

## INVITED REVIEW ARTICLE

## 肺癌における Liquid biopsy の意義

荒金尚子<sup>1</sup>

## Significance of a Liquid Biopsy on Lung Cancer

Naoko Aragane<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, Saga University Hospital, Japan.

**ABSTRACT** — A liquid biopsy using circulating tumor DNA (ctDNA) has gained acceptance as a new, non-invasive clinical examination that reflects genomic alterations in the whole body in real time. It mainly involves a polymerase chain reaction-based single gene mutation test, but the results of comprehensive genomic analyses using next-generation sequencing have been recently reported, suggesting the possibility of the more precise prediction of molecular target therapy efficacy. However, there are some limitations associated with a liquid biopsy, including the low detection rate of ctDNA in cases with a low tumor burden or lesions limited to the intra-thoracic or central nervous system. In addition, it does not have any special diagnostic ability, and the origin of the genomic alterations detected with ctDNA is unclear. Therefore, the detection of ctDNA does not always reflect treatment efficacy, due to tumor heterogeneity. It is important to understand these characteristics of a liquid biopsy and use it effectively.

(JLCC. 2020;60:67-73)

**KEY WORDS** — Liquid biopsy, Circulating tumor DNA, Next-generation sequencing

Corresponding author: Naoko Aragane.

**要旨** — ctDNA (circulating tumor DNA) を用いた liquid biopsy は、非侵襲性でありリアルタイムの、かつ個体全体の遺伝子異常を反映する新規の臨床検査として広まってきた。従来は PCR を基礎とした単一遺伝子変異が主であったが、最近では次世代シーケンスを用いた網羅的遺伝子解析のデータが発表され、より精確な分子標的薬効果予測が可能になりつつある。一方で、liquid biopsy の限界として、腫瘍量が少ない場合、胸部内、中枢

神経系に局限している症例では ctDNA 陽性率が低いことが挙げられる。さらに、空間的診断能がないため腫瘍進展時に増大する腫瘍不均一性により、検査結果が治療効果と結びつかない場合もある。以上の liquid biopsy の特徴を理解し、この検査系を有効利用することが重要である。

**索引用語** — Liquid biopsy, Circulating tumor DNA, 次世代シーケンス

## 1. EGFR 陽性肺癌症例から学ぶ

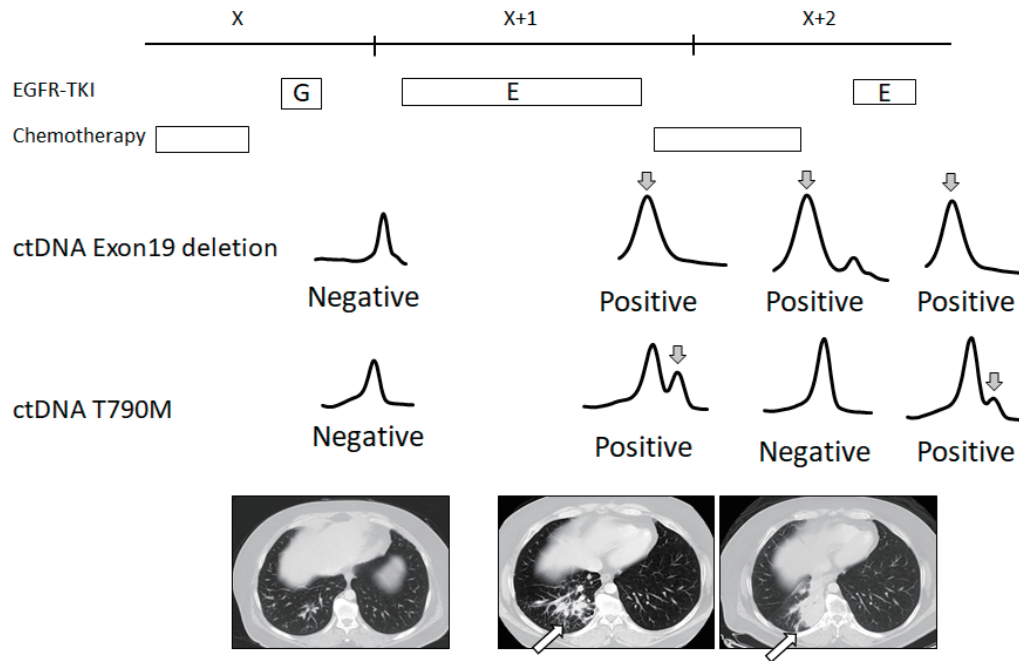
症例を 1 例呈示する (Figure 1)。60 歳代女性非喫煙者で EGFR exon19 欠失を有する肺腺癌症例である。ctDNA (circulating tumor DNA) での EGFR 変異の経時の変化を示す。ctDNA の解析を開始した 2010 年当時の結果であり、検査は本研究室で開発した MBP-QP (mutation-biased PCR and quenched probe) 法<sup>1</sup>、WIP-QP (wild inhibiting PCR and quenched probe) 法<sup>2</sup> を用い

ている。抗がん剤投与後、第 1 世代 EGFR チロシキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) ゲフィチニブを開始、副作用中止後、病勢増悪時にエルロチニブを投与した。投与前 ctDNA は exon19 欠失、T790M とともに陰性であったが、PD (progressive disease) 時にはどちらも陽性に転じている。その後化学療法を施行し、PD 時には T790M のみ陰性化した。エルロチニブ再投与し、PD 時に T790M が再度陽性となった。

この症例の教訓的な点は以下の通りである。

<sup>1</sup>佐賀大学医学部附属病院がんセンター呼吸器内科。

論文責任者：荒金尚子。



Modification of 2012 Tumor Microenvironment GCRC International Symposium

**Figure 1.** Change of ctDNA *EGFR* mutations. EGFR-TKI, EGFR tyrosine kinase inhibitor; G, gefitinib; E, erlotinib. The arrows indicate mutation peaks detected with the MBP-QP or WIP-QP method.

- ①腫瘍量が少ない時には ctDNA は検出されない。
- ②ctDNA は病勢進行時に同定される。
- ③ドライバー遺伝子変異 exon19 は持続的に検出される一方、T790M は変動する。

上記の3点を中心に ctDNA の特徴、臨床的有用性について概説する。

#### ctDNA と総腫瘍量

末梢血中には血漿遊離 DNA (circulating free DNA, cfDNA) が流れているが、その多くは主にリンパ球を含む正常細胞由来であり、担がん患者では、これに加え腫瘍細胞由来の ctDNA が存在する。cfDNA 総量は健康人中央値 3.3 ng/ml に対し、進行肺癌患者では 20.1 ng/ml と高値である。<sup>3</sup> さらに遠隔転移を有する症例ではない症例と比べ有意に cfDNA が高いことが報告されている。<sup>4</sup>

総腫瘍量、転移と ctDNA 量との関連を我々は動物モデルで検証した (Figure 2)。<sup>5</sup> 高度免疫不全マウス (NOJ: NOD/SCID/Jak3 欠損マウス) に *EGFR* L858R/T790M を有するヒト肺癌細胞株 H1975 を皮下移植すると全身に転移を生じる。このマウスモデルを用いて経時的に総腫瘍量、転移の有無、及び ctDNA L858R/T790M を検討した。ctDNA 検出頻度は総腫瘍量に比例し、また、転移を有するマウスで有意に増加した。

T790M 陽性肺癌に対するオシメルチニブと化学療法

の比較試験 (AURA3) の後方視的検討で、ctDNA *EGFR* 変異解析が施行された。<sup>6</sup> 解析は、コバス®*EGFR* 変異検出キット v2.0、ddPCR (droplet digital PCR) 法、次世代シーケンス (next-generation sequencing, NGS) を用いた網羅的遺伝子検査である Guardant360® が用いられた。ctDNA T790M 陽性例と陰性例において腫瘍径が 56 mm vs 39 mm と有意に陽性例で大きかったこと、胸郭外病変を有する症例 (M1b) ではない例 (M0, 1a) と比べ有意に ctDNA T790M 陽性率が高かったこと (M1b 58% vs M0, 1a 39%) が明らかになった。

#### ctDNA と病勢進行

2011 年から国内 7 施設で前向き観察研究、“非小細胞肺癌 EGFR-TKI 投与症例における臨床的増悪と MBP-QP 法を用いた血漿 DNA T790M 検出率の相関に関する検討: HASAT study)”を行った。<sup>7</sup> *EGFR* 活性化変異 L858R/exon19 欠失を有する非小細胞肺癌患者 89 例が登録され、第 1 世代 EGFR-TKI が投与された。58 例が観察期間中 PD となり、うち 23 例 (40%) で ctDNA T790M 陽性となった。Figure 3 に各症例の ctDNA の経過を示す。4 ヶ月毎に ctDNA T790M 検査を施行し、臨床経過と T790M 出現時期を検討した。検査は MBP-QP 法で行った。ctDNA T790M は PD 時期より頻度が上がり、後治療 PD 時、すなわち病勢進行時にさらに陽性例が増加した。PD 前に T790M 陽性例が散見されるが、その後陰転化し

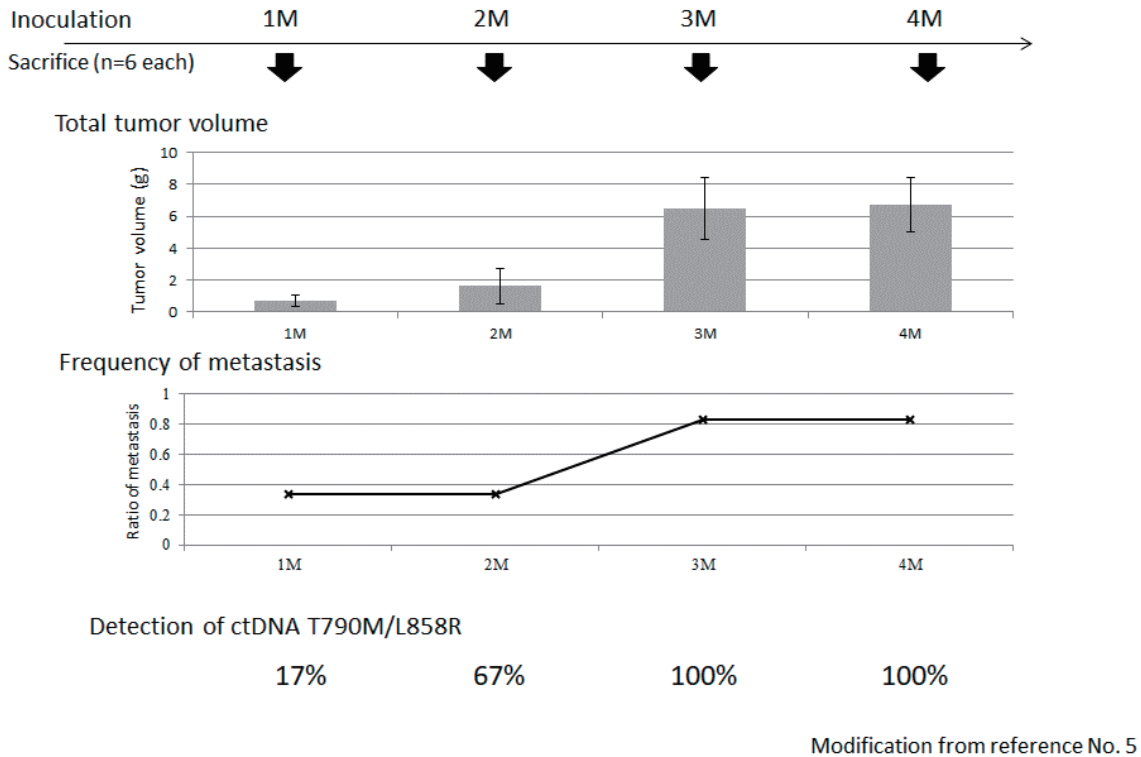


Figure 2. Relationship between total tumor burden/metastasis and detection of ctDNA.

ており、アレル頻度が少ないための変動であることが推測される。臨床病理像との関連においては、ctDNA T790M 陽性例は、新病変すなわち遠隔転移発症例で有意に多く、胸郭内病変のみが多くを占める標的病変増悪では検出率が低かった。

以上の結果より、ctDNA 検査のタイミングは、病勢が進行し、遠隔転移が出現した場合に施行する方がより情報量が多い可能性が高いと言える。

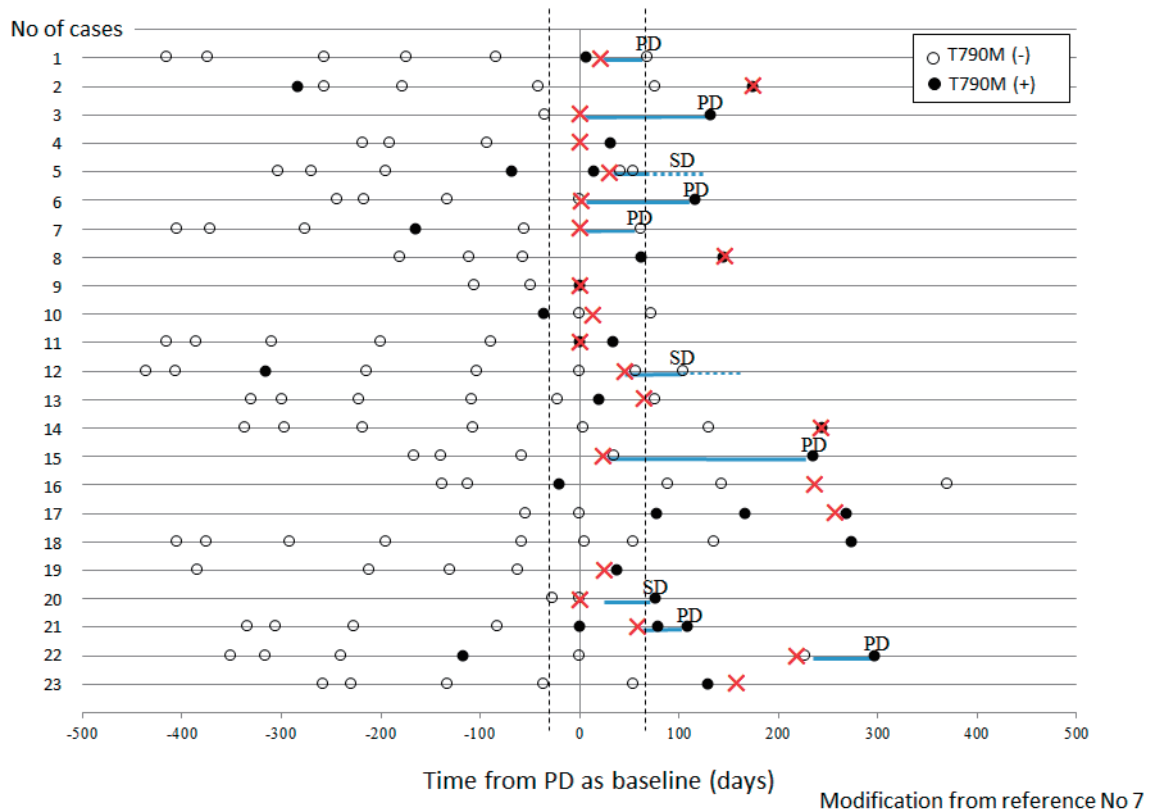
## 2. ctDNA EGFR 変異検査の有用性

初めて国内薬事承認された ctDNA 検査系は、EGFR T790M 検査を目的としたコバス®EGFR 変異検出キット v2.0 (以下コバス法と略す) である。第 3 世代 EGFR-TKI オシメルチニブのコンパニオン診断薬として承認され、次いで第 1 世代、第 2 世代 EGFR-TKI 投与前としての EGFR 変異検査が承認され、初回治療前検査としても施行できるようになった。コバス法はアレル特異的増幅法 (allele-specific PCR assay)、すなわち各変異型特異的プライマーで増幅後、蛍光ラベルで標識されたプローブを用いてリアルタイム PCR 法で検出する方法である。<sup>8</sup> EGFR 変異陽性細胞株の断片化 DNA を用いた感度解析では、0.025~0.1% と報告されている。<sup>9</sup>

EGFR-TKI 耐性化後組織 T790M 陽性例における第 3 世代 EGFR-TKI オシメルチニブの効果を検討した

AURA3 で、コバス法を用いた ctDNA T790M 検査結果が報告されている。<sup>10</sup> EGFR-TKI 耐性化後スクリーニングで ctDNA と組織両方とも T790M 検査が施行できた 564 例中、ctDNA T790M 陽性は 41%、組織 T790M 陽性は 64%、ctDNA と組織の一致率は 61% であった (Table 1)。オシメルチニブ投与後の無増悪生存期間 (progression free survival, PFS) は、組織で T790M が確認された症例中 ctDNA 陽性例では、オシメルチニブ 8.2 M に対し、化学療法 (プラチナ+ペメトレキセド) 4.2 M と有意な延長が得られた。オシメルチニブ 1 次治療効果を検討した FLAURA では、EGFR 活性化変異、L858R、exon19 欠失について同様の検討を行い、ctDNA と組織の一致率は各々 88%、87% と報告されている。<sup>11</sup> ctDNA 陽性例における PFS は、オシメルチニブ 15.2 M に対し第 1 世代 EGFR-TKI 9.7 M と有意差を認めた。しかし、ctDNA 陰性組織陽性例では、オシメルチニブ 23.5 M に対し第 1 世代 EGFR-TKI 15.0 M と、ctDNA 陽性例より PFS の延長が見られた (Figure 4A)。これは、ctDNA 陽性が薬剤効果予測因子とともに予後因子であるため、全体的に PFS が短くなるためだと考えられる。

ctDNA 検査について BEAMing (beads, emulsion, amplification and magnetics) 法を用いて検討した後方視的研究では、EGFR 変異における ctDNA と組織の一致率は、exon19 欠失、L858R は各々 88%、93% であったのに



**Figure 3.** ctDNA and tumor progression. × : discontinuation of EGFR-TKI; blue line: period of chemotherapy; PD: progressive disease as the tumor response of chemotherapy; SD: stable disease as the tumor response to chemotherapy. The criterion for PD was from 30 days before to 70 days after PD (dotted line).

**Table 1.** Concordance of *EGFR* Mutations Between ctDNA and Tissue

	Cobas (AURA3) n = 564	Cobas (FLAURA) n = 486	BEAMing n = 564
Exon19 deletions	-	87%	88%
L858R	-	88%	93%
T790M	61%	-	70%

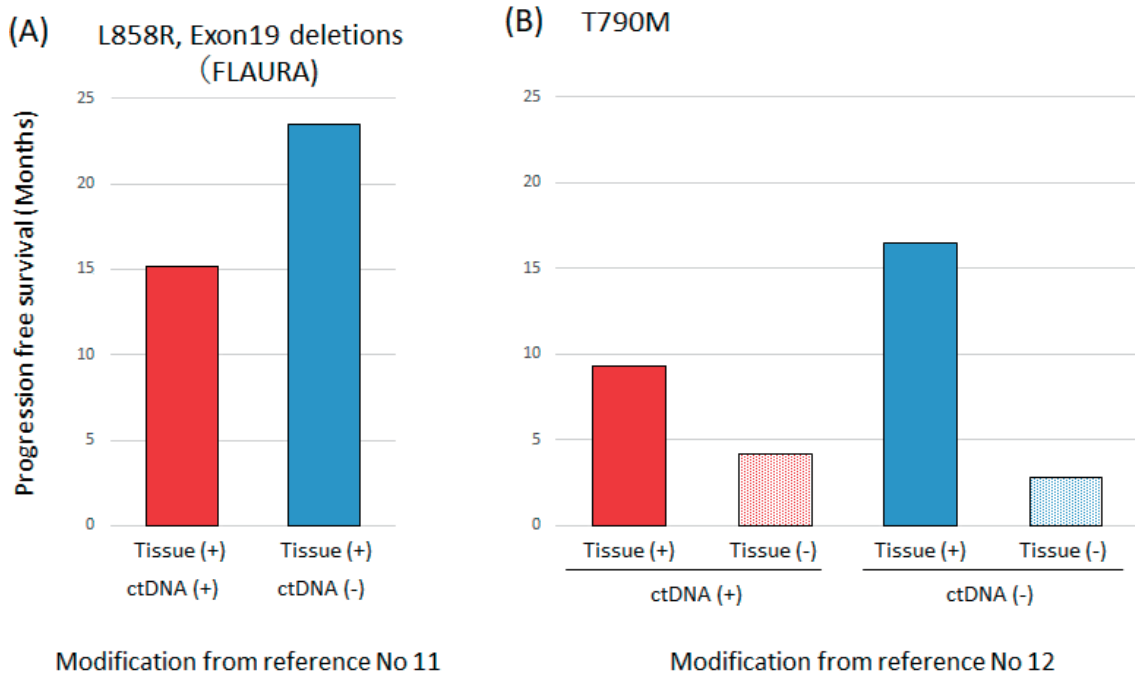
Modification from reference No 10-12.

対し、T790Mは70%と報告されている (Table 1).<sup>12</sup> BEAMing法はデジタルPCRの応用であり、*EGFR*特異的プライマーを結合させた磁気ビーズを用いて、1つのエマルジョンに1分子の鋳型DNA、磁気ビーズを混合させ、PCRで増幅後、フローサイトメーターで解析する方法である。<sup>13</sup> Table 1に3つの試験結果をまとめた、*EGFR*活性化変異であるL858Rとexon19欠失に比べ、T790MのctDNA-組織一致率は低い。前者はclonal変異であるため腫瘍内に比較的均一に存在するのに対し、耐性化遺伝子であるT790Mはsubclonal変異のため、腫瘍不均一性が大きいためであることが推定される。また、

オシメルチニブの治療効果についてはFLAURA試験と同様に、ctDNA陽性群でPFSが短い傾向が見られた (Figure 4B)。

### 3. 次世代シーケンス (NGS) を用いた liquid biopsy

単一遺伝子検査でliquid biopsyの薬剤効果予測因子としての有用性についてエビデンスの蓄積がされてきたが、今後はNGSを用いた網羅的遺伝子検査の臨床応用が広まってくることが想定される。Liquid biopsyにおけるNGSは、ターゲットシーケンスが主であり、全エクソン解析は研究室レベルにとどまっている。ctDNA検出専用採血管で20 ml前後採血し、DNAを抽出する。分子バーコードを用いたライブラリー調整を行い、hybridizationまたは、シーケンス後正常細胞由来のcfDNAによるノイズを除去することにより、末梢血中のわずかなctDNAの検出が可能となった。<sup>14,15</sup> 本邦で頻用されている検査系であるGuardant360®と、FoundationACT®の性能をまとめた (Table 2)。前者は74遺伝子、後者は62遺伝子検査が可能であり、SNV (single nucleotide variation)、挿入・欠失、遺伝子増幅、融合



**Figure 4.** ctDNA/tissue *EGFR* mutations and efficacy of osimertinib.

**Table 2.** Liquid Biopsy NGS Panel

	Guardant360	FoundationACT
Method	Molecular barcode, elimination of nose	Molecular barcode, hybridization
Genes	74 genes	62 genes
Detection	SNV, indel, CNA, fusion, MSI	SNV, indel, CNA, fusion, MSI
Sensitivity	85.0% (solid tumors 165 cases*)	80% (NSCLC 1552 cases)
Concordance with tissue	99.3% (solid tumors 165 cases)	64% <sup>†</sup> (NSCLC 33 cases)

SNV, single nucleotide variation; indel, insertion/deletion; CNA, copy number amplification; MSI, microsatellite instability; NSCLC, non-small cell lung cancer. \*including 11% NSCLC, <sup>†</sup>including CNA.

Modification from reference No 14, 15.

遺伝子，及びマイクロサテライト不安定性試験 (microsatellite instability, MSI)が含まれる。組織を基準とした感度は80~85%，一致率はGuardant360<sup>®</sup>で99.3%，<sup>14</sup> FoundationACT<sup>®</sup>で64%<sup>15</sup>であるが，後者はコピー数増幅 (copy number amplification, CNA) が含まれた値であるため，比較は難しい。また，これらの患者背景はIII期以上の進行がんが多くを占めることも留意したい。現時点では薬事承認されていないため自由診療で行われている。

Liquid biopsyの最大の利点である非侵襲性を考慮すると，特に薬剤耐性機序の検討に適した検査であると言える。英国における大規模前向き検討，tracking cancer evolution through therapy (TRACERx)で，腫瘍の遺伝子変化は治療修飾，腫瘍進展により時々刻々と変化する，いわゆるtumor evolutionが証明された。<sup>16</sup> すなわち，至

適次治療法決定には，リアルタイムの遺伝子変化を同定することが不可欠であると言える。第1，2世代EGFR-TKI耐性化時に出現するT790Mは，耐性化症例中50%以上に出現する稀有な遺伝子変異である。そのため，前項で述べたように単一遺伝子変異解析が肺癌の分野で有効であった。しかし，他の分子標的薬，たとえばALK阻害剤では，ALK経路，non-ALK経路と多彩な耐性化機構が出現する。<sup>17</sup> オシメルチニブはT790Mにも奏効するためか，第1世代EGFR-TKIと比べ長い奏効期間を認めている一方，その耐性化機構はEGFR変異の他，MET増幅，PIK3CA変異，BRAF変異，KRAS変異，細胞周期関連分子増幅など，非常に多彩であることがctDNA NGSで明らかになった。<sup>18</sup> EGFR-TKI耐性化機構の1つとして知られる小細胞転化は本来病理組織で判明するが，遺伝子解析によりRb，p53不活性化型変異が小細胞

転化の危険因子であることが2017年に報告された。<sup>19</sup> Liquid biopsy で同様の変異解析を行えば、小細胞転化を含む幅広い耐性化機構解析が可能となるかもしれない。

#### 4. 課題と今後の展開

単一遺伝子変異解析のみならず、NGSを用いた網羅的解析においても、血中変異アリル0.03%<sup>20</sup>を検出できるまで分子生物学的技術は進歩したが、病期I、IIの症例での検出は未だ困難である。今後は、検出技術の向上のみではなく、いかに効率よくctDNAを抽出するかが重要になってくる。そのためには、ctDNAの動態、遊離機序など基礎的研究が必要である。

ctDNAは、ヌクレオソーム単位である160~170bpの二本鎖DNAとして血中に存在すると考えられ、変異解析もこのフラグメントを中心に解析されてきた。最近我々は、担がん患者では、170bp前後のshort fragmentに加え、5kb前後のlong fragmentが存在することを報告し、さらにlong fragmentは遠隔転移例で多く含まれることを見出した。<sup>3</sup> Long fragmentは細胞外小胞と同一の分画に存在することから、エクソソームやオンコソームと共存している可能性があること、特定の遠心条件で得られるshort fragment分画にctDNAの含有量が多いことを報告した。<sup>4</sup>

2019年Cristianoらは、cfDNAのサイズ、及びサイズ分布パターンにより担がん状態か、さらには原発巣の推定が可能であると報告した。<sup>21</sup> このような基礎的検討の蓄積により、ctDNAの効率的分離が可能となれば、liquid biopsyが早期腫瘍診断でも臨床応用できることが期待できる。

最近では、分子標的薬の薬効予測、耐性化機構解析のみならず、免疫チェックポイント阻害薬効果予測への可能性も報告されてきた。ctDNAでの総変異量(tumor mutation burden)解析が組織全エクソンシーケンス結果と相関することや、<sup>22</sup> 組織を用いたMSI検査とctDNA結果が相関すること<sup>23</sup>についても報告されている。

Liquid biopsyのもう1つの課題は、空間的診断能がないことである。個体全体のゲノム情報を反映できるという利点は、一方で、どの転移部位から遊離したctDNAなのかの判別がつかないという欠点と表裏一体の関係であり、その結果、治療不均一性をもたらす。最近、変異特異的に結合するアイソトープラベル分子を用いたPETなど放射線学的手法が報告されている。<sup>24</sup> このような検査系が臨床応用されれば、liquid biopsyと併用することで、より有効な治療選択ができるようになるかもしれない。いずれにしても、liquid biopsyを適切に利用し、臨床的有用性を示すことにより保険適応へ導き、肺

癌診療で広く使われることを望むものである。

本論文内容に関連する著者の利益相反：荒金尚子 [研究費・助成金などの総額] アストラゼネカ

#### REFERENCES

1. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Abe T, et al. A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol*. 2011;6:1639-1648.
2. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K, Sato A, Komiya K, Kobayashi N, et al. Application of a highly sensitive detection system for epidermal growth factor receptor mutations in plasma DNA. *J Thorac Oncol*. 2012; 7:1369-1381.
3. Nakashima C, Sato A, Abe T, Kato J, Hirai M, Nakamura T, et al. Automated DNA extraction using cellulose magnetic beads can improve EGFR point mutation detection with liquid biopsy by efficiently recovering short and long DNA fragments. *Oncotarget*. 2018;9:25181-25192.
4. Abe T, Nakashima C, Sato A, Harada Y, Sueoka E, Kimura S, et al. Characteristics of circulating tumor DNA in lung cancer patients. AACR Annual Meeting 2019. 2019.
5. Sueoka-Aragane N, Sato A, Kobayashi N, Ide M, Yokoo M, Nagano Y, et al. Correlation between plasma DNA and tumor status in an animal model. *PLoS One*. 2014;9: e111881.
6. Papadimitrakopoulou VA, Han JY, Ahn MJ, Ramalingam SS, Delmonte A, Hsia TC, et al. Epidermal growth factor receptor mutation analysis in tissue and plasma from the AURA3 trial: Osimertinib versus platinum-pemetrexed for T790M mutation-positive advanced non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2020;126:373-380.
7. Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M, Yokota S, Aoe K, Iwanaga K, et al. Monitoring EGFR T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *Cancer Sci*. 2016;107:162-167.
8. Malapelle U, Sirera R, Jantus-Lewintre E, Reclusa P, Calabuig-Fariñas S, Blasco A, et al. Profile of the Roche cobas<sup>®</sup> EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17:209-215.
9. コバス<sup>®</sup> EGFR 変異検出キット v2.0 添付文書. 第9版.
10. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376:629-640.
11. Gray JE, Okamoto I, Sriuranpong V, Vansteenkiste J, Imamura F, Lee JS, et al. Tissue and Plasma EGFR Mutation Analysis in the FLAURA Trial: Osimertinib versus Comparator EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor as First-Line Treatment in Patients with EGFR-Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25:6644-6652.
12. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrence 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.
13. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14:985-990.
  14. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, Sebisanovic D, Lopez R, Blau S, et al. Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *PLoS One*. 2015;10:e0140712.
  15. Schrock AB, Welsh A, Chung JH, Pavlick D, Bernicker EH, Creelan BC, et al. Hybrid Capture-Based Genomic Profiling of Circulating Tumor DNA from Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14:255-264.
  16. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, Birkbak NJ, Watkins TBK, Veeriah S, et al. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;376:2109-2121.
  17. Rossi A, Maione P, Sacco PC, Sgambato A, Casaluze F, Ferrara ML, et al. ALK inhibitors and advanced non-small cell lung cancer (review). *Int J Oncol*. 2014;45:499-508.
  18. Ramalingam SS, Cheng Y, Zhou C, Ohe Y, Imamura F, Cho BC, et al. Mechanisms of acquired resistance to first-line osimertinib: preliminary data from the phase III FLAURA study. ESMO 2018 Congress. 2018.
  19. Lee JK, Lee J, Kim S, Kim S, Youk J, Park S, et al. Clonal History and Genetic Predictors of Transformation Into Small-Cell Carcinomas From Lung Adenocarcinomas. *J Clin Oncol*. 2017;35:3065-3074.
  20. Zill OA, Banks KC, Fairclough SR, Mortimer SA, Vowles JV, Mokhtari R, et al. The Landscape of Actionable Genomic Alterations in Cell-Free Circulating Tumor DNA from 21,807 Advanced Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2018;24:3528-3538.
  21. Cristiano S, Leal A, Phallen J, Fiksel J, Adleff V, Bruhm DC, et al. Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature*. 2019;570:385-389.
  22. Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, Kim KM, Odegaard JI, Kim K, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med*. 2018;24:1449-1458.
  23. Willis J, Lefterova MI, Artyomenko A, Kasi PM, Nakamura Y, Mody K, et al. Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel. *Clin Cancer Res*. 2019;25:7035-7045.
  24. Kimura H, Okuda H, Ishiguro M, Arimitsu K, Makino A, Nishii R, et al. <sup>18</sup>F-Labeled Pyrido[3,4-*d*]pyrimidine as an Effective Probe for Imaging of L858R Mutant Epidermal Growth Factor Receptor. *ACS Med Chem Lett*. 2017;8:418-422.