# 血漿中の遊離DNA(リキッドバイオプシー)を 用いたがんゲノムプロファイリングについて

日本大学医学部病態病理学系臨床検査医学分野教授 中山智祥 第22回 日本医療検査科学会遺伝子プロテオミ

クス技術セミナー講演会

日時:2021年10月8日(金)

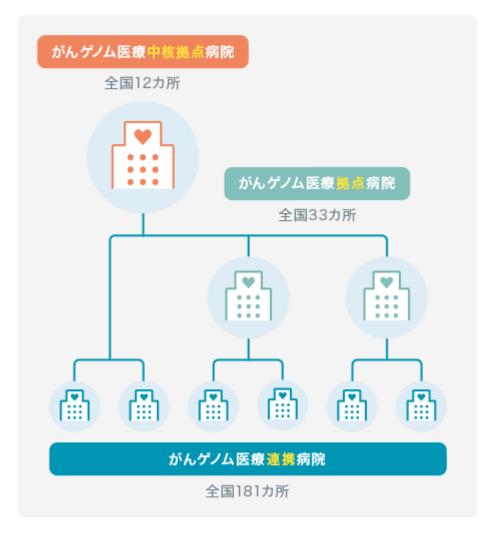
会場:パシフィコ横浜 (第6.7会場 303.304号室)

# 本日お話しする内容

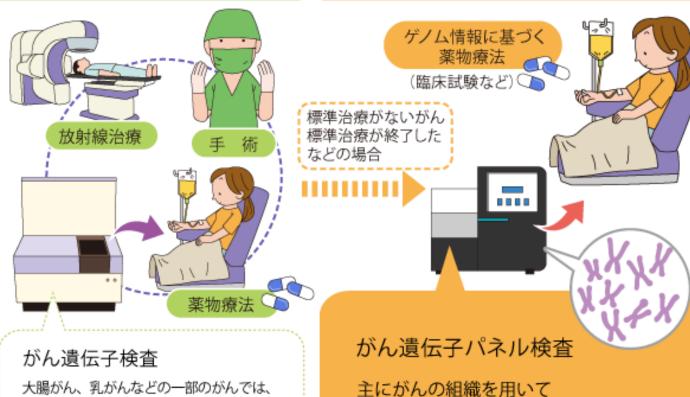
- I. がんゲノム医療とがんゲノムプロファイリング検査について
- II. 血漿中の遊離DNA(cfDNA)と血中循環腫瘍DNA(ctDNA)について
- III. ctDNAを検出するがんゲノムプロファイリングの特徴
- IV. 「FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル」の経験例

# わが国のがんゲノム医療の体制

2021年8月現在







大腸がん、乳がんなどの一部のがんでは、 医師が必要と判断した場合に、1つまたは いくつかの遺伝子を調べ、診断したり、 検査結果を基に薬を選んで治療したり することがすでに行われています。

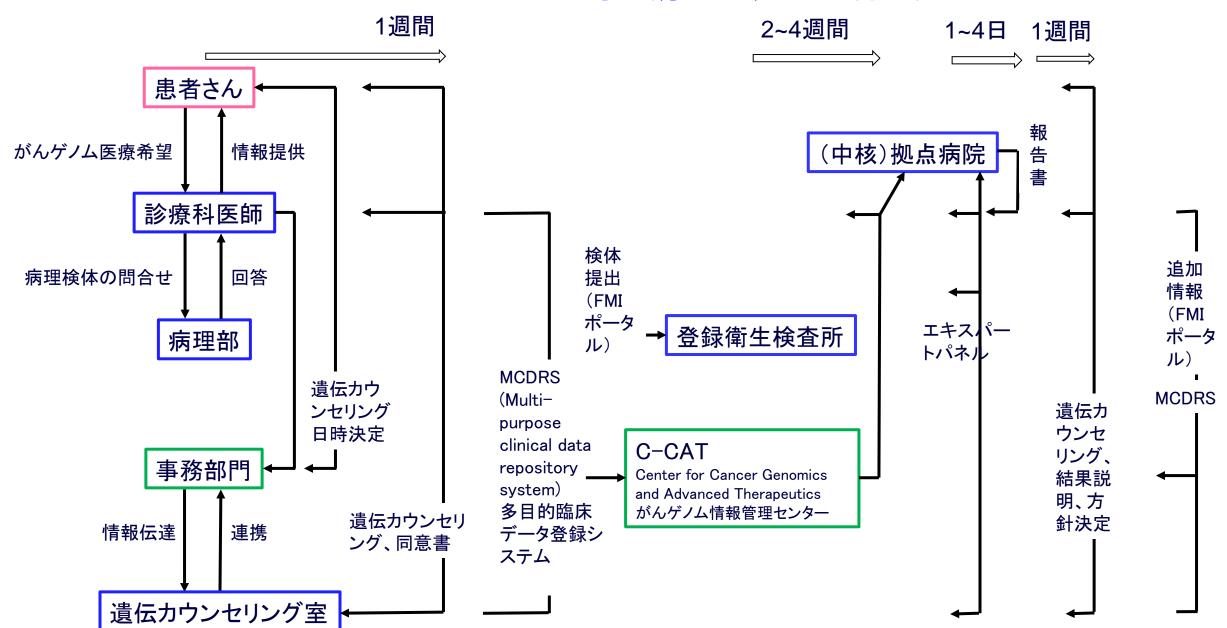
多数の遺伝子を同時に調べ、検査結果を

がんゲノム医療

基に治療できることがあります。

# I.

# がんゲノム医療の流れ(例)



# ドライバー遺伝子とパッセンジャー遺伝子

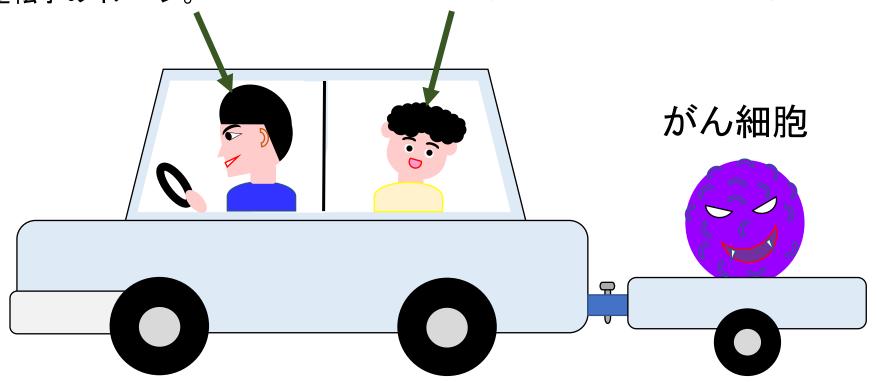
# ドライバー変異

がんの発生・進展において直接的に重要な役割を果たす遺伝子変異。がん遺伝子・がん抑制遺伝子などに起こる。 暴走する運転手のイメージ。

# パッセンジャー変異(バリアント)

がんの発生に無関係な遺伝子にランダムに 起こるバリアント。 がんの発生過程ではゲノ ム不安定性となるため。

乗客のように便乗しているイメージ。



多くのがんに関連している遺伝子を調べるがんゲノムプロファイリング検査ではドライバー変異とパッセンジャーのバリアントが見出されることがある。

# 【がんゲノムプロファイリング検査比較】

١.							
		ファウンデーションワン	NCCオンコパネル				
	·····································	腫瘍組織(FFPE)	腫瘍組織(FFPE)と <mark>末梢血</mark>				
	検査遺伝子・バリアント	<mark>324個</mark>	<mark>124個</mark>				
	生殖細胞系列遺伝子バリアント解析	なし	。 あり				
	TMB(腫瘍遺伝子変異量)解析	あり	あり				
	MSI(マイクロサテライト不安定性)解析	<mark>あり</mark>	なし				
1	————————————————————— 判定基準						
	SNV(一塩基バリアント)	変異アレル頻度(VAF)5%以上	変異アレル頻度(VAF)5%以上				
	InDel(挿入·欠失)	変異アレル頻度(VAF)5%以上	変異アレル頻度(VAF)5%以上				
	増幅	コピー数6以上	コピー数8以上				
	融合	リードペア5以上(既知は3以上)	変異アレル頻度(VAF)3%以上				
	TMB	SNV, InDel数/Mb	SNV, InDel数/Mb				
1	MSI	95個のマイクロサテライトで判定	なし				
	検体の条件						
	未染色スライド枚数	10枚	5枚				
	スライドの厚さ	$4-5~\mu\mathrm{m}$	10 μm				
	組織切片表面の面積	25 mm <sup>2</sup> 以上	16 mm² 程度				
	全血	実施しない	2 mL以上				
	全血の採血管		EDTA-2K入り				

# II.

# 【Cell free DNA (cfDNA)とは】

- cfDNAとは分解され血漿に放出されたDNAフラグメント(50~200 bp)のことを言う。
- 半減期は1時間以下。
- 多くは、血球系細胞の死滅に由来するDNAで、健常人にも存在する。
- がん細胞が免疫によって破壊されたり、自ら細胞死(アポトーシス)をおこしたり、血中に漏れ出した循環腫瘍細胞(CTC)が血中で破壊るとctDNA (circulating tumor DNA)が検出される。
- 母体のcfDNAから胎盤由来(胎児)の遺伝子を解析し、21トリソミー(Down 症)や18トリソミー(Edward症候群)、13トリソミー(Patau症候群)の診断は non-invasive prenatal genetic testing(NIPT)非侵襲的出生前遺伝学的検査 が臨床応用されている。



# 【cfDNA、ctDNAの関係性】

Circulating free DNA (Cell free DNA: cfDNA)

血漿

リキッドバイオプシー

低侵襲又は非侵襲的に血・ 液や体液を採取して得た 腫瘍検体の解析

(例:細胞、核酸) 検体は尿、便、唾液、髄 液など

Wan JCM, et al. Nat Rev Cancer. 2017.

多くは健常時の血球系細胞の死滅に由来するDNA 腫瘍 母体血中胎盤由来

Circulating tumor DNA: ctDNA

圧挫症候群、

火傷

敗血症

心筋梗塞

移植片拒絶 反応

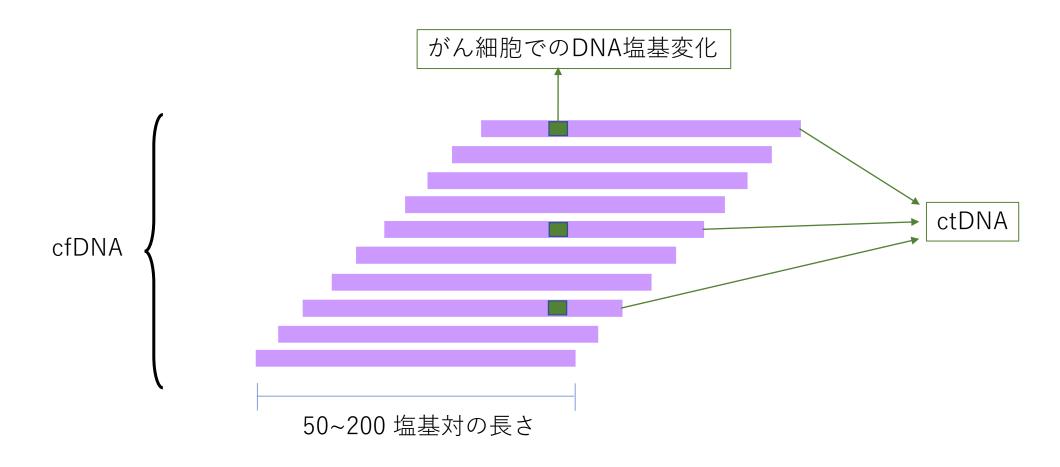
cfDNA解析による胎

児の染色体検査

non-invasive prenatal genetic testing (NIPT) 非侵襲的出生前遺伝学的検査



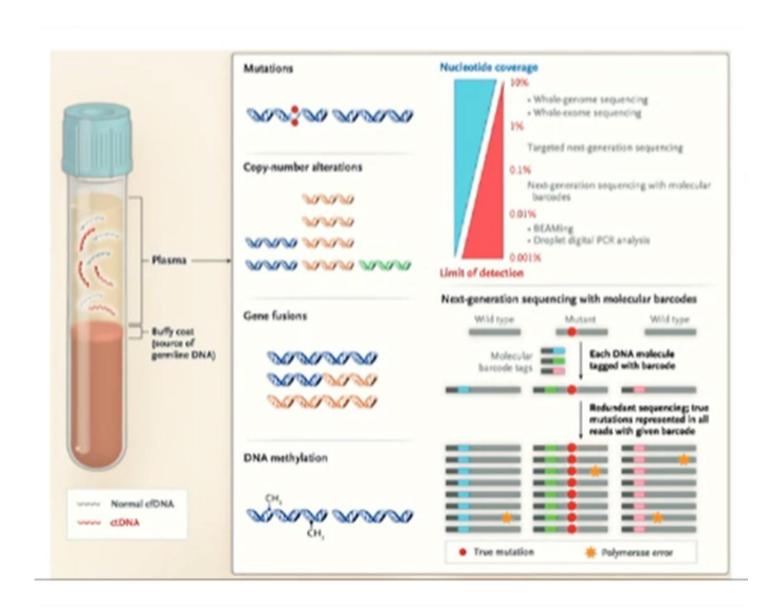
# Cell free DNA (cfDNA)の中でctDNA検出



Variant allele frequency (VAF) = 3 ÷ 10 = 30%

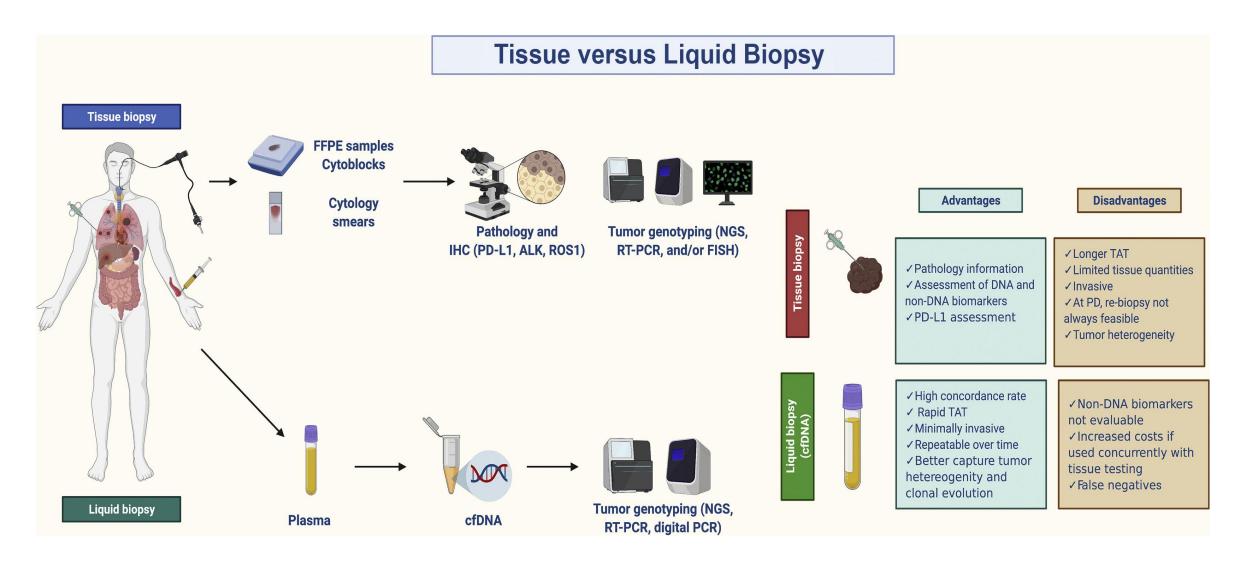


Corcoran RB, Chabner BA: Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. N Engl J Med 2018;379:1754-1765.





## 組織診 vs. リキッドバイオプシー





# 組織診 vs. リキッドバイオプシー 長所と短所

Rolfo C et al. J Thorac Oncol 2021; S1556-0864(21)02284-X

# 組織診

# リキッドバイオプシー

### デメリット

# 侵襲的

## 所要時間が長い

病態進行の癌で再生検が可能とは限らない。限られた組織量

腫瘍が不均一であること。

# ⇔ 低侵襲性。初診時にも可能

⇔ 所要時間が短い

メリット

- ⇒ 時間の経過とともに繰り返し可能。腫瘍の クローンの進化を捉える
- ⇔ 腫瘍の不均一性を把握

### メリット

### 病理学的情報が得られる。

DNAはもとよりその他のバイオマーカーの評価ができる。PD-L1の評価ができる。

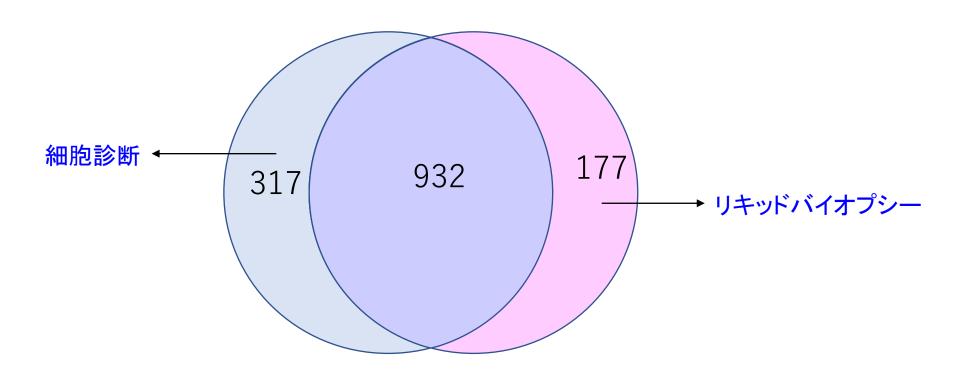
### デメリット

- ⇔ DNA以外の情報が得られない
- ⇒ DNA以外のバイオマーカーが評価できない

偽陰性(腫瘍排出)が起こり得る。



# 組織診 vs. リキッドバイオプシー 検出されたバリアント数 (28癌種)



一致率=74.6%

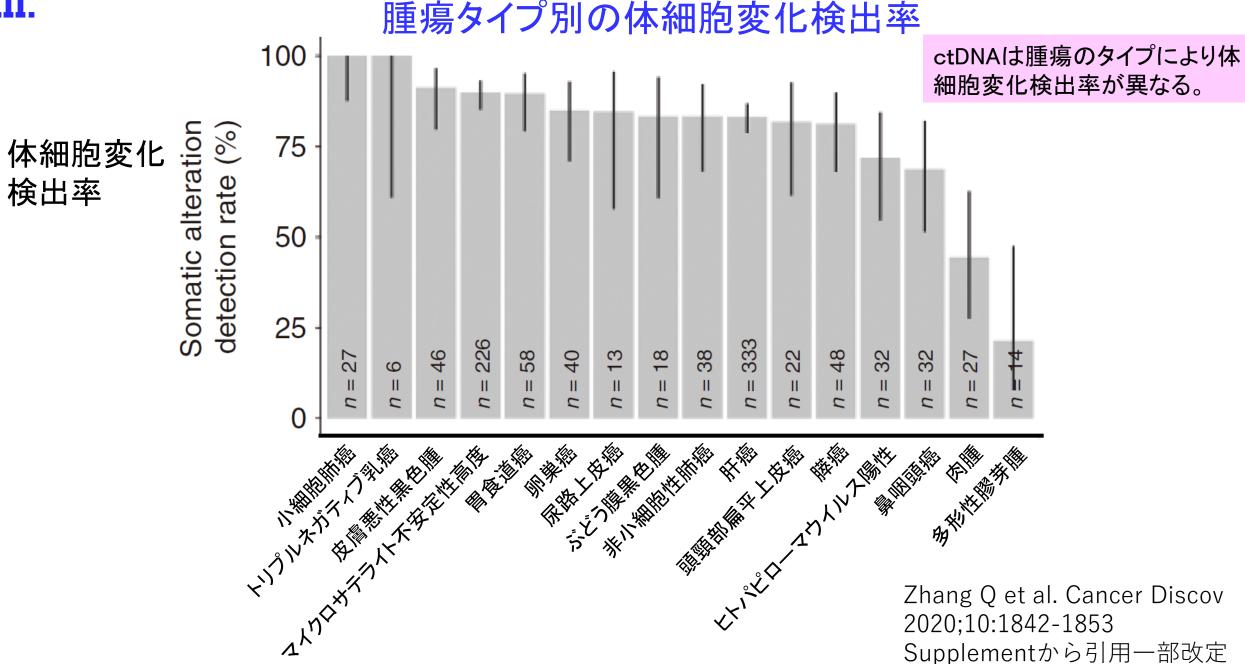
Shu Y et al. Sci Rep 2017;7:583



# 【circulating tumor DNA (ctDNA)検出の特徴】

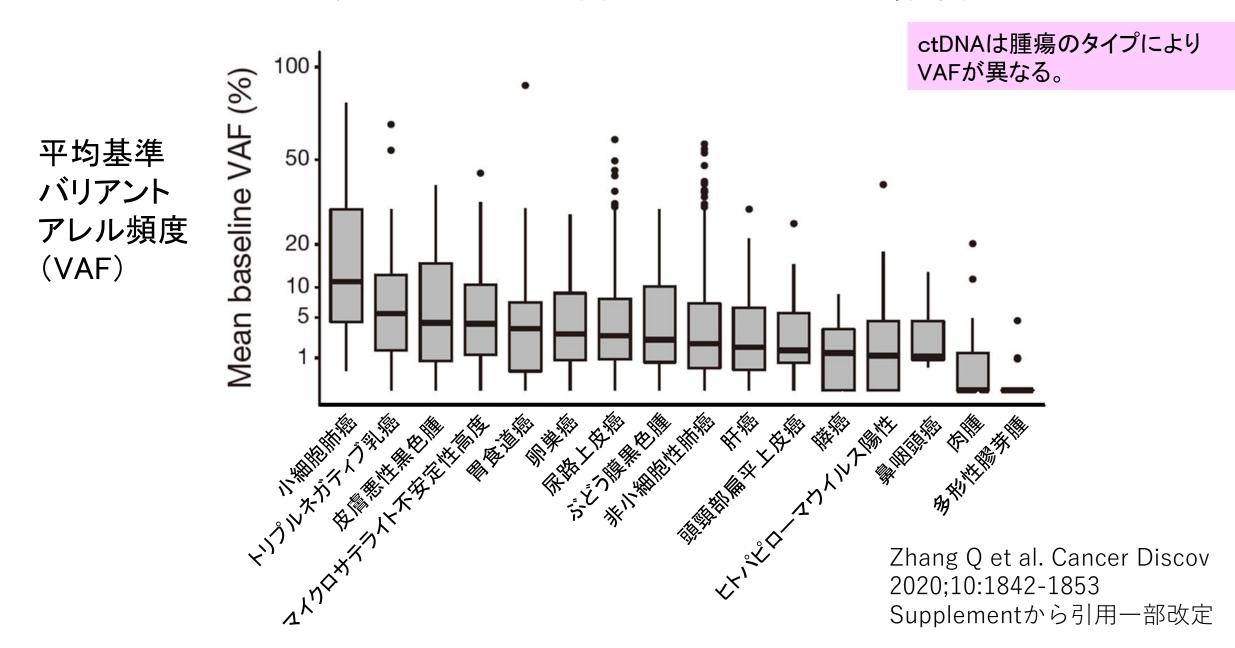
- ctDNA量はがんの種類によって異なる。低いのは中枢神経原発腫瘍、中皮腫、腎癌、甲状腺癌。
- ◆体細胞変化の検出率はがんの種類によって異なる。低いのは多形性膠芽細胞腫(脳)、肉腫、膵癌、HPV+のもの(Zhang Q et al. Cancer Discov 2020;10:1842-1853)。
- Variant allele frequency (VAF)はがんの種類によって異なる。低いのは多形性膠芽細胞腫(脳)、肉腫、鼻咽頭癌、HPV+のもの(Zhang Q et al. Cancer Discov 2020;10:1842-1853)。
- VAFの中央値は2.4%であった(Zhang Q et al. Cancer Discov 2020;10:1842-1853)。
- ●標的病変の直径(腫瘍量)が大きいほどctDNA検出は高かった、







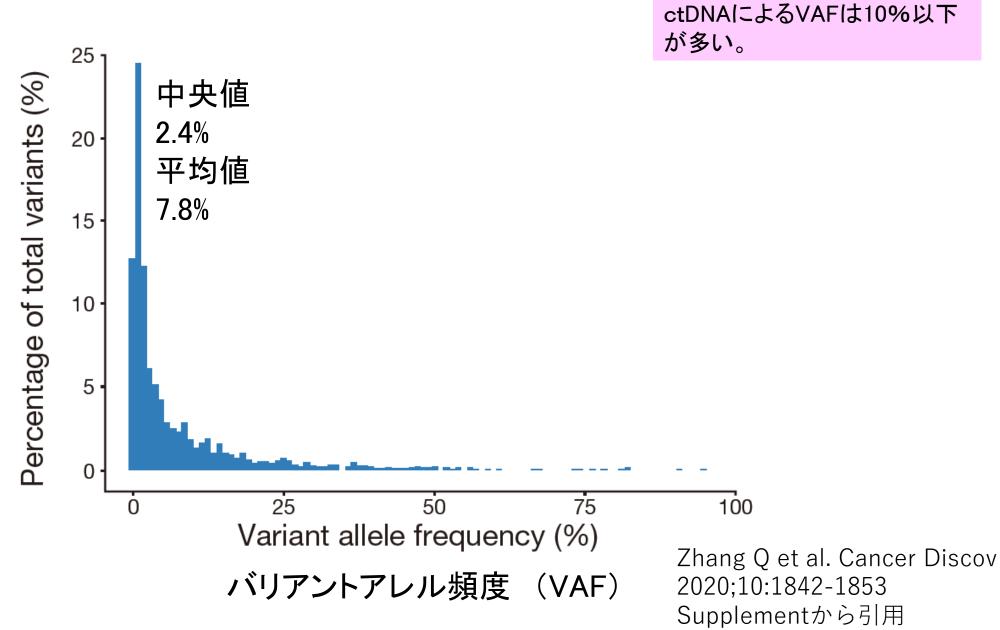
# 腫瘍タイプ別の治療前バリアントアレル頻度



# Ш.

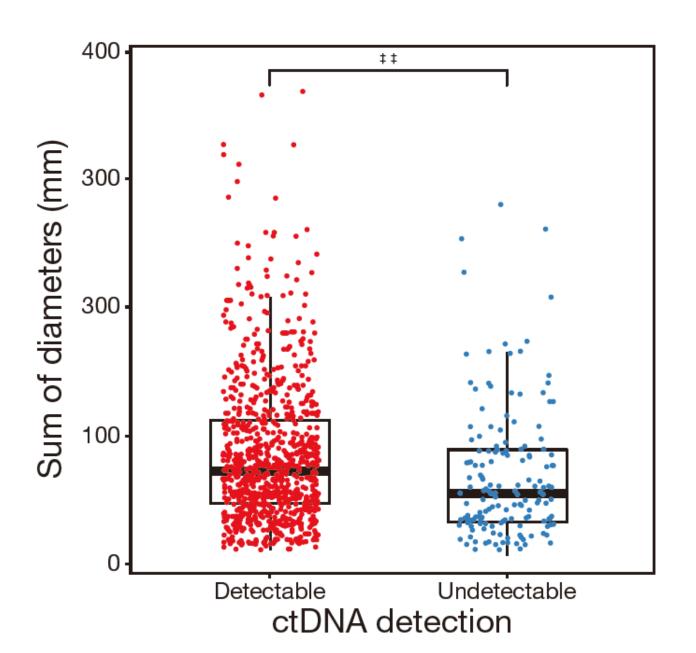
# バリアントアレル頻度による総バリアントの割合







# ctDNAが検出された者と検出されない者の腫瘍量径

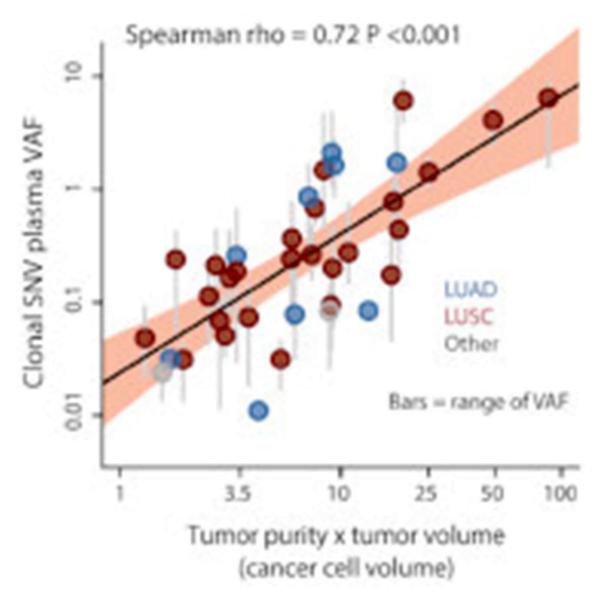


腫瘍径が大きいとctDNAは検 出されやすい。

Zhang Q et al. Cancer Discov 2020;10:1842-1853 Supplementから引用



# クローン血漿VAFに対応する癌細胞体積



Abbosh C et al. Nature. 2017; 545(7655): 446– 451.

平均クローンVAFは腫瘍体積×腫瘍純度(癌細胞体積)と相関し、n = 37であった。影付きの赤い背景は、95%の信頼区間を示している。



# 【Circulating tumor DNA (ctDNA)検出の弱点など】

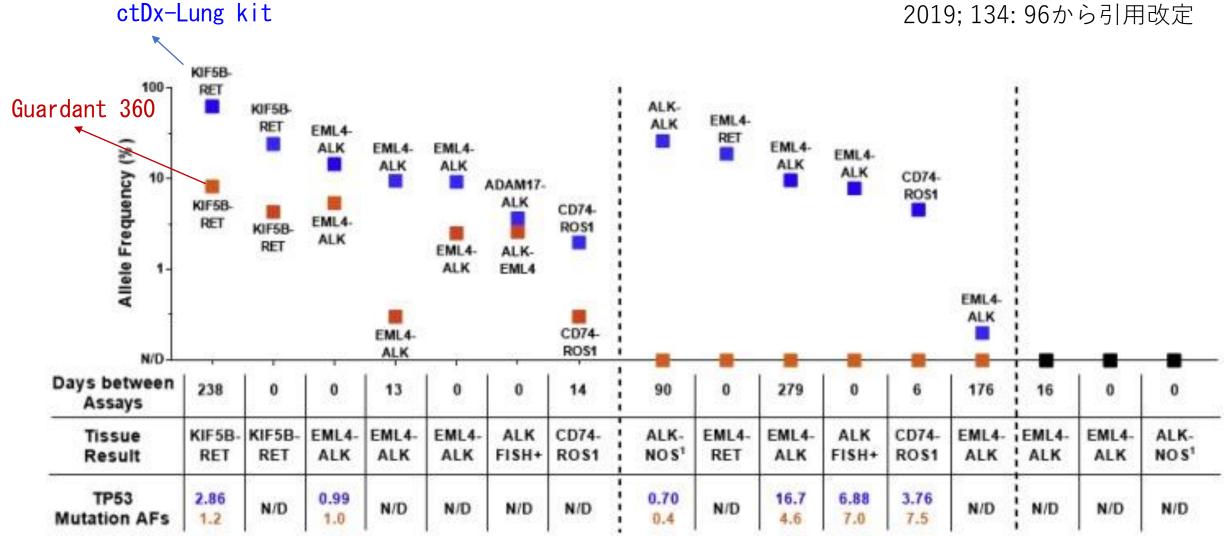
- KitによってはALKなどの融合遺伝子を検出率が低いかもしれない(Supplee JG et al. Lung Cancer 2019; 134: 96)
- コピー数増幅の検出率は低いかもしれない(Clark TA et al. J Mol Diagn 2018;20:686)。
- ctDNAを用いたマイクロサテライト不安定性(MSI)の検出率は組織を用いるものと遜色ない(Willis J et al. Clin Cancer Res 2019;25:7035)。



# 融合遺伝子におけるKet間の不一致 (16例での検討)

### 融合遺伝子の検出率は低い。

Supplee JG et al. Lung Cancer 2019; 134: 96から引用改定



*TP53*の変異アレル頻度

# バリアントごとの検出率

コピー数増幅の検出率は低い。

		感度		陽性適中率	<u>K</u>			
		Sensitivity,	%	PPV, %				
Variable	MAF, %	Value	95% CI	Value	95% CI			
Base substitutions	≥0.5	99.3	99.1-99.4	100	>99.9-100			
塩基置換	0.25-0.5	95.7	94.9-96.4	100	99.8-100			
	0.125-0.25	70.0	68.3-71.6	99.9	99.8-100			
Indels	≥0.5	98.5	97.3-99.2	100	99.4-100			
挿入•欠失	0.25-0.5	86.6	81.4-90.5	100	97.8-100			
	0.125-0.25	68.5	62.1-74.3	100	97.1-100			
Re-arrangements	≥0.5	100	77.1—100	100	77.1-100			
再構成	0.25-0.5	100	56.1-100	100	56.1-100			
	0.125-0.25	80.0	29.9-99.0	100	39.6-100			
CNAs*	≥20% ctDNA fraction	95.3	82.9-99.%	97.6	85.9-99.9			
コピー数増幅	<20% ctDNA fraction	Varies depe	ending on					
		amplitude of CNA and						
		ctDNA fraction						
Reproducibility		100%, Inte	rbatch precision					
再現性		100%, Intrabatch precision						

Clark TA et al. J Mol Diagn 2018;20:686 から一部改定



# MSIの検出方法別の検討

cfDNAのMSIは信頼性が高い。

		組織
結果が一致		陰性
したもの		陽性
結果が不一		陽性
対のもの		陰性
	•	

組織	cfDNA	PCR	次世代シー クエンサー	免疫組織化 学染色
陰性	陰性	408	226	78
陽性	陽性	42	13	15
陽性	陰性	11	5	14
陰性	陽性	1	0	5
	Total	462	244	112

Willis J et al. Clin Cancer Res 2019;25:7035改定



D006-19 がんゲノムプロファイリング検査

(1) 「1」 <mark>検体提出時については</mark>、固形腫瘍の腫瘍細胞又は<mark>血液を検体とし</mark>、100以上のがん関連遺伝子の変異等を検出するがんゲノムプロファイリング検査に用いる医療機器等として薬事承認又は認証を得ている次世代シーケンシングを用いて、包括的なゲノムプロファイルの取得を行う場合に、患者1人につき1回(以下のイの場合については2回)に限り算定できる。ただし、血液を検体とする場合については、以下に掲げる場合にのみ算定できる。

ア医学的な理由により、固形腫瘍の腫瘍細胞を検体としてがんゲノムプロファイリング検査を行うことが困難な場合。この際、固形腫瘍の腫瘍細胞を検体とした検査が実施困難である医学的な理由を診療録及び診療報酬明細書の摘要欄に記載すること。

イ 固形腫瘍の腫瘍細胞を検体として実施したがんゲノムプロファイリング検査において、<mark>包括的なゲノムプロファイルの結果を得られなかった場合</mark>。この際、その旨を診療録及び診療報酬明細書の摘要欄に記載すること。

(2)~(11)(略)

# 「FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル」の経験例

2021年8月1日、「FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル」が保険適用となった。





No.2021-67 新規 2021年8月

#### 新規実施項目のお知らせ

謹啓 時下ますますご清栄のこととお喜び申し上げます。

平素は格別のご高配を賜り厚くお礼申し上げます。

このたび、下記の検査項目を新たに受託開始いたしますので、ご利用いただきたくご案内

当社におきましては皆様のご要望に幅広くお応えすべく研鑚を重ねてまいりますので、 今後とも引き続きお引き立てのほどよろしくお願い申し上げます。

敬白

記

2021年8月2日(月)ご依頼分より

#### ■新規項目内容

項目コード	検査項目	検体量	容器	保存 (安定性)	所要 日数	実施料 判断料	検査 方法	備考
86078	FoundationOne Liquid CDx がみプノム プロファイル 80016-9657-019-966	17mL セルフリーDNA 抽出用採血管 8.5mL×2本	PCD	室温	12~15	56,000 点 ※2	次世代シー クエンス (NGS) 法	東重 東結保存は難けください。 他項目との重複な類は選けてください。 い。 本核面方法ではコンタミネーションの 影響がより大きくなりますので、様々 実際にあたっては歌り扱いに充分ご注 悪ください。 製定および保持が大いによっては所要日 数が変わる場合があります。 & 2.5 & 2.5 & 3.5 & 3.5 & 5.5 & 5.5

※:遺伝子関連・染色体検査判断料 &シ:Foundation Medicine, Inc.

#### ≪FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル≫

本検査は、固形がん患者の全血から分離した血漿から抽出した遊離DNA(cfDNA)の遺伝子変異情 報(データ)を解析するプログラムです。本検査を用いた包括的ながんゲノムプロファイリング検査 では、がんの診断又は治療に関連する324遺伝子の変異等(塩基置換、挿入/欠失、再編成)の検出 結果の一括取得が行えます。本品による包括的ゲノムプロファイリング検査の出力結果は、固形がん 患者の診断及び治療方針決定の補助 として用いられます。また、本検査には複数の遺伝子変異等につ いて、特定医薬品の適応の判定補助(コンパニオン診断、CDx)が行える機能があります。 ※対象遺伝子および医薬品については添付文書を参照ください。

株式会社 エスアールエル





#### ▼検査要項

検査項目名	FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル
項目コードNo.	86078
検体量	17mL(セルフリーDNA 抽出用採血管 8.5mL×2本)
路容	PCD
保存方法	室温
所要日数	12~15日
検査方法	次世代シークエンス(NGS)法
保険点数	実施料: 56,000点 (D006-19 がんゲノムプロファイリング検査) 1 検体提出時: 8,000 点 2 結果説明時: 48,000 点 判断料: 100点 (遺伝子関連・染色体検査判断料) 医薬品の適応判定の補助を目的として使用する場合はそれぞれの準用技術料 (2,100~20,200点) を算定する。 本検査については、以下に掲げる場合にのみ算定できる。 ア 医学的な理由により、固形継瘍の腫瘍細胞を検体としてがんゲノムプロファイリング検査を行うことが困難な場合。この際、固形腫瘍の腫瘍細胞を検体とした検査が実施困難である医学的な理由を診療録及び診療報酬明細書の摘要欄に記載すること。 イ 固形腫瘍の腫瘍細胞を検体として実施したがんゲノムプロファイリング検査において、包括的なゲノムプロファイルの結果を得られなかった場合。この際、その旨を診療録及び診療報酬明細書の摘要欄に記載すること。

#### ▼専用容器



●提出の際の留意事項

- ・必ず専用容器「セルフリーDNA 抽出用採血管」を使用してご提出ください。 専用容器以外での受託はできません。
- ・採血管には、必ず専用ラベルを貼付していただき、依頼番号、患者生年月日、 検体採取日を記載してください。専用ラベルが貼付されていない場合は、受託で
- ・採血管の使用期限が必ず見えるように専用ラベルを貼付してください。採血管 の使用期限が確認できない場合は受託できません。
- ・必ず2本ご提出ください。2本以外での受託はできません。
- 原則、採血した日にご出検ください。

Ryan Woodhouse et al.: PLoS One 15(9): e0237802, 2020 (検查方法参考文献) Russell Madison et al.: Lung Cancer Oct:148:69-78, 2020 (臨床的意義参考文献)

> https://www.srlgroup.co.jp/assets/pdf/n ews/testing/2021-67.pdf

# IV.

# 所要日数(自施設経験例)

	FoundationOne	NCCオンコパネル	FoundationOne Liquid
	n=25	n=2	n=1
出検してから結果が到着する までの日数	12.8	14.0	9
最長日数 最短日数	34 9	17 11	9
案内書記載	16 <b>~</b> 19	16~22	12 <b>~</b> 15

遺伝カウンセリングを実施した直後に採血も可能。

ご清聴ありがとうございました。