

皮膚悪性腫瘍に対するセルフリーDNA 濃度を用いたリキッドバイオプシー開発

名古屋大学大学院 医学系研究科 皮膚科

奥村 真央

名古屋大学医学部附属病院 皮膚科

滝 奉樹

森 章一郎

1. 研究の背景・目的

皮膚がんには悪性黒色腫、有棘細胞癌、血管肉腫、乳房外パジェット病、メルケル細胞癌、基底細胞癌、皮膚付属器癌などが含まれるが、本邦においてはほぼ全てが希少がんである。そのため、治療法が十分に確立しておらず、手術可能であれば手術が第一選択となり長期生存が期待できるが、遠隔転移を来すと非常に予後不良である。悪性黒色腫の治療に関しては免疫チェックポイント阻害薬をはじめとして国際的な治験が行われているが、本邦の悪性黒色腫は白色人種と病型が異なることが知られており、国際的試験の結果を本邦の患者にそのまま当てはめることが出来ない¹。他の皮膚がんに関しては海外でも稀であることが多く、治療法や予後予測に関して確立していない。現在は術後合併症や治療関連有害事象のリスクを勘案した上で、積極治療/緩和治療の選択を含めた治療方針の決定が非常に重要である。治療のリスク・ベネフィットを正確に判断するためには、高い精度で簡便に予後予測・病勢把握をする必要がある。通常の血液検査で測定可能な皮膚がんの予後因子として、悪性黒色腫の 5-SCD やメルケル細胞癌における NSE などが知られているが、必ずしも全例で病勢を反映するわけではない。また、皮膚がんでは一部のものを除いて、特定の遺伝子変異が同定されていない、もしくは、検出される割合が低く、病勢を反映する有用なバイオマーカーが存在しない²。また、患者への侵襲を考慮すると、腫瘍検体ではなく血液から採取できるバイオマーカーの確立が重要である。リキッドバイオプシ

一として、血液中には遊離 DNA (cell-free DNA: cfDNA) が存在し、担癌患者では apoptosis、necrosis、active release といった機序を通じて、癌組織に由来する DNA が血液中に放出されている。cfDNA には正常な血球細胞に由来するものと、癌組織に由来するもの (circulating tumor-cell DNA: ctDNA) が含まれ、担癌患者では健常人と比較し高濃度になる^{3,4}。本研究では皮膚悪性腫瘍患者において血中 cfDNA 濃度が予後・病勢を反映することを証明し、簡便・精確な予後予測法を開発する。

2. 研究の対象ならびに方法

1. 皮膚がんにおけるバイオマーカーの検討

皮膚がんの確立したバイオマーカーは無いが、悪性黒色腫のバイオマーカーとして末梢血好中球リンパ球比 (neutrocyte lymphocyte ratio; NLR) の有用性の報告があるため、cfDNA 以外に簡便に測定できるバイオマーカーとして使用可能か検討した。悪性黒色腫患者の術後補助療法として抗 PD1 抗体による治療を受けた症例に対して、術後補助療法の完遂群と非完遂群における NLR を比較した。2020 年から 2024 年に進行期皮膚がん患者で包括的ゲノムプロファイリングを受けた患者に対して、これまで報告のない付属器癌や乳房外パジェット病について検討した。

2. 皮膚がん患者の血中 cfDNA 濃度測定

対象は、当科加療中で、臨床的に完全消退の得られていない皮膚がん患者及び今後新規受診する進行期皮膚がん患者とした。①皮膚がん患者の化学療法治療開始から 1 ヶ月毎の採血。②既に所属リンパ節転移をきたしているリンパ行性転移を来す皮膚がん患者で治療前後の採血。③進行期皮膚がん患者の経時的な採血。方法は、通常診療の採血に、8.5~10ml 上乗せ採血 (Streck 採血管: Cell-Free DNA BCT CE を使用)、②血液遠心分離、③血漿回収、④血漿遠心処理、⑤cfDNA 抽出、⑥cfDNA 濃度測定・解析 (LINE-1 に対する市販のプライマーを使用) とした。希少疾患のため臨床検体が集まるまで時間がかかることから、検体が十分集まり次第、詳細な解析予定である。

3. 悪性黒色腫の培養細胞株のマウス移植モデルの作成

マウスでの cfDNA 濃度測定を検討し、悪性黒色腫の培養細胞株を用いたモデルマウス作成を行った。ヒト由来マウス悪性黒色腫細胞である A375 を 1500 個、10000 個、 10^6 個ずつ、マトリゲルと混合ありなしの条件下で、ヌードマウス (Balb/cSlc-nu/nu) の側腹部皮下に播種した。それぞれの個体で腫瘍体積の変化とマウスの体重を計測した。

3. 研究結果

悪性黒色腫に対して術後補助療法を受けた患者 15 例のうち、治療完遂例と非完遂例で治療前 NLR の値に有意な差は見られなかった(表 1)。

表 1 術後補助療法を受けた悪性黒色腫患者の治療前 NLR の比較

	Completed	Not completed	p value
n	7	8	
Pre NLR	2.38 (1.18-11.7)	2.21 (1.01-2.84)	0.72

包括的ゲノムプロファイリングを受けた皮膚がん患者 54 例の遺伝子変異について、悪性黒色腫(n=38)で新たな変異は見られなかった。脂腺癌(n=1)、汗腺癌(n=2)では BRAF mutation(n=1)、CKDN2AB loss(n=1)、TP53 mutation(n=1)、NOTCH amplification(n=1)が見られたが、個別治療には繋がらなかった。

臨床検体採取が遅延していることから、悪性黒色腫の培養細胞株のマウス移植モデルを作成した(図 1)。培養細胞株は細胞数によらず生着し、腫瘍体積の増加とマウス体重の維持が見られた(図 2, 3)。マトリゲルと混合することでより生着する傾向がみられたため、マトリゲルとの混合でモデルマウスを作成し、血中 cfDNA を測定していく。

図 1 培養細胞株の移植後 28 日目



図2 移植後の腫瘍体積の変化

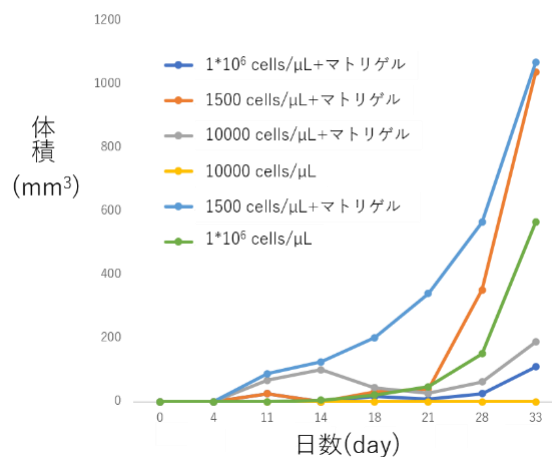


図3 移植後マウスモデルの体重変化

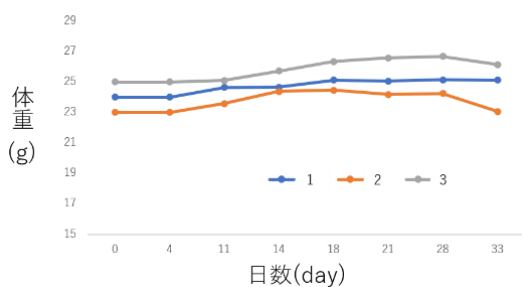
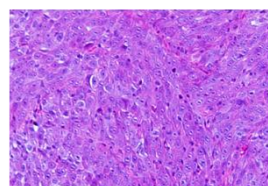


図4 生着した腫瘍細胞(HE, x200)



4. 考察

本研究では、悪性黒色腫において現在末梢血で測定可能な NLR はバイオマーカーとして有用とは言えない現状を示した。NLR は日常診療で測定できるため非常に簡便であり侵襲も無いが、NLR のみで病勢や抗 PD1 抗体の効果や副作用を予測することは困難である。また、皮膚がんの中でも特に付属器癌は非常に稀であり、末梢血以外のバイオマーカーについても報告が無い。本研究では付属器癌における遺伝子変異を記述した。今後症例を蓄積し、傾向を検討することで癌腫に特異的なバイオマーカー確立を目指す。包括的ゲノムプロファイリングは、標準治療が無効の症例に有用な検査と考えられているが、費用面での負担が大きく、必要性は十分に議論すべきである。今回付属器癌では治療に繋がる遺伝子変異は同定されなかったことから、いずれの癌腫でも末梢血におけるバイオマーカー同定は重要な課題であり、今後臨床検体を蓄積し、cfDNA 測定によるリキッドバイオプシーの有用性を確立していく。また悪性黒色腫については腫瘍細胞移植モデルの作成に成功したため、他の癌腫についても移植モデルの確立と、マウスモデルでの cfDNA 濃度測定を行う。

5. 文献

- 1 Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, *et al.* Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018; **19**:1480-92.
- 2 Gosman LM, Tăpoi DA, Costache M. Cutaneous Melanoma: A Review of Multifactorial Pathogenesis, Immunohistochemistry, and Emerging Biomarkers for Early Detection and Management. *Int J Mol Sci* 2023; **24**. doi:10.3390/ijms242115881.
- 3 Lo YMD, Han DSC, Jiang P, Chiu RWK. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science* (80-) 2021; **372**. doi:10.1126/science.aaw3616.
- 4 Medina JE, Dracopoli NC, Bach PB, *et al.* Cell-free DNA approaches for cancer early detection and interception. *J Immunother Cancer* 2023; **11**:1-12.

6. 研究発表

・論文発表

なし

・学会発表

なし