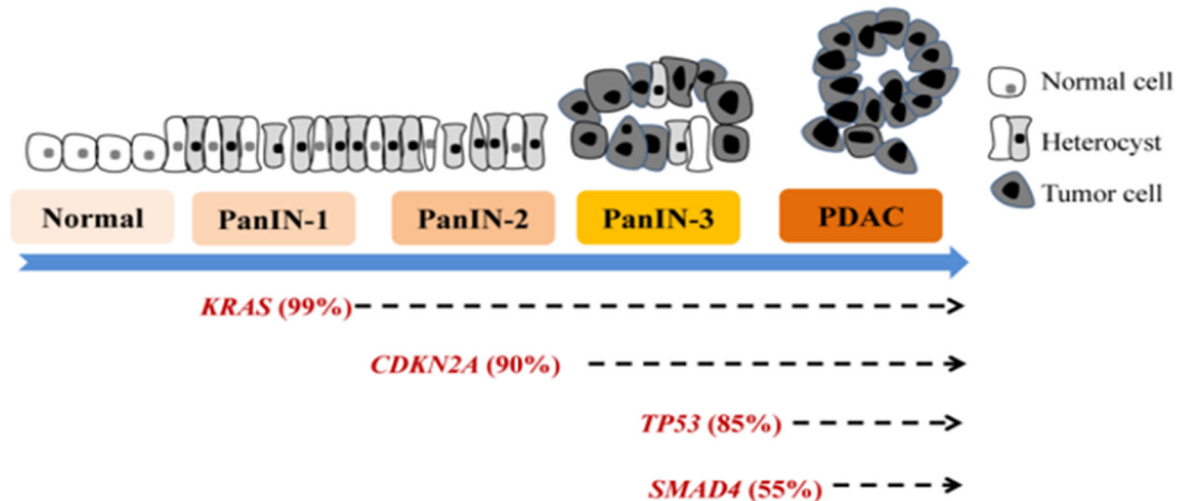
先に述べたように膵臓癌では ctDNA の検出率は低く、膵臓癌の腫瘍体積が少ないことによる腫瘍細胞含有量が少ないこと (Strijker et al, 2020) や膵臓癌の生物学的特徴によって ctDNA が血中に放出されにくいことが知られている (Neesse et al, 2019 ; Sivapalan et al, 2021)。そのため MAF が低い変異や変異数が 1 コピーしかない変異は、ctDNA ではなくシーケンスエラーによる偽陽性の変異や cfDNA 由来の変異である可能性があり、LBx のみでの評価では解析の信頼性が低下する可能性が考えられた。そのため本検討では、変異頻度の低い ctDNA の検出率を高めるために分子バーコードを用いたターゲットシーケンス、TIA による解析を行ったが、145 症例全体での ctDNA 検出率は 35.2% (51/145) と低く、先行研究と同程度であり

(Guo et al, 2020)、TIA でも ctDNA 検出率は 47.6% (69/145) と低かった。しかし、図 6 で示したように治療介入の有無で症例を分けて検討すると、介入前の症例による LBx のみの評価では ctDNA 検出率が低かったが (39.4%)、TIA を行うことで有意に ctDNA 検出率が向上 (57.7%) した。一方治療介入後の症例では TIA でも ctDNA 検出率の有意な向上を認めなかった。また、図 7 で示すように治療介入後の症例では治療介入前の症例と比べ *KRAS* 検出率が有意に低かった。この結果から *KRAS* ctDNA は術前治療によって消失していると考えられ、画像検査、腫瘍マーカーのみならず、ctDNA ダイナミクスも術前治療の効果判定に有用である可能性が示された。そのため治療介入前後でのサンプル解析が重要である。

膵臓癌において *KRAS* は 90% 以上の症例で変異しており、その多くがコドン G12 と Q61 であることが知られている (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017)。本検討の NGS 解析では腫瘍中の *KRAS* は 77.2% と検出率が低かった。そのためより感度の高い ddPCR でも *KRAS* の有無を評価したところ、91.7% の症例で *KRAS* の変異が確認された。検出された変異の変異頻度は NGS と ddPCR の間で高い相関を認めており、*KRAS* の評価は ddPCR の併用が有用と考えられた。NGS での *KRAS* 変異検出率が低かったことは、腫瘍のゲノムプロファイリングには切除検体を用いており、多くの症例 (77.2%) が術前治療を施行していたため、治療によって *KRAS* が消失、あるいは検出感度以下まで変異頻度が低下したためと考えられた。また、腫瘍組織においては *TP53* 変異のみが再発と有意な関連を示した。既報においても *TP53* 変異は予後不良因子であることが示されている (Zhang et al, 2021)。ま

た、図 14 で示すように *TP53* 変異の検出は PanIN から膵臓癌への進行に寄与しており (Guo et al, 2016)、腫瘍組織における *TP53* 変異を有する症例は、*TP53* 変異のない症例と比べ、膵臓癌が進行している可能性が考えられた。

図 14 膵臓癌の遺伝的発癌モデル (Guo et al, 2016)



膵臓癌の発癌において正常細胞から PanIN へと進行する際に *KRAS*、*CDKN2A* 変異が生じ、膵臓癌へ進行する際に *TP53*、*SMAD4* が関連している。

KRAS 変異との共存変異で評価した場合においては *CDKN2A* 変異のみ再発しやすい傾向を認めた。Doyle らは腫瘍組織において *CDKN2A* 変異を有する症例のみが有意に全生存率に関連があることを示しており (Doyle et al, 2019)、膵臓癌では *TP53* と同様に *CDKN2A* も腫瘍の進行度と関連が高い可能性が考えられた。

TIA を用いたか否かに関わらず、LBx で検出された ctDNA すべてを対象とした場合、ctDNA 検出と再発に関連を認めなかった。これは血液中の cfDNA を完全に除外できず ctDNA の選択性が低くなっているためと考えられる。そこで TIA で一致した変異は確実に ctDNA であるため、これらを対象として評価すると再発と有意な関連を認めた。しかし、TIA で一致した ctDNA を対象としても *KRAS* を除いた場合、再発との関連を認めなかった (図 11)。*KRAS* は検出された 25 症例のうち 2 症例を除いた 23 症例が TIA で一致した ctDNA であったため、*KRAS* 単独での再発リスク評価では LBx のみで検出された ctDNA を含めても再発と関連を認めた。さらに症例数は少ないが *KRAS* と *TP53* の ctDNA を併せ持つ症例は 7 症例と少ないものの、術後から再発までの観察期間中央値で 85 日 (61-439 日) であり、非常に予後不良であった。本検討の結果から ctDNA の内、最も予後に関与しているのは *KRAS* であることが

示された。本検討は術前サンプルを用いた解析であるため、術前の LBx によって *KRAS* ctDNA が検出された症例では、*KRAS* ctDNA の陰性化を確認できるまで NAT を継続する、また *KRAS* ctDNA 陰性症例では、NAT をせずに早期に手術を行うというように手術までの治療戦略の決定に LBx による *KRAS* ctDNA の評価が有用であることが示された。また、*TP53* ctDNA 検出を評価することで予後予測の精度向上が示唆されたが、本検討の結果、NGS と ddPCR の検査の簡便さ、ランタイム、感度、費用対効果を考えた際に NGS による遺伝子パネル評価ではなく ddPCR による *KRAS* 評価が良いと考えられた。

腫瘍マーカーである CA19-9 が術前に基準値である 37 以上であった症例は CA19-9 が測定されていた 140 症例中 86 症例 (61.4%) であった。これは TIA による ctDNA 検出率よりも高かった。しかし基準値をカットオフとして CA19-9 と再発の関連を評価すると、再発しやすい傾向を示すにとどまった (図 13)。これは基準値をカットオフとすると CA19-9 が腫瘍自体によって上昇したものだけではなく、腫瘍による胆道狭窄や胆管炎などの非腫瘍原性の CA19-9 による上昇も含まれているためと考えられた。TIA による評価と CA19-9 の測定を組み合わせることで、再発リスクが高い症例を選別することが可能であった。また、図 14 にあるように CA19-9 が基準値以下の症例においても ctDNA が検出されている。CA19-9 は Lewis 抗原陰性のため上昇しない症例もあることため、LBx による ctDNA の評価は Lewis 抗原陰性症例においても病勢の評価が可能になるため有用と思われる。

本検討の課題として腫瘍のゲノムプロファイリングが切除検体であることがあげられる。術後化学療法については切除検体から得られた情報を基に化学療法を選択できるが、術前に得られるサンプルは血液のほか腓液、生検組織となる。腓液を用いた LBx の報告は散見され、Choi ら (Choi et al, 2019) は膵臓癌患者 21 症例の切除検体と、術中に主膵管から採取した腓液のゲノムプロファイリングを行い、腓液から 21 症例中 20 症例 (95%) で *KRAS* 変異が検出され、17 症例 (80%) で複数の *KRAS* 変異が検出された。また、18 症例 (86%) が腫瘍組織と一致した *KRAS* 変異であった。内視鏡的逆行性胆管膵管造影 (endoscopic retrograde cholangiopancreatography : ERCP) で採取した腓液の ddPCR で *KRAS* ctDNA が検出可能であることも報告されている (Okada et al, 2018)。また、Wang ら (Wang et al, 2022) は超音波内視鏡下穿刺吸引法 (endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration : EUS-FNA) で採取した生検組織 105 症例のうち、85 症例 (81%) から *KRAS* 変異が検出されたと報告している。本検討で LBx の評価に用いた遺伝子パネルは市販の汎癌遺伝子パネルであり、*CDKN2A* が含まれていない。NGS の評価も膵臓癌に特化したカスタムパネルを作成・利用することで、検査の感度・費用を改善することができる可能性があるため検討の余地がある。

また、本検討は NGS 解析に多くのサンプル量を使用しているため、LBx サンプル

では ddPCR を行うことができなかった。ddPCR を行うことで *KRAS* の検出率が向上する可能性があるため、さらなる検討が望まれる。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

- ・ TIA を行うことで LBx による ctDNA 検出率を向上させることが可能であった。
- ・ NGS と ddPCR で検出された *KRAS* 変異の検出には高い相関が見られた。
- ・ TIA での評価で、治療介入前サンプルは ctDNA 検出率が有意に高くなったが、治療介入後サンプルでは、ctDNA 検出率に有意差を認めなかった。
- ・ *TP53* ctDNA は *KRAS* とあわせ持つことで予後と関連を認めたが、膵臓癌において単独の検出で予後に関与しているのは *KRAS* のみであった。

② 新知見の意義

これまで膵臓癌における LBx の評価は、ddPCR による *KRAS* 単独の評価が主流であり、NGS による評価が少なく *KRAS* 以外の ctDNA と予後との関連について明らかではない部分があった。本検討により、膵臓癌における ctDNA と予後との関連が明らかになり、*KRAS* ctDNA のみが単独で予後と関連を認めたため、LBx での評価は NGS ではなく ddPCR による *KRAS* ctDNA の評価が有用で、LBx は膵臓癌の治療戦略決定に利用可能であることが示された。

③ 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

術後早期に複数のタイムポイントのサンプルを収集し、ddPCR によって *KRAS* ctDNA を評価することで微小残存病変の評価が可能となる。また治療後のサンプルを用いた縦断的モニタリングによって ctDNA の検出と画像再発までのリードタイムの評価も可能となり、*KRAS* ctDNA による再発の早期発見に関連する研究が可能となる。また術後 ctDNA 陽性となった症例では画像上再発が確認される前でも治療介入を行うといった研究も可能となるため、膵臓癌の予後の改善が得られることを期待する。

④ 今後の課題

本検討では市販の汎癌遺伝子パネルを用いているため *CDKN2A* が LBx での評価に含まれておらず、膵臓癌で Big4 と呼ばれる遺伝子変異である *KRAS*、*TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A* のすべてを対象として検討ができていない。また、切除検体を用いた TIA であるため、腫瘍のゲノムプロファイリングが化学療法の影響を受けている。正確な検討を行うためには EUS-FNA での生検検体を用いたゲノムプロファイリングを行う必要があり、そのためにはゲノムプロファイリングに必要な生検組織量の決定など更なる研究が必要である。

利益相反

この研究の一部は、戦略的イノベーション創造プログラム、AI（人工知能）ホスピタルによる高度診断・治療システム、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所（NIBIOHN）の助成（SIPAIH18C03）を受けたものである。

謝辞

本論文の作成に執筆にあたり、非常に丁寧にご指導頂いたがんプレシジョン医療研究センター リキッドバイオプシー診断開発プロジェクト リキッドバイオプシーシステム開発グループ Siew-Kee Low グループリーダー、がんプレシジョン研究センター所長 中村 祐輔先生、および本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。また、本研究において対象症例の資料を御提供頂きました札幌医科大学附属病院の症例も解析させて頂きました。札幌医科大学附属病院消化器・総合、乳腺・内分泌外科 木村 康利 先生、消化器内科 本谷 雅代 先生に深く感謝いたします。加えて、本研究を実施するにあたり様々な方々のご指導・ご協力を賜りました。リキッドバイオプシー診断開発プロジェクトの皆様、そして北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱの皆様に心から感謝致します。

引用文献

Affolter KE, Hellwig S, Nix DA, Bronner MP, Thomas A, Fuertes CL, Hamil CL, Garrido-Laguna I, Scaife CL, Mulvihill SJ, et al (2021) Detection of circulating tumor DNA without a tumor-informed search using next-generation sequencing is a prognostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia* 23, 859-869.

Ballehaninna UK and Chamberlain RS (2012) 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, 105-119.

Bardeesy N and DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2, 897-909.

Bocanegra V, Vaquer CC, Samartino CG, Arbona S, Ongay RL, Gudiño E, Valdemoros P, Sanguinetti G, Correa A, Pellegrini PA et al (2023) A novel liquid biopsy methylation-based technology and early detection of colorectal cancer in patients. *J Clin Oncol* 41, 16.

Botrus G, Uson Junior PLS, Raman P, Kaufman AE, Kosiorek H, Yin J, Fu Y, Majeed U, Sonbol MB, Ahn DH, et al (2022) Circulating Cell-Free Tumor DNA in Advanced Pancreatic Adenocarcinoma Identifies Patients With Worse Overall Survival. *Front Oncol* 11, 794009.

Cancer Genome Atlas Research Network (2017) Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32, 185-203.

Cheng H, Liu C, Jiang J, Luo G, Lu Y, Jin K, Guo M, Zhang Z, Xu J, Liu L, et al (2017) Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients. *Int J Cancer* 140, 2344-2350.

Chin YM, Takahashi Y, Chan HT, Otaki M, Fujishima M, Shibayama T, Miki Y, Ueno T, Nakamura Y and Low SK (2021) Ultradeep targeted sequencing of circulating tumor DNA in plasma of early and advanced breast cancer. *Cancer Sci* 112, 454-464.

Choi MH, Mejl  nder-Andersen E, Manueldas S, El Jellas K, Steine SJ, Tjensvoll K, S  ttran HA, Knappskog S, Hoem D, Nordg  rd O, et al (2019) Mutation analysis by deep sequencing of pancreatic juice from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 19, 11.

Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, Schmidt CM, Yip-Schneider MT, Allen PJ, Schattner M, et al (2017) Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 10202-10207.

Corcoran RB and Chabner BA (2018) Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med* 379, 1754-1765.

Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB 3rd, Boland P, Chung K, Copur MS, Corcoran RB, Deming DA, et al (2020) ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal-Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev Clin Oncol* 17, 757-770.

Del Re M, Vivaldi C, Rofi E, Vasile E, Miccoli M, Caparello C, d'Arienzo PD, Fornaro L, Falcone A and Danesi R (2017) Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci Rep* 7, 7931.

Doyle A, Kubler MM, Harris AC, López A, Govindaraj P, Prins P and Weinberg BA (2019) The impact of CDKN2A mutations on overall survival in pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 37, 278.

Gillen S, Schuster T, Buschenfelde CM, Friess H and Kleeff J (2010) Preoperative/Neoadjuvant Therapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Response and Resection Percentages. *PLoS Med* 7, e1000267.

Goggins M (2005) Molecular markers of early pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 23, 4524-31.

Groot VP, Mosier S, Javed AA, Teinor JA, Gemenetzi G, Ding D, Haley LM, Yu J, Burkhart RA, Hasanain A, et al (2019) Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 25, 4973-4984.

Groot VP, Rezaee N, Wu W, Cameron JL, Fishman EK, Hruban RH, Weiss MJ, Zheng L, Wolfgang CL and He J (2018) Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg* 267, 936-945.

Guo J, Xie K and Zheng S (2016) Molecular Biomarkers of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Their Implications in Early Diagnosis and Therapeutic Intervention of Pancreatic Cancer. *Int J Biol Sci* 12, 292-301.

Guo S, Shi X, Shen J, Gao S, Wang H, Shen S, Pan Y, Li B, Xu X, Shao Z, et al (2020) Preoperative detection of KRAS G12D mutation in ctDNA is a powerful predictor for early recurrence of resectable PDAC patients. *Br J Cancer* 122, 857-867.

Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, Sueda T and Hiyama E (2016) Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 115, 59-65.

Hruban RH, Goggins M, Parsons J and Kern SE (2000) Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6, 2969-2972.

Kitahata T, Kawai M, Hirrono S, Okada K, Miyazawa M, Motobayashi H, Ueno M, Hayami S, Miyamoto A and Yamaue H (2022) Circulating Tumor DNA as a Potential Prognostic Marker in Patients with Borderline-Resectable Pancreatic Cancer Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy Followed by Pancreatectomy. *Ann Surg Oncol* (3), 1596-1605.

Lee B, Lipton L, Cohen J, Tie J, Javed AA, Li L, Goldstein D, Burge M, Cooray P, Nagrial A, et al (2019) Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Ann Oncol* 30, 1472-1478.

Lin B, Jiang J, Jia J and Zhou X (2022) Recent Advances in Exosomal miRNA Biosensing for Liquid Biopsy. *Molecules* 27, 7145.

Mohan S, Ayub M, Rothwell DG, Gulati S, Kilerci B, Hollebecque A, Sun Leong H, Smith NK, Sahoo S, Descamps T, et al (2019) Analysis of circulating cell-free DNA identifies KRAS copy number gain and mutation as a novel prognostic marker in Pancreatic cancer. *Sci Rep* 9, 11610.

Nakano Y, Kitago M, Matsuda S, Nakamura Y, Fujita Y, Imai S, Shinoda M, Yagi H, Abe Y, Hibi T, et al (2018) KRAS mutations in cell-free DNA from preoperative and postoperative sera as a pancreatic cancer marker: a retrospective study. *Br J Cancer* 118, 662-669.

Neesse A, Bauer CA, Öhlund D, Lauth M, Buchholz M, Michl P, Tuveson DA and Gress TM (2019) Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: ready for clinical translation? *Gut* 68, 159-171.

Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W and Palme GH (2018) Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 333-348.

Okada T, Iwano H, Ono Y, Karasaki H, Sato T, Yamada M, Omori Y, Sato H, Hayashi A, Kawabata H, et al (2018) Utility of "liquid biopsy" using pancreatic juice for early detection of pancreatic cancer. *Endosc Int Open* 12, E1454-E1461.

Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, et al (2011) DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet Med* 11, 913-920.

Parra-Robert M, Santos VM, Canis SM, Pla XF, Fradera JMA and Porto RM (2018) Relationship Between CA 19.9 and the Lewis Phenotype: Options to Improve Diagnostic Efficiency. *Anticancer Res* 38, 5883-5888.

Peng M, Xie Y, Li X, Qian Y, Tu X, Yao X, Cheng F, Xu F, Kong D, He B, et al (2019) Resectable lung lesions malignancy assessment and cancer detection by ultra-deep sequencing of targeted gene mutations in plasma cell-free DNA. *J Med Genet* 56, 647-653.

Pietrasz D, Sereni E, Lancelotti F, Pea A, Luchini C, Innamorati G, Salvia R and Bassi C (2022) Circulating tumour DNA: a challenging innovation to develop "precision onco-surgery" in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 126, 1676-1683.

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, and Matrisian LM (2014) Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913-2921.

Shen SY, Singhanian R, Fehringer G, Chakravarthy A, Roehrl MHA, Chadwick D, Zuzarte PC, Borgida A, Wang TT, Li T, et al (2018) Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes. *Nature* 563, 579-583.

Strijker M, Soer EC, de Pastena M, Creemers A, Balduzzi A, Beagan JJ, Busch OR, van Delden OM, Halfwerk H, van Hooft JE, et al (2020) Circulating tumor DNA quantity is related to tumor volume and both predict survival in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 146, 1445-1456.

Sugimori K, Tsuchiya H, Suzuki Y, Tsuyuki S, Kaneta Y, Hirotani A, Sanga K, Tozuka Y, Komiyama S, Sato T, et al (2020) Quantitative monitoring of circulating tumor DNA in patients with advanced pancreatic cancer undergoing chemotherapy. *Cancer Sci* 111, 266-278.

Suzuki T, Suzuki T, Yoshimura Y, Yahata M, Yew PY, Nakamura T, Nakamura Y, Park JH and Matsuo R (2020) Detection of circulating tumor DNA in patients of operative colorectal and gastric cancers. *Oncotarget* 11, 3198-3207.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, and Goggins M (2011) Pancreatic cancer. *Lancet* 378, 607-620.

Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, Pacey S, Baird R and Rosenfeld N (2017) Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 17, 223-238.

Wang R, Zhao Y, Wang Y, Zhao Z, Chen Q, Duan Y, Xiong S, Luan Z, Wang J and Cheng B (2022) Diagnostic and Prognostic Values of KRAS Mutations on EUS-FNA Specimens and Circulating Tumor DNA in Patients With Pancreatic Cancer. *Clin Transl Gastroenterol* 13, e00487.

Watanabe F, Suzuki K, Tamaki S, Abe I, Endo Y, Takayama Y, Ishikawa H, Kakizawa N, Saito M, Futsuhara K, et al (2019) Longitudinal monitoring of KRAS-mutated circulating tumor DNA enables the prediction of prognosis and therapeutic responses in patients with pancreatic cancer. *PLoS One* 14, e0227366.

Waters AM and Der CJ (2018) KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a031435.

Yu W, Hurley J, Roberts D, Chakraborty SK, Enderle D, Noerholm M, Breakefield XO and Skog JK (2021) Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. *Ann Oncol* 32, 466-477.

Zhang F, Zhong W, Li H, Huang K, Yu M and Liu Y (2021) TP53 Mutational Status-Based Genomic Signature for Prognosis and Predicting Therapeutic Response in Pancreatic Cancer. *Front Cell Dev Biol* 9, 665265.

Zhang Y, Yao Y, Xu Y, Li L, Gong Y, Zhang K, Zhang M, Guan Y, Chang L, Xia X, et al (2021) Pan-cancer circulating tumor DNA detection in over 10,000 Chinese patients. *Nat Commun* 12, 11.