（肺癌．2017;57:733-738）
© 2017 The Japan Lung Cancer Society

INVITED REVIEW ARTICLE

リキッドバイオプシーに関する現状と展望

西尾和人[1]・冨樫庸介[2]・坂井和子[1]

The Liquid Biopsy: Its Present and Future

Kazuto Nishio[1]; Yosuke Togashi[2]; Kazuko Sakai[1]

[1]Department of Genome Biology, Kindai University Faculty of Medicine, Japan; [2]Exploratory Oncology Research & Clinical Trial Center, National Cancer Center Hospital Kashiwa, Japan.

ABSTRACT —— Cell free DNA, circulating tumor cell, and exosomes are collectively called liquid biopsy. The detection of molecular abnormalities in a liquid biopsy is a low-invasive technique that allows us to perform analyses and monitoring multiple times. Digital polymerase chain reaction and next-generation sequencing have improved the sensitivity and multiplicity of liquid biopsy analyses. Efforts to improve the detection of low-frequency mutation alleles further are now underway. Biological understanding of the cell free DNA with regard to aspects such as gene transfer and immune reactions have led to the development of cancer treatment regimens using liquid biopsies. In the clinical setting of lung cancer patients, serum *EGFR* mutation kits are available to identify patients indicated for third-generation EGFR-tyrosine kinase inhibitors. Liquid biopsies may eliminate the sampling bias caused by tumor heterogeneity and bring a paradigm shift to the adaptive treatment of lung cancer.

(*JJLC*. 2017;57:733-738)

KEY WORDS —— Liquid biopsy, Cell free DNA, Circulating tumor cell, Exosome, *EGFR* T790M

Corresponding author: Kazuto Nishio.

要旨 —— 血中循環腫瘍細胞，血中遊離 DNA，エクソソームなどの，主に血液由来の液性検体はリキッドバイオプシーと総称される．これらを用いた，腫瘍由来 DNA の分子異常の検出は，低侵襲であり複数回の実施が可能であるため，治療選択，モニタリング，proof of concept のために期待される．デジタル PCR，次世代シーケンサーの登場により，高感度，マルチ解析が可能となり，実用化が近づいた．また低頻度変異アレル検出のための技術革新が進行中である．血中遊離 DNA は，遺伝子導入，免疫への作用などの生物学的な働きも明らかになりつつあり，これらの知見は癌治療への応用へとつながる．肺癌領域では，血漿サンプルによる *EGFR* 遺伝子変異検査が追加承認され，実用化された．リキッドバイオプシーは，腫瘍不均一性によるバイアスを克服する手段として期待される．今後はリキッドバイオプシーを用いたモニタリングにより，adaptive treatment へのパラダイムシフトが訪れる．

索引用語 —— リキッドバイオプシー，血中遊離 DNA，血中循環腫瘍細胞，エクソソーム，*EGFR* T790M

はじめに

血中循環腫瘍細胞（circulating tumor cell，CTC），血中遊離 DNA（cell free DNA，cfDNA），エクソソームは，リキッドバイオプシーの主要な material である．エクソソームには siRNA，RNA，糖鎖，タンパク質などが含まれる．また，尿，唾液，胸水などの液性検体も，リキッドバイオプシーの範疇に含まれる．これまでに，臨床的有用性などの観点から，CTC，cfDNA，エクソソームのいずれが有用かという議論が続いてきた．最近 Kawamura らは，精製したエクソソームを DNase 処理することにより DNA は消失するが，RNase 処理により RNA

[1]近畿大学医学部ゲノム生物学；[2]国立がん研究センター先端医療開発センター．
論文責任者：西尾和人．

は消失しないことから，エクソソームの外側にcfDNAが付着し，エクソソームと同一空間に存在していることを示した.[1] 近年，エクソソームやcfDNA中の血中無細胞腫瘍DNA（circulating tumor DNA，ctDNA）の研究は大きな広がりを見せている．ここでは，リキッドバイオプシー検体の生理学的，生物学的意義と癌の病態における役割，バイオマーカーとしての臨床的有用性について概説する．

Circulating tumor cell

癌患者の血液中にCTCが存在することは広く知られている．CTCの血中の存在様式については，single cellとして存在する場合や，クラスターを形成した状態で循環している場合，また細胞膜が破壊され，裸核として存在するような場合が確認されている．癌種によりCTCの数は大きく異なり，乳癌，前立腺癌などにおいては比較的多数検出されるが，非小細胞肺癌においては，IV期であっても多くはない．一方小細胞肺癌においては，CTCは比較的多く検出されるとされている.[2] CTC中のRNAは比較的安定に存在するため，去勢抵抗性の前立腺癌におけるホルモン療法の効果予測分子として，アンドロゲンレセプターのスプライシングバリアント7の発現が注目されている.[3] また，腫瘍組織を用いた検査のサロゲートとして，乳癌におけるCTC-HER2 FISHなどが試みられてきた．最近では，免疫チェックポイント阻害薬のサロゲートマーカーとして，CTC-PD-L1免疫染色が報告され，[4,5] CTCの存在様式の特徴を生かしたバイオマーカーのアプローチが進んでいる．

Cell free DNA

ヒトの血液中に無細胞核酸断片が存在することは，1948年にMandelらにより報告された.[6] 健常人血中のcfDNA濃度は1～10 ng/mlであるが，癌患者血清ではcfDNA濃度が上昇していることが示されている.[7,8] 癌以外の病態でも，急性外傷，脳梗塞，運動，移植，感染症，手術，最近では肝動脈化学塞栓術によりcfDNA濃度が上昇することが報告されている.[9] 健常人ではcfDNAの大半が造血細胞から放出される．癌患者においては，cfDNAに腫瘍細胞由来のDNA断片が含まれており，これをctDNAと呼ぶ．

Cell free DNAの生物学的特性

cfDNAは，アポトーシス，能動分泌，壊死により腫瘍細胞などから放出され，末梢血，尿，脳脊髄液，胸膜，唾液などの液性検体に存在する．健常人ではcfDNAの大半は造血細胞に由来し，激しい運動で放出される．cfDNAの半減期は16分～2.5時間であり，その消失のメカニズムは，ヌクレアーゼ，腎尿中排泄，肝・脾への取り込み後，マクロファージによる分解による．また，細胞膜，細胞外小胞，タンパク質との結合によりcfDNAが安定化する．これらのことから，cfDNAは腫瘍のリアルタイム「スナップショット」といえる．

血中を遊離するcfDNAは断片化しており，その断片長は病態により異なっている．シーケンスに基づく詳細な検討では，cfDNAの最大ピークは166 bpであり，ヌクレオソームに巻き付いたDNAとhistone H1に結合したリンカーDNAの和に相当する.[10] 癌患者の血中に存在する腫瘍細胞由来のctDNAでは，特に変異を有するctDNA断片がcfDNAより短いことが知られている．担癌ラットモデルにおいて，検出されるctDNAの長さは134～144 bpと短い．また，胎児cfDNAは母体cfDNAよりも短く，移植患者の非造血器由来cfDNAも短い．逆に，1,000 bpを超える長いcfDNAの存在も知られており，これはエクソソームとの結合により血中に存在すると考えられている．

Cell free DNAの生理学的・生物学的作用

cfDNAは血中でどのような生物学的作用を有するのだろうか．cfDNAは，外因性DNA断片のセンサーとして機能し，免疫細胞の多い組織に発現するToll様受容体9（TLR9）のリガンドであると報告されている．肥満マウスを用いた検討において，脂肪細胞の変性が生じる際に放出されるcfDNAにより，TLR9が活性化し，マクロファージの集積，続いて，脂肪組織の炎症・インスリン耐性を誘発することが示され，[11] cfDNAが免疫調節の役割を担う可能性が示唆されている．

また，ctDNAが核DNAやミトコンドリアDNAに組み込まれる作用も示唆されている．マウス胎児皮膚細胞株（NIH3T3細胞）に*KRAS*変異陽性大腸癌患者の血漿を添加すると，腫瘍細胞が混入しないように隔離したにもかかわらずNIH3T3細胞の形質転換が引き起こされたとの報告がある.[12] また，ctDNAが非相同末端結合を介し，レシピエント細胞の核DNAやミトコンドリアDNAに組み込まれたとの報告もある.[13] これらの結果は，cfDNAが遺伝子やDNAの水平伝播を仲介する可能性を示唆している．

癌の病態とcirculating tumor DNA

ctDNA濃度は，腫瘍の大きさやステージに関連が認められる．640例の様々な癌種の検討によると，IV期のctDNA濃度はI期の100倍高いことが報告されている.[14] 我々の検討では，進行非小細胞肺癌患者の血漿中ctDNA濃度は，約4,000 copies/2 mlであった.[15] 一方，比較的早期（I～IIIA期）の肺癌患者では，そのctDNA

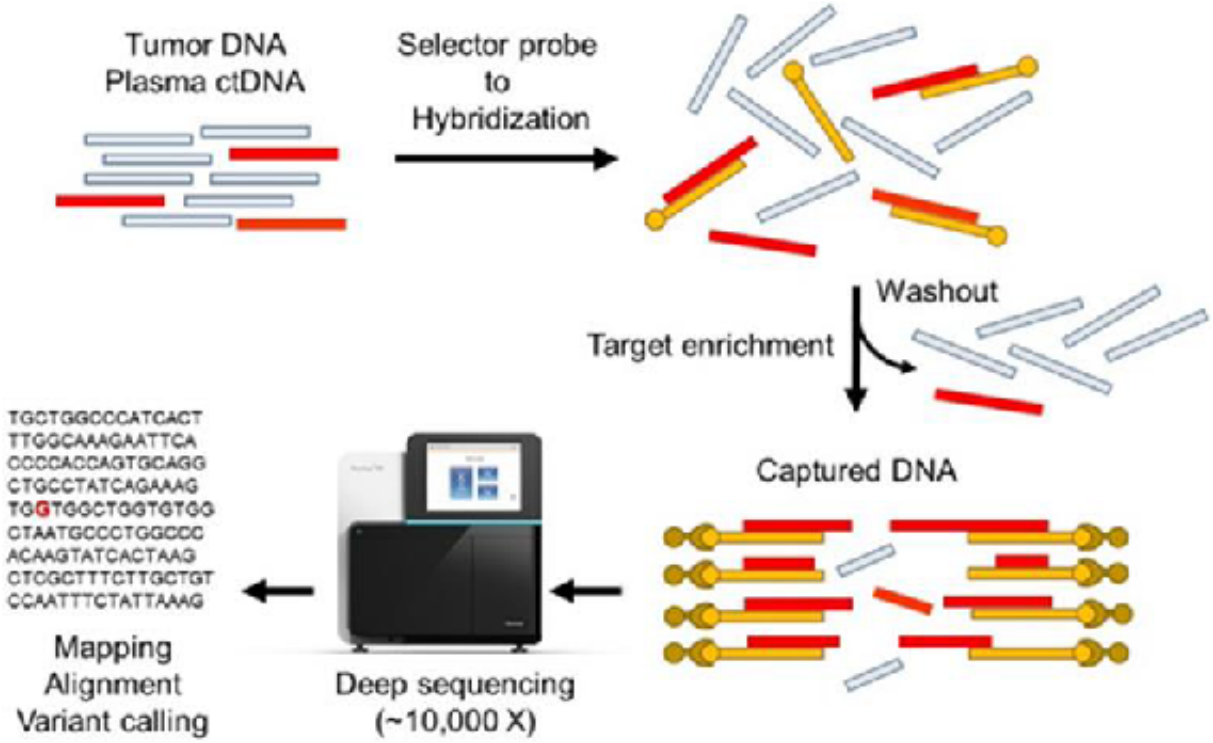

Figure 1. Work flow of CAPP-Seq.

の量は少量で，デジタル PCR，次世代シーケンサー（NGS）による遺伝子変異検出率は非常に低かった．その臨床病理学的因子の解析から，非小細胞肺癌においては，遺伝子変異検出率は腫瘍の大きさに相関することが示された．[16] また，腫瘍血管新生と ctDNA との関連性も検討されている．血管新生が活発でない腫瘍では ctDNA 放出が少なく，低酸素で ctDNA 放出が増加する．原発性脳腫瘍患者の ctDNA 濃度は血漿中で低く脳脊髄液で高いことから，血液脳関門が移動を妨げていると推察される．

検出機器の発展

Vogelstein と Kinzler によるデジタル PCR の登場により，遺伝子変異の絶対定量と超高感度検出が可能となった．[17] また，並行して開発されてきた NGS 技術を用いて，ultra-deep sequencing により読み取り回数を大幅に増やすことで，血中での遺伝子変異検出が可能であることが示されている．[18] NGS は，マルチプレックス検出に強みを持つものの，検出感度でデジタル PCR に遅れをとっていたが，分子バーコード法などの技術開発により高感度化が進んでいる．ハイブリッドキャプチャー法による CAPP-Seq 法は，ctDNA の網羅的変異解析法として実用化され，遺伝子変異に加えて Indel（挿入欠失），融合遺伝子，コピー数変化をも同時に検出でき，その検出感度は理論上，0.004% に達する（Figure 1）．[19] NGS を用いることにより，血漿中の ctDNA における全ゲノム領域の解析，染色体レベルの異常，[20,21] 遺伝子再構成と幅広い検出が可能であり，デジタル PCR による絞られた遺伝子変異部位の効率的な高感度検出と使い分けることにより，リキッドバイオプシーの分子プロファイリングとモニタリングの研究が進められている．

Cell free DNA による早期診断は可能か？

癌診断時より（最長で）2 年前に採取した唾液および血漿中に変異が検出されたとの報告がある．[22] また，肺癌患者においては，CAPP-Seq 法を用いた高感度検出法により I 期の 50% で ctDNA が検出可能であったことが報告されている．[19] これらのことから，cfDNA による癌の早期診断の可能性が考えられるが，実現にはリキッドバイオプシーの技術的課題の解決が必要となる．一般に，遺伝子変異のアレル頻度が低いと，サンプリングノイズのために対象とする変異が検出できない可能性が増す．数千コピーしか含まれない数 ml の血漿を用いた解析においては，分析感度が 0.1%（1/1,000）を超えても感度上のベネフィットは得られない．すなわち，検査に供するインプット DNA 量が検出感度，検出率を規定すると考えられる．ctDNA の回収率を上げるために，海外では，cfDNA（CTC も含めて）の採取，処理，抽出に関するプレアナリシス段階の工夫が試みられている．大量の

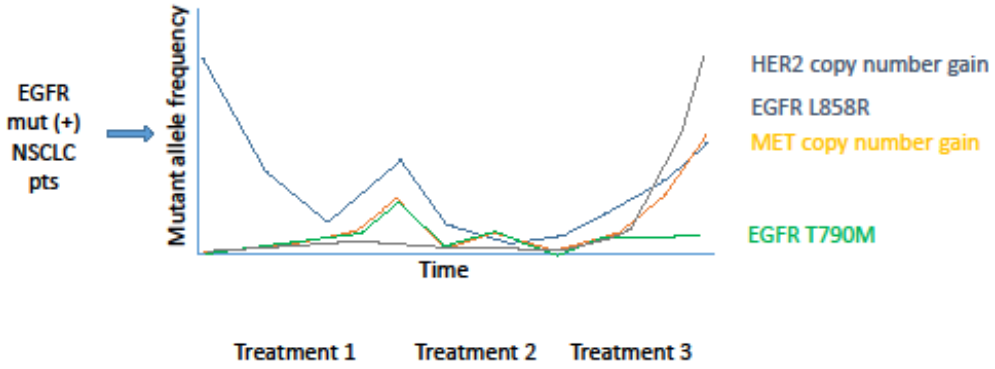

Figure 2. Adaptive treatment paradigms using liquid biopsies.

cfDNA を得る血漿分離交換法，cfDNA を結合するインプラントデバイスの開発などである．また，他のリキッドバイオプシーソースを考えることも必要であろう．膀胱癌では尿，大腸癌では便，婦人科癌では，子宮頚部スメア，子宮内洗浄，食道癌では食道ブラシ生検がある．肺癌においては，細胞診，胸水はサロゲートマテリアルとして汎用されている．

腫瘍の不均一性と cell free DNA

ctDNA は腫瘍細胞由来であるため，腫瘍内，腫瘍間不均一性の総和であると考えられている．[23] すなわち，ctDNA では，異なる領域由来の異なる変異が同時に検出され得る．[24] また，腫瘍組織検体では検出されなかった変異が ctDNA で検出されることもある．[25] 異なる腫瘍部位を持つ患者の ctDNA と腫瘍部 DNA のシーケンスデータの比較から，stem mutation（幹変異）の血漿中アレル頻度は高いことが示された．[26] このことは，ctDNA 解析は，腫瘍の不均一性に基づく潜在的なバイアスを代償できることを意味し，ctDNA 解析による stem mutation の検出は，場合によっては，生検サンプルによる解析より病態を反映し得ることを意味する．

肺癌臨床におけるリキッドバイオプシー

日本においても，EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性獲得メカニズムで最も頻度の高い，2 次的変異 *EGFR* T790M 変異陽性非小細胞肺癌に対して，第 3 世代の EGFR チロシンキナーゼ阻害薬が承認された．その適応となる *EGFR* T790M 検査のための再生検は臨床上困難なことが多い．静岡県立がんセンターからの報告によれば，EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性後の再生検実施割合は 62.5% であり，約 40% が再生検実施に至らなかった．その理由としては，アクセス不能な腫瘍部位，医師の判断，患者拒否などがあげられた．このような状況において，第 3 世代の EGFR チロシンキナーゼ阻害薬への適応に対して，血漿検体を用いた *EGFR* T790M 検査が追加承認された．すなわち，我が国においても血漿検体を用いた *EGFR* 遺伝子変異検査が体外診断薬として承認され，実臨床で用いられるようになった．その実際の使用法については，肺癌患者における *EGFR* 遺伝子変異検査の手引き第 3.05 版（2016. 12. 1）に述べられている．組織による検査が優先されるのか，血漿検査によるスクリーニングが可能なのかについて，3.05 版では，「組織採取が難しい時に限って血漿検査が使用されることが推奨される」と記載されており，tissue first である．血漿検査で陰性であった場合や検査の回数などについては同手引きを参照されたい．

血漿検査の体外診断薬はクリニカルニーズが高く，承認に至ったと推察されるが，そのエビデンス，すなわち，血漿中の *EGFR* T790M 陽性患者に対する第 3 世代の EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の有効性に関する前向き試験データは，まだ報告されていない．西日本がん研究機構では，血漿中の cfDNA を用いて *EGFR* T790M 遺伝子変異が確認された EGFR チロシンキナーゼ阻害薬既治療非小細胞肺癌患者に対する AZD9291 を用いた非盲検第 II 相試験（WJOG8815L）を実施中である．本試験の結果が，上記の課題に対するひとつの回答となることを期待したい．

リキッドバイオプシーによるパラダイムシフト

リキッドバイオプシーは，繰り返しの採取が可能であり，ctDNA による遺伝子異常の定量的モニタリングを可能とする．我々は，九州大学の岩間，岡本らとの共同研究で，*EGFR* 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌に対する第 2 世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害薬であるアファチニブを用いた臨床試験において，血漿中の *EGFR* 変異の推移をモニタリングする臨床試験を実施した．[27] デジタル PCR により，アファチニブ投与前の血漿中に *EGFR* 活性型遺伝子変異が検出された 27 症例において，治療開始 4

週目で検出感度以下となった19例には，24週目時点で1例も増悪は認められなかった．一方，27例中6例において，4週目で*EGFR*活性型遺伝子変異が検出された場合の半数で比較的早期の増悪を認め，血漿中の*EGFR*遺伝子変異の検出がEGFRチロシンキナーゼ阻害薬の有効性を予測し得ることが示された．また，*EGFR* T790Mのアレル頻度は腫瘍縮小の程度と相関するとの報告もなされている．[28] 今後は，変異の有無のみに基づく治療選択のみならず，治療開始後の定量モニタリングが重要であることが示唆される．リキッドバイオプシーによる治療モニタリングにより，adaptive treatment（Figure 2）へのパラダイムシフトが起こることを期待する．

本論文内容に関連する著者の利益相反：西尾和人［委受託研究（治験等）］日本ベーリンガーインゲルハイム（株），冨樫庸介［講演料など］日本ベーリンガーインゲルハイム（株）

REFERENCES

1. Kawamura Y, Yamamoto Y, Sato TA, Ochiya T. Extracellular vesicles as trans-genomic agents: Emerging roles in disease and evolution. *Cancer Sci.* 2017;108:824-830.
2. Naito T, Tanaka F, Ono A, Yoneda K, Takahashi T, Murakami H, et al. Prognostic impact of circulating tumor cells in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012;7:512-519.
3. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2014;371:1028-1038.
4. Kulasinghe A, Perry C, Kenny L, Warkiani ME, Nelson C, Punyadeera C. PD-L1 expressing circulating tumour cells in head and neck cancers. *BMC Cancer.* 2017;17:333.
5. Anantharaman A, Friedlander T, Lu D, Krupa R, Premasekharan G, Hough J, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *BMC Cancer.* 2016;16:744.
6. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142:241-243.
7. Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2014;8:927-941.
8. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One.* 2011;6:e23418.
9. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem.* 2002;48:421-427.
10. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med.* 2010;2:61ra91.
11. Nishimoto S, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Murata C, et al. Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Sci Adv.* 2016;2:e1501332.
12. García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JM, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* 2010;70:560-567.
13. Ju YS, Tubio JM, Mifsud W, Fu B, Davies HR, Ramakrishna M, et al. Frequent somatic transfer of mitochondrial DNA into the nuclear genome of human cancer cells. *Genome Res.* 2015;25:814-824.
14. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6:224ra24.
15. Takahama T, Sakai K, Takeda M, Azuma K, Hida T, Hirabayashi M, et al. Detection of the T790M mutation of EGFR in plasma of advanced non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors (West Japan oncology group 8014LTR study). *Oncotarget.* 2016;7:58492-58499.
16. Ohira T, Sakai K, Matsubayashi J, Kajiwara N, Kakihana M, Hagiwara M, et al. Tumor volume determines the feasibility of cell-free DNA sequencing for mutation detection in non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2016;107:1660-1666.
17. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9236-9241.
18. Sakai K, Tsurutani J, Yamanaka T, Yoneshige A, Ito A, Togashi Y, et al. Extended RAS and BRAF Mutation Analysis Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One.* 2015;10:e0121891.
19. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014;20:548-554.
20. Chan KC, Jiang P, Zheng YW, Liao GJ, Sun H, Wong J, et al. Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. *Clin Chem.* 2013;59:211-224.
21. Leary RJ, Sausen M, Kinde I, Papadopoulos N, Carpten JD, Craig D, et al. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4:162ra154.
22. Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Tockman M, Sidransky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res.* 1994;54:1634-1637.
23. Chan KC, Jiang P, Chan CW, Sun K, Wong J, Hui EP, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:18761-18768.
24. Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, Wedge DC, Song X, Zhang J, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science.* 2014;346:256-259.

25. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD 9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34:3375-3382.
26. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Horswell S, Mitter R, Sakarya O, Constantin T, et al. Detection of ubiquitous and heterogeneous mutations in cell-free DNA from patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2016;27:862-867.
27. Iwama E, Sakai K, Azuma K, Harada T, Harada D, Nosaki K, et al. Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for EGFR activating mutations. *Ann Oncol.* 2017;28:136-141.
28. Piotrowska Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, et al. Heterogeneity Underlies the Emergence of EGFR T790 Wild-Type Clones Following Treatment of T790M-Positive Cancers with a Third-Generation EGFR Inhibitor. *Cancer Discov.* 2015;5:713-722.