

博士論文

血中腫瘍 DNA 動態による ニボルマブ効果の早期予測に関する研究

中村 誠二
奈良先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科
バイオサイエンスプログラム

主指導教員：河合 太郎 教授
分子免疫制御研究室（バイオサイエンス領域）

令和 3 年 3 月 14 日提出

目次

論文の要旨	1
略語	3
第1章 序論	4
1-1. 免疫チェックポイント阻害薬とその課題	4
1-2. 免疫チェックポイント阻害薬の効果予測バイオマーカー	5
1-2-1. PD-L1 発現	5
1-2-2. ミスマッチ修復異常	6
1-2-3. Tumor mutational burden (TMB)	7
1-3. 血中腫瘍 DNA (ctDNA) 概論	8
1-3-1. 血中遊離 DNA (ccfDNA)	8
1-3-2. 血中腫瘍 DNA (ctDNA)	9
1-4. ctDNA の検出方法	9
1-4-1. 次世代シーケンス法 (NGS)	10
1-4-2. NOIR-SS (non-overlapping integrated reads sequencing system) 法	11
1-5. ctDNA 検査の有用性：ctDNA によるがん治療の効果の早期判定（予 測）に関する知見	14
1-6. 本研究の目的	15
第2章 材料と方法	17
2-1. 研究体制	17
2-2. 検体および臨床情報の収集	17
2-3. ccfDNA の抽出・クオリティチェック	18
2-4. NOIR-SS 肺癌パネルの設計・検体カバー率の推定	19
2-5. NOIR-SS 実験	20
2-6. NOIR-SS 解析	25
2-7. 統計解析	26
第3章 結果	27
3-1. NOIR-SS 肺癌パネルのデザインと検体カバー率の推定	27
3-2. NOIR-SS 肺癌パネルの変異検出性能の確認	27
3-3. 検体背景	28
3-4. ニボルマブ治療成績	29
3-5. ccfDNA 量の経時的変化	30
3-6. ニボルマブ投薬履歴の確認と解析症例の選別	31
3-7. ctDNA の検出結果および経時的変化の概観	34
3-8. ctDNA 動態データの集約・簡略化と傾向解析	37
3-8-1. ctDNA _{max} の算出と傾向の確認	37

3-8-2. ctDNA スパイク症例の同定	39
3-8-3. ctDNA 検出の「有無」に注目した傾向の確認	39
3-9. ctDNA 検出とニボルマブ治療効果の関連解析	40
3-9-1. ctDNA 検出とニボルマブ治療 PFS との関連解析	41
3-9-2. ctDNA 検出とニボルマブ治療 OS との関連	43
3-9-3. ニボルマブ OS に影響する ctDNA 以外の因子の影響の確認	44
第 4 章 考察	46
4-1. NOIR-SS 肺癌パネルについて	46
4-2. ニボルマブ治療について	47
4-3. ctDNA によるニボルマブ治療効果予測について	48
4-4. 本研究のリミテーション	50
4-5. 結語	51
謝辞	52
参考文献	53

論文の要旨

所属 (主指導教員)	バイオサイエンス領域 分子免疫制御研究室 (河合 太郎 教授)		
学籍番号	1821036	提出	令和3年3月14日
氏名	中村 誠二		
題名	血中腫瘍 DNA 動態によるニボルマブ効果の早期予測に関する研究 (Early evaluation of therapeutic response to nivolumab based on circulating tumor DNA levels in patients with lung cancer)		
<p>【背景】</p> <p>免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitors: ICIs) は、自身の免疫機能を利用して抗腫瘍作用を発揮するこれまでにない作用機序を示すがん治療薬であり、がん治療の新たな選択肢として注目を集めている。本邦でも 2014 年のニボルマブの承認以降すでに数種類の ICIs が薬事承認・保険適用されており、従来のがん治療で効果が得られない患者群を中心に実臨床で広く利用されるようになった。その一方、効果が見込める患者が限定的 (20-30%) であること、さらには高価な薬価や重篤な副作用等の理由から、ICIs を使用するかどうかの治療方針の決定には、決して低くないハードルが存在している。またとりわけその高価な薬価は今後本国の医療費、皆保険医療にも多大な影響を及ぼしかねない。この状況を解決するための手段の一つはバイオマーカーの開発であり、ICIs 投与前あるいは投与後早期にレスポンスが判別できるようなバイオマーカーを見出すことができれば、その意義は大きい。</p> <p>がん患者の血液には腫瘍細胞に由来する遊離 DNA 断片が存在することが知られている。これらは血中腫瘍 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) と呼ばれ、半減期が短く、またその量は腫瘍負荷量 (腫瘍サイズ) と一定の相関を示すとされる。また ctDNA は血液で検査可能なため低侵襲に繰り返し測定することができる。これら特徴から ctDNA はリアルタイムな癌の病勢および遺伝子変化のモニタリングを可能とする新規バイオマーカーとして、がん患者マネジメントの様々なフェイズでの活用が期待されている。とりわけ近年は、がん治療時の ctDNA 変化が画像上の変化に先行して認められるという知見に注目が集まっている。これら知見は、治療開始後の ctDNA をモニタリングすることで、従来から行われている画像による治療効果判定よりも早期に治療の有効性が予測可能であることを示唆するものである。この ctDNA 変化をより”早期”に捉え、より早期に</p>			

治療予後が予測できるようになれば、その分無駄な医療（コストおよび時間）が削減できると期待される。

そこで本研究では、ICIs の 1 つであるニボルマブの投与開始後超早期（～1 か月）の ctDNA を時系列に測定し、その動態が ICIs の治療予後と関連するかを検証した。ICIs の適用として早くから臨床応用が進んでおり、患者数が多く、かつ ctDNA 検出率が高い非小細胞肺癌を対象として研究を行った。

【方法】

二次治療としてニボルマブ投与が決定し、研究参加の同意が得られた非小細胞肺癌患者を研究対象被験者としてエントリーした。ニボルマブ治療前、治療開始後 4 時間、2 日、8 日、15 日、29 日の 6 つのタイムポイントで採血を行った。得られた全血から遠心分離により血漿を採取し、市販の DNA 抽出キットを用いて血漿遊離 DNA を精製した。得られた血漿遊離 DNA を対象に、高感度 DNA 測定法である Non-overlapping integrated reads sequencing system 法（NORI-SS ※著者の研究グループが開発）を用いて ctDNA を検出し、治療予後である無増悪生存期間、全生存期間との関連を解析した。

【結果】

本研究にエントリーされた全 30 例のうち、ニボルマブ治療開始後 1 か月の投薬が逸脱なく行われた 21 例を解析対象とした。全 21 例の無増悪生存期間の中央値は 3.5 か月（95% 信頼区間（CI）：1.4, 9.8）、全生存期間の中央値は 20.9 か月（95% CI: 12.9, NA）であった。ctDNA が検出された症例の割合は、ニボルマブ治療前、治療開始後 4 時間、2 日、8 日、15 日、29 日でそれぞれ 52.4%（11/21）、57.1%（12/21）、60.0%（12/20）、52.4%（11/21）、52.4%（11/21）、45.0%（9/20）であった。ニボルマブ治療開始後 29 日の ctDNA の有無で層別化すると、無増悪生存期間は ctDNA 陽性群で 1.4 か月（95% CI: 1.4, NA）、陰性群で 6.5 か月（95% CI: 2.6, NA）であり、陰性群で有意な延長（ログランク検定 $p = 0.03$ ）が認められた。同じく全生存期間についても、ctDNA 陽性群で 12.9 か月（95% CI: 10.2, NA）、陰性群で 47.9 か月（95% CI: 21.8, NA）と陰性群で有意な延長（ $p = 0.003$ ）が認められた。1 年生存率は治療 29 日 ctDNA 陽性群で 55.6%、陰性群で 90.9%、2 年生存率は陽性群で 11.1%、陰性群で 63.6%であった。治療 29 日以外のタイムポイントでは ctDNA 検出と治療予後との関連は認められなかった。

【結論】

非小細胞肺癌患者に対するニボルマブ治療開始 1 か月後の ctDNA 検出は治療予後予測因子である可能性がある。

略語

本文中において以下の略語を用いた，
なお，本文中，初出の箇所の（）内に略語を示し，以後は略語を使用した．

ccfDNA	circulating cell-free DNA
CHIP	clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CI	confidence interval
COSMIC	catalogue of somatic mutation in cancer
CR	complete response
ctDNA	circulating tumor DNA
dMMR	mismatch repair deficiency
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGFR-TKI	epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor
ICIs	immune checkpoint inhibitors
IHC	immunohistochemistry
irAE	immune-related adverse event
MSI	microsatellite instability
NGS	next generation sequencing
NOIR-SS	non-overlapping integrated reads sequencing system
NSCLC	non-small cell lung cancer
OR	objective response
ORR	objective response rate
OS	overall survival
PD	progressive disease
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death-ligand 1
PFS	progression-free survival
PR	partial response
SD	stable disease
TMB	tumor mutational burden
WES	whole-exome sequencing

第1章 序論

1-1. 免疫チェックポイント阻害薬とその課題

免疫チェックポイント阻害薬（immune checkpoint inhibitors : ICIs）は自身の免疫機能を利用して抗がん作用を発揮する新たな種類のがん治療薬であり¹，従来の抗がん剤に比べ，広範ながんに高い効果を示すことが明らかとなり，注目を集めている．本邦においても2014年の抗 programmed cell death protein 1（PD-1）抗体ニボルマブ^{2,3}を皮切りに，2015年には抗 cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4（CTLA-4）抗体イピリムマブ⁴，2016年には抗 PD-1 抗体ペンブロリズマブ^{5,6}，抗 programmed cell death-ligand 1（PD-L1）抗体アベルマブ⁷と続々と薬事承認が為され，様々ながん種に適応が認められている【表1】．

【表1】本邦で製造販売承認されている免疫チェックポイント阻害薬一覧

ターゲット	一般名	製品名	本邦製造販売承認	主な適応	標準的な用法・用量	薬価（年間/レジメンあたり薬剤費）
抗PD-1抗体	ニボルマブ	オプジーボ	2014年7月	<ul style="list-style-type: none"> 悪性黒色腫 切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌 根治切除不能又は転移性の腎細胞癌 再発又は難治性の古典的ホジキンリンパ腫 再発又は遠隔転移を有する頭頸部癌 がん化学療法後に増悪した治療切除不能な進行・再発の胃癌 がん化学療法後に増悪した切除不能な進行・再発の悪性胸膜中皮腫 がん化学療法後に増悪した治療切除不能な進行・再発の高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-High）を有する結腸・直腸癌 がん化学療法後に増悪した根治切除不能な進行・再発の食道癌 	1回 240 mg を2週間間隔で点滴静注	413,990円 / 240 mg (10,763,740円 / 年間)
	ペムブロリズマブ	キイトルーダ	2016年9月	<ul style="list-style-type: none"> 悪性黒色腫 切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌 再発又は難治性の古典的ホジキンリンパ腫 がん化学療法後に増悪した根治切除不能な尿路上皮癌 がん化学療法後に増悪した進行・再発の高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-High）を有する固形癌（標準的な治療が困難な場合に限る） 根治切除不能又は転移性の腎細胞癌 再発又は遠隔転移を有する頭頸部癌 	1回 200 mg を3週間間隔で点滴静注	242,355円 / 100 mg (8,240,070円 / 年間)
抗CTLA-4抗体	イピリムマブ	ヤーボイ	2015年7月	<ul style="list-style-type: none"> 根治切除不能な悪性黒色腫 根治切除不能又は転移性の腎細胞癌 	1回 3 mg/kg（体重）を3週間間隔で4回点滴静注	493,621円 / 50 mg (7,897,936円 / レジメン*)
	アベルマブ	バベンチオ	2017年9月	<ul style="list-style-type: none"> 根治切除不能なメラノーマ細胞癌 根治切除不能又は転移性の腎細胞癌 切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌 	1回 10 mg/kg（体重）を2週間間隔で点滴静注	196,289円 / 200 mg (30,621,084円 / 年間*)
抗PD-L1抗体	アテゾリズマブ	テセントリク	2018年1月	<ul style="list-style-type: none"> 進展型小細胞肺癌 PD-L1陽性のホルモン受容体陰性かつHER2陰性の手術不能又は再発乳癌 	1回 1200 mg を3週間間隔で点滴静注	637,152円 / 1200 mg (10,831,584円 / 年間)
	デュルバルマブ	イミフィンジ	2018年7月	<ul style="list-style-type: none"> 切除不能な局所進行の非小細胞肺癌における根治的化学放射線療法後の維持療法 	1回 10 mg/kg（体重）を2週間間隔で点滴静注	115,029円 / 120 mg (29,907,540円 / 年間*)

このように新たながんの治療薬として期待される ICIs ではあるが，その一方で多くの課題が存在する．一つ目は効果の個人差である．ICIs の奏効率は，がん種により異なるものの，平均すると約 24%に留まることが明らかとなっている⁸．従来の抗がん剤と比べて高い有効率であるが，投与を受けた患者がみな効果を得られるわけではない．

二つ目は画像的な効果の判定が難しいことである．一般的に抗がん剤の効果は CT 等による画像診断での腫瘍径の増減で評価される⁹．ICIs 投与症例

の中には、一過性の腫瘍増大を示した後には有効になるケースが～10%程度存在することが明らかとなっている¹⁰。この現象は **pseudoprogression** と呼ばれ、他の抗がん剤には認められない、ICIに特異的な現象である。**Pseudoprogression** は、ICI投与により活性化した免疫細胞が腫瘍に浸潤することより起こると考えられている¹¹。ICIは画像的な効果発現までに2～3ヶ月程度を擁すると報告されているが¹²⁻¹⁴、これはあくまで中央値である。**Pseudoprogression**の有無により、ICIの効果は画像的に観察されるまでの期間は症例によりばらつくため、ICIの（画像による）効果判定はその適切な時期を含め、これまでの抗がん剤にはない難しさがある。

三つ目は重篤な副作用が生じることである。これらはICIの免疫活性化作用に起因するものであり、免疫関連副作用（**immune-related adverse event : irAE**）と呼ばれる¹⁵。irAEには間質性肺障害、消化管穿孔、心筋炎、劇症1型糖尿病などが含まれる¹⁶。irAEの発生頻度は高く、PD-1/-L1阻害薬では約70%にも上る（重篤なものは15%）¹⁷。irAEは投薬を中止しても持続するケースが多く、何よりがん治療分野で経験したことのない副作用であることから、臨床現場ではその発生・対策に慎重に注意を払う必要がある。

課題の四つ目は高価な薬剤費である。本邦では2014年7月のメラノーマへの承認以降、適応拡大とともに段階的に薬価が引き下げられたものの、現在でも年間約1000万円の薬剤費が必要であり【表1】、患者のみならず医療経済的にも大きな負担となっている。効果が見込めない症例へのICI投与は、国民に多大で報われない医療費負担をもたらすこととなる。

1-2. 免疫チェックポイント阻害薬の効果予測バイオマーカー

前述した課題の解決のため、薬剤投与前に有効症例を特定（予測）するバイオマーカーの探索研究が精力的に行われてきた。以下に主なものを紹介する。

1-2-1. PD-L1発現

腫瘍組織のPD-L1発現は、コンパニオン診断薬として早くから臨床応用されたバイオマーカーである¹⁸⁻²¹。その発現は主に免疫組織化学染色法（**immunohistochemistry : IHC**）により判定される。特に非小細胞肺癌や頭頸部癌へのICI投与の判断に用いられている。抗PD-1抗体ペンブロリズマブの非小細胞肺癌への投与は、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」（Agilent）を用いて測定されるTumor Proportion Score（TPS）を参考に決定される。TPS

は数値が高いほど PD-L1 の発現が高いことを示す。そのバイオマーカーとしての有効性は Garon らにより評価されており、ペンプロリズマブの投与を受けた全集団 495 名では奏効率 19.4%，progression-free survival (PFS) 3.7 か月，overall survival (OS) 12.0 か月であるのに対し，TPS \geq 50%の集団ではそれぞれ 45.2%，6.3 か月，not reach と，PD-L1 が高発現する群で薬剤効果が良好であることが示されている¹⁹。

このようにバイオマーカーとして一定の評価がなされている PD-L1 IHC であるが，一方で課題も存在する。一つ目は精度である。前述のように TPS \geq 50%でも奏効率は 45%とその予測精度は完全ではなく，陽性と判定される患者でも ICIs が奏功しない症例が少なからず存在する（その逆も然り）。その感度，特異度は modest であり，より予測精度が高いバイオマーカーが求められている。また，PD-L1 IHC は，評価されたすべての臨床試験でその層別化の効果が得られているわけではなく，マーカーとしての有用性には制限がある²²。さらには検査試薬が治療薬ごとに異なるということも臨床応用上の課題となっている。ペンプロリズマブでは前述のとおり PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」が使用されるが，ニボルマブでは PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」(Agilent)，アテゾリズマブではベンタナ OptiView PD-L1 (SP142) (ロシュ・ダイアグノスティックス) とそれぞれ専用の試薬を用いた検査が必要である。一つの検査薬で複数の治療薬に対応するための検査薬のハーモナイゼーション研究なども行われている^{23,24}が，現時点で統一した見解は得られていない²⁵。

1-2-2. ミスマッチ修復異常

ICIs が臨床応用されて間もない 2015 年には，ミスマッチ修復異常 (mismatch repair deficiency : dMMR) を示す大腸癌ではペンプロリズマブ投与で 40%の奏効率が得られたのに対し，MMR 正常症例群では 0%であったことが報告された²⁶。これは，dMMR が存在することでより多くの体細胞遺伝子変異を生じ，結果，より多くの免疫原性産物 (neoantigen) が産生され，免疫細胞が攻撃対象として認識しやすくなるためと考えられている。dMMR は DNA 複製時にエラーが起きやすいマイクロサテライト配列 (1-数塩基の繰り返し配列) を腫瘍細胞と正常細胞で比較することで調べることが出来る。実際に，マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability : MSI) と ICIs の効果には関連が認められており^{21,27}，本邦でも近年，MSI 検査がペンプロリズマブとニボルマブのコンパニオン検査として薬事承認された。しかし，dMMR/ high-frequency MSI (MSI-H) は，大腸癌では 6-13%と比較的高い頻度で認められるものの，本研究の対象である肺癌を含めた他の癌では必ずし

も高くはなく^{28,29}，検査が活用できる場（癌の種類）は限定される。

1-2-3. Tumor mutational burden (TMB)

dMMR/MSI-H の頻度が少ない肺癌では，非喫煙者に比べ，喫煙者において ICI の奏効率が高いことが報告されている³⁰。また，喫煙者ではより多くの体細胞遺伝子変異が蓄積することが明らかとなっており³¹，dMMR 症例と同様のメカニズムで ICI が有効であると考えられている。これらの知見から，実際に腫瘍の体細胞突然変異の頻度や数 (tumor mutational burden: TMB) と ICI の奏効率との関連が検証され，TMB が高い症例で ICI 効果が高いことが明らかとなった^{30,32}。また，その関連は肺癌だけに限定されるものではなく，癌腫横断的な傾向が認められていることから³³，TMB は promising な ICI 効果予測因子として注目を集めている。

一方，TMB にも課題がある。大きな課題の一つは PD-L1 と同じくその精度である。非小細胞肺癌患者 500 例について TMB と ICI の効果を調べた報告によると，TMB の増大により奏効率は上昇するものの，その予測精度は ROC 曲線下面積 (receiver operating curve - area under the curve : ROC-AUC) で 0.614，最適カットオフでの感度は 61.8%，特異度は 57.3% と，その予測パフォーマンスは極めて低い³⁴。また，非喫煙者やドライバー遺伝子を有する症例群では，TMB と ICI 効果の間に関連が認められていない³⁴。

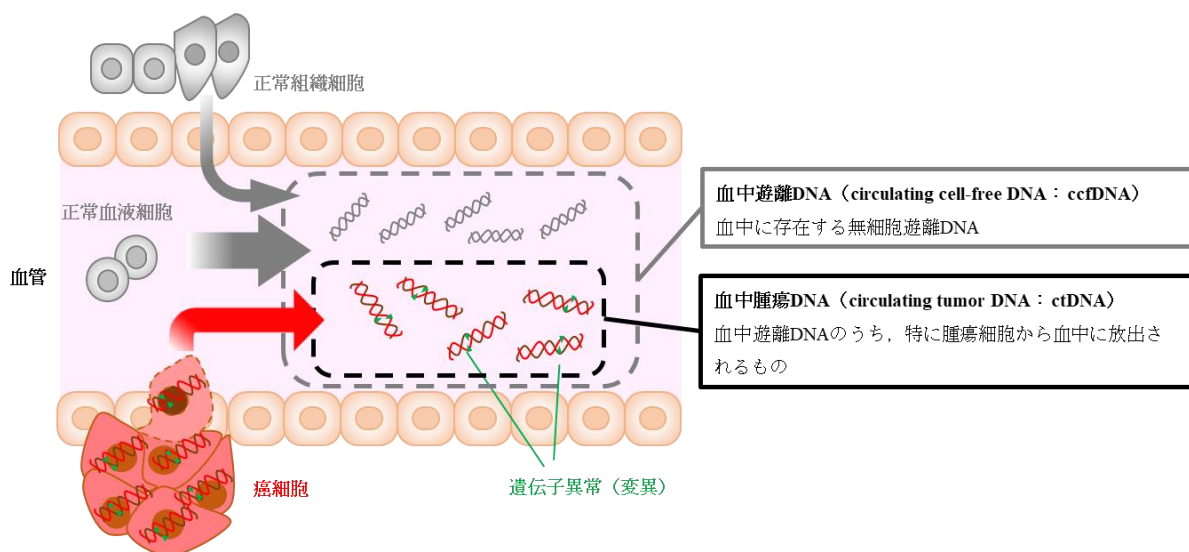
第二の課題はコストである。TMB は通常，全エクソン領域を対象とした次世代シーケンス (whole-exome sequencing : WES) により測定される。腫瘍における体細胞変異の変異率は，生殖細胞系列変異に比べて低い。このため，TMB の検出は locus あたりのカバレッジ (読み取る回数) を通常の WES よりも多くとる必要があり，シーケンスコストは大きくなる。さらに，生殖細胞系列変異を除外するため正常細胞 (組織) の検体も同時に解析する必要があり，その検査のためさらにコストがかかる。近年，解析領域を絞ったターゲットパネルにおいて WES の TMB が近似できることが示され^{35,36}，コストは一部軽減したが，それでも本邦で薬事承認されたパネル検査 (FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル (中外製薬)，OncoGuide NCC オンコパネルシステム (シスメックス)) は 56 万円 (保険適用価格) であり，患者みなぎ費用を気にせず受けられる検査ではない。一方，ターゲットパネルを用いる場合，パネル間で結果に差が生じることも課題となっている。これは，パネルの検査対象領域 (遺伝子数)，解析方法 (変異のコール方法，生殖細胞系列変異の除外の仕方，解析対象変異の種類) が異なることが影響している^{22,37}。ターゲットパネル検査の標準化の必要性が議論され，目下評価が進んでいる³⁸。

以上、ICIs の治療効果を予測するバイオマーカーとして、腫瘍の PD-L1 発現や dMMR/MSI-H, TMB が精力的に研究されてきたが、その予測精度、検査利便性を含め、必ずしも臨床現場が満足できる状況ではなく、新規のバイオマーカーの開発が求められている。

1-3. 血中腫瘍 DNA (ctDNA) 概論

1-3-1. 血中遊離 DNA (ccfDNA)

血液には本来細胞内に存在するはずの DNA が遊離した状態で存在している【図 1】。これらは血中遊離 DNA (circulating cell-free DNA : ccfDNA) と呼ばれる。主に細胞死により細胞から放出され、健常者ではその由来のほとんどが造血系細胞であることが知られている³⁹。ccfDNA は約 170bp の短い DNA 断片として検出されるが、これはゲノム DNA がアポトーシスや血中のヌクレアーゼによりヌクレオソーム単位で分解されるためと考えられている⁴⁰。



【図 1】 血中遊離 DNA と血中腫瘍 DNA

健常者における ccfDNA は極めて微量であり、その血漿濃度は約 1～10ng/mL である⁴¹。ccfDNA はがんや感染症のほか、脳梗塞、臓器移植、運動などで増加することが知られている^{40,42}。ccfDNA の半減期は極めて短く、分娩後母体からの胎児由来 ccfDNA の消失に関する研究から 16 分⁴³、手術

後の癌患者の癌由来 ccfDNA の消失に関する研究から 114 分と推定されている⁴⁴. ccfDNA の消失経路については, 血中ヌクレアーゼによる分解のほか, 肝臓のクッパー細胞, 脾臓マクロファージによる取り込みや腎排泄などが考えられている⁴⁰.

1-3-2. 血中腫瘍 DNA (ctDNA)

前述の ccfDNA は血中に存在する遊離 DNA の総称であるが, そのうち特に癌患者の腫瘍に由来する ccfDNA を ctDNA (circulating tumor DNA) と呼ぶ【図 1】. ctDNA の存在が初めて確認されたのは 1977 年で, 癌患者の ccfDNA 濃度が健常者に比べて高いことが Leon らにより報告された⁴⁵. 1980-90 年代には, 癌患者で増加する ccfDNA が癌細胞に由来すること⁴⁶, さらにはこれらが癌に特有な遺伝子変異に基づいて検出されることが明らかとなった⁴⁷. 以降, ccfDNA を用いて癌に特異性が高い遺伝子変異を測定することで, それを ctDNA と同定する手法が主流となった. 近年, 腫瘍に由来する ccfDNA の鎖長が正常細胞のものに比べて短いことが明らかとなり, 長さを考慮に入れた検出も考案されている⁴⁸.

癌患者で検出される ctDNA 量は一律ではなく, 癌の種類, 進行度により変動することが報告されている⁴⁹. 癌腫横断的な調査から, 膀胱癌, 大腸癌, 胃・食道癌, 膵臓癌, 乳癌では ctDNA の検出率が高く, 腎臓癌, 甲状腺癌, 前立腺癌, グリオーマでは低いことが明らかとなっている⁴⁹.

1-4. ctDNA の検出方法

ctDNA は腫瘍細胞に特徴的な DNA 異常を有しているため, それらをターゲットとすることで正常細胞由来 ccfDNA と区別して検出することができる. 一塩基置換, 挿入, 欠失, コピー数異常, DNA メチル化などが検出対象として挙げられるが, 前者 3 つ (遺伝子変異) による検出が主流である. 実際に, 腫瘍組織の DNA と ctDNA で検出される遺伝子変異の一致率が極めて高いことが報告されている⁵⁰⁻⁵².

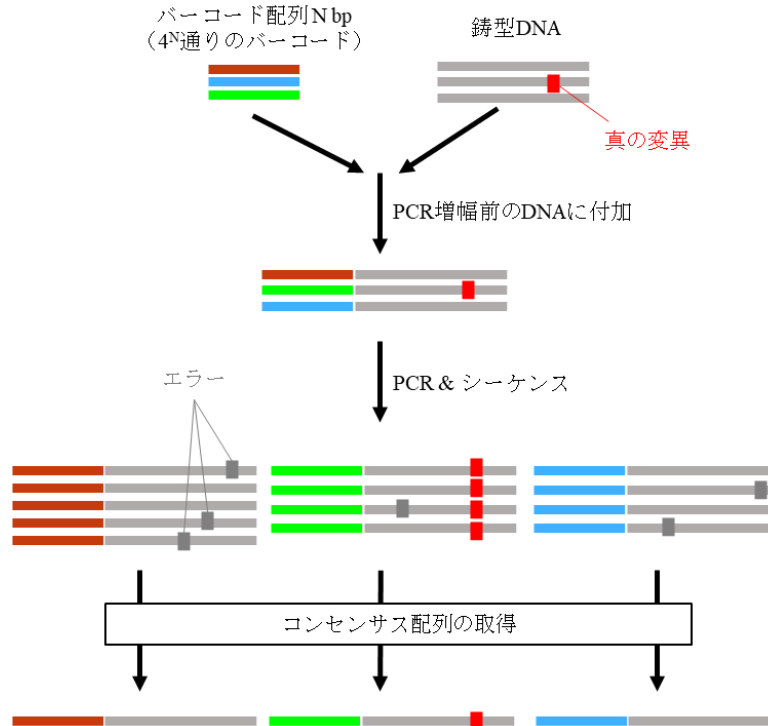
ctDNA は血中に含まれる絶対量が少なく, かつ ccfDNA に占める割合が極めて小さい. そのため, 測定には高感度な検出系が必要となる. 検査法として主なものに, アレル特異的 PCR 法, デジタル PCR 法, 次世代シーケンス法 (next generation sequencing : NGS) などがある. 近年ではデジタル PCR または NGS を用いる手法が主流である. 本項では特に本研究に関連する内容として, NGS を用いた手法について概説する.

1-4-1. 次世代シーケンス法 (NGS)

次世代シーケンス法 (next generation sequencing : NGS) は、数千～数十億もの DNA 断片の塩基配列を超並列に読み取る手法である。シーケンス前に DNA のクローン増幅工程 (PCR) が存在するが、この工程はデジタル PCR と同様の原理である。1 つのクローンから得られた DNA 配列をリードと呼び、変異をもつリード数と正常リード数をカウントすることにより、変異率を算出することができる。リード数は読み取りたい DNA の領域の広さ、および感度に影響する。全ゲノム解析、エクソーム解析など広い領域の解析にも対応できるが、リード数に限界がある (厳密にはコストがかかる) ため、一定の感度を確保したい場合には、ターゲットとする領域のみを濃縮してシーケンスするパネル解析が行われる。癌の遺伝子解析では、数十～数百の遺伝子を対象とするパネル解析が主流である。

NGS はデジタル PCR と比べて、一度に解析できる変異数が圧倒的に多いが、感度が低い (1%前後)⁵³。これは、シーケンス前の PCR 増幅工程およびシーケンス時にエラーが生じるためと考えられている。しかし、近年、分子バーコード法の登場により、NGS でもデジタル PCR 法に匹敵する検出感度 (約 0.01～0.5%) での変異検出が可能となった⁵³。分子バーコード法では、ライブラリ調製の初期工程において、数塩基～十数塩基の短いランダムな DNA 配列を個々の DNA 分子に付加する。PCR 増幅、シーケンスの後、解析時に同一バーコードに由来する複数のリードのコンセンサスをとることでエラーが低減される【図 2】。現在では、NGS を用いた ctDNA 解析は分子バーコード法が主流となっている。分子バーコードを用いた実験系としては、Sefe-SeqS⁵⁴ (ジョンズ・ホプキンス大)、TAm-Seq⁵⁵ (Cancer Research UK Cambridge Research Institute)、CAPP-Seq⁵⁶ (スタンフォード大)、Digital Sequencing⁵⁷ (Guardant Health 社)、Oncomine cfDNA assay⁵⁸ (Thermo Fisher Scientific 社) などがある。

分子バーコード法により NGS の解析精度は向上したが、一方でバーコード自体にエラーが生じ、正確な分子数の測定に支障を来す可能性がある⁵⁹。これに対し、著者らのグループは、バーコードに生じたエラーをモニタリングし、一定の基準でそれらリードを除去することで DNA 分子数をより正確に測定することができる NOIR-SS (non-overlapping integrated reads sequencing system) を開発した^{60,61}。本法は、本研究で使用した ctDNA 検出手法であり、次項にて詳しく説明する。



【図 2】 分子バーコード法

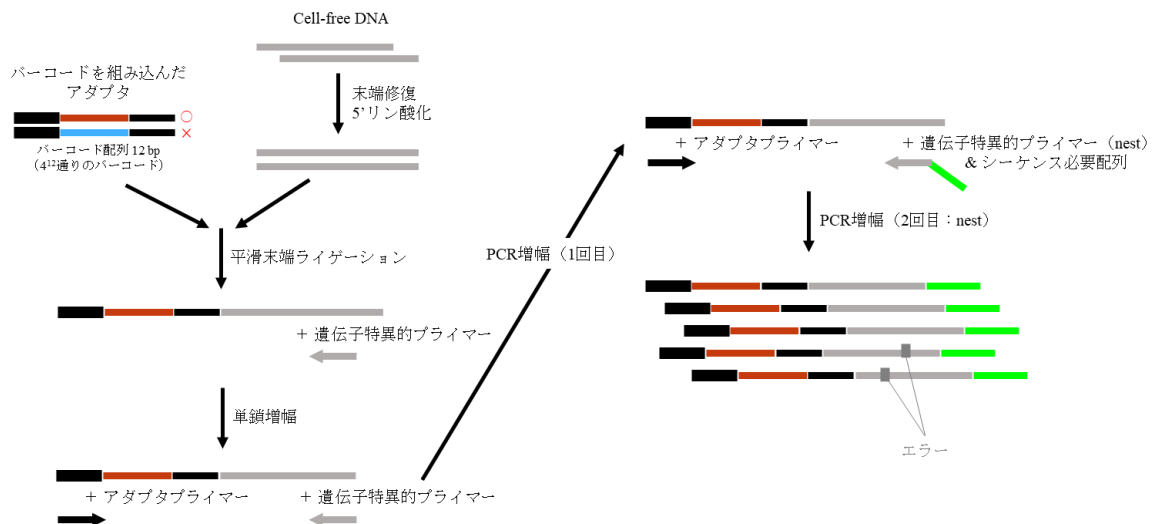
PCR 増幅の前に鋳型 DNA とランダムな配列を持つバーコード配列（通常十数塩基：4^N通り）を付加（ライゲーション反応あるいはバーコード配列を組み込んだプライマーで2-4サイクルPCR増幅を行う）する．その後，PCR 反応でライブラリをシーケンス可能な量に増幅し，シーケンスを行う．PCR 反応およびシーケンスの工程でエラーが生じるが，これらエラーは解析の段階で，同じ分子バーコードに由来する配列のコンセンサス（多数決一致）を取ることで除去できる．エラーの補正は，特に ctDNA のような，変異率が少ないものを正確に捉える場合に必要である．

1-4-2. NOIR-SS (non-overlapping integrated reads sequencing system) 法

NOIR-SS は，バーコードに生じたエラーの補正のほか，いくつかの特徴を有する^{60,61}．以下に実験工程，解析工程に分けてそれを解説する．

NOIR-SS の実験工程を【図 3】に示した．NOIR-SS では，まず，末端修復を行った ctDNA を対象に，バーコード配列を組み込んだアダプターを平滑末端ライゲーションする．バーコード配列はランダムな 12 塩基であり，理論的には 4¹²通り，つまり 16,777,216 種類のバーコード配列の準備が可能となる．その後，片側の遺伝子特異的プライマーで単鎖増幅 (linear amplification) を行うが，これは増幅の初期のエラーを抑制するためである．さらに，なお，ここで用いる遺伝子特異的プライマーは複数種類の混合が可能であり，ターゲット領域が複数箇所ある場合，マルチプレックス反応が可能である．その後，その反応系にアダプターの共通配列に対するプライマーを加え，PCR 増幅を行う．その後，同じくアダプタープライマーと，増幅産物の特異性を上

げるための nest の遺伝子特異的プライマーを加え，2 回目の PCR を行う．この遺伝子特異的プライマーには各 NGS システムの読み取りに必要な配列が付加されている．2 回目の PCR もマルチプレックスにて反応が可能である．

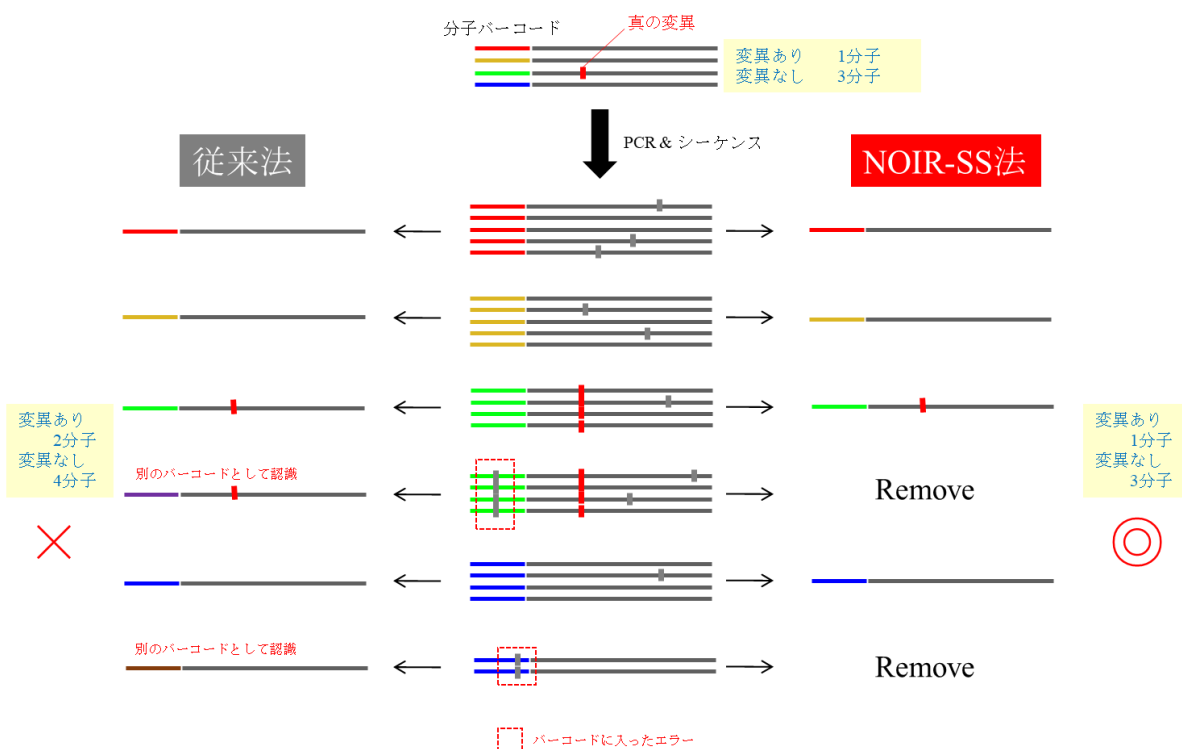


【図 3】 NOIR-SS の実験工程

図の説明は本文参照．

NOIR-SS の特徴としては，遺伝子の増幅が片側プライマーによることである．これにより，パートナー遺伝子が不明な融合遺伝子などの検出が可能となる．また，遺伝子特異的プライマーは混合してマルチプレックス反応が可能なこと，さらに，もう一方の側のプライマーはアダプター配列に組み込まれた共通配列に対するプライマーとなっており，全反応に共通したプライマーを用いることができ，実験工程が簡便に行えるようになっている．

先に述べたように，NOIR-SS では分子バーコードに入ったエラーリードを除去することが出来る．この効果について【図 4】に図示した．PCR 反応あるいは DNA シーケンスの際に分子バーコードにエラーが入った場合，従来法では，その分子は別のバーコードと認識されてしまうため，分子数が真の値よりも多く検出されてしまう【図 4 左側】．しかし，NOIR-SS ではこれらバーコードに生じるエラーをモニタリングし，真の分子の損失を抑えた上で，エラーリードが多く含まれるフラクションを除去することができる【図 4 右側】．エラー分子は分子バーコードあたりのリード数が少ないフラクションで起こることが明らかとなっていることから^{59,60}，NOIR-SS ではエラーのないバーコードの割合が 90%未満のフラクションを除去することにより，正確な分子数の計測を可能としている⁶⁰．著者らのグループはこれまでに，NOIR-SS を用いて胃癌，肺癌，膵臓癌患者の ctDNA の検出に成功している^{60,61}．



【図 4】 分子バーコードにエラーが入ることの影響

スタートの鋳型 DNA として変異ありが 1 分子、なしが 3 分子あったとする。これを分子バーコード法にて NGS 実験を行うと、PCR およびシーケンスの工程でエラーが生じる（灰色箇所）。このエラーはバーコード部分にも生じる可能性がある（赤点線箇所）。バーコード部分にエラーが生じると、それは元のバーコード配列とは異なるものとなるため、解析工程で別の分子として認識され、分子数が多く検出されてしまう（上記の例では、変異ありの分子が 1 分子、なしの分子が 1 分子、当初の分子数よりも多く検出される）。一方、NOIR-SS 法では、独自のアルゴリズムにより、分子数の損失を抑えつつ、エラーの出やすいリードフラクションを除去することで、真の分子数を検出することが出来る。

また、著者らのグループは、健常者の ccfDNA を NOIR-SS で解析した際、健常者にも関わらず遺伝子変異が検出されるケースを経験した⁶¹。これは、現在では、加齢とともにクローン性造血 (clonal hematopoiesis of indeterminate potential: CHIP) を伴う遺伝子変異が生じることに起因すると考えられている⁶²。そこで、NOIR-SS で検出された遺伝子変異をそのまま腫瘍由来変異と判定することは難しいと結論し、その対策として、腫瘍特異的な変異の濃縮が可能なバイオインフォマティクフィルター CV78 を開発した⁶¹。これは、腫瘍遺伝子変異データベースである catalogue of somatic mutation in cancer (COSMIC) の version 78 のカタログに登録がない変異、および登録数が少ないもの (1 以下, TP53 のみ 9 以下) を腫瘍特異的な変異ではないとして、NOIR-SS で検出された変異リストから除く処理である。CV78 フィルターは、COSMIC が腫瘍特異的な体細胞突然変異を網羅していること、さらに、COSMIC に登録されている検体数が少ないエントリーはエラーの可能性があること、以上 2 点の仮定のもとで処理される。実際にこの CV78 フィルタ

一処理を行うことで、健常者 ccfDNA にて検出された遺伝子変異は除去され、一方、癌患者の変異については除外されずに残存することが確認されている⁶¹。NOIR-SS と CV78 フィルターを組み合わせることで、極めて効率的に CHIP を除外した腫瘍由来変異 (ctDNA) の検出が可能であることが検証されている。

1-5. ctDNA 検査の有用性 : ctDNA によるがん治療の効果の早期判定 (予測) に関する知見

ctDNA は血液で検査可能なため、手術や生検をとまなう組織検査に比べて患者の負担が少ないというメリットがある。また、ctDNA は半減期が極めて短く、かつその量が腫瘍負荷量と相関することから、リアルタイムに癌の病勢および遺伝子変化をモニタリングすることが可能である。さらに、ctDNA は癌に特有な変異を対象に検出されるため、従来の血清癌マーカーに比べて極めて特異性が高い点も有用である。

これらのバイオマーカーとしての特徴が注目され、ctDNA は癌患者マネージメントの様々なステージ (早期発見^{61,63,64}, 治療薬剤の選択⁶⁵⁻⁶⁷, 耐性変異の検出⁶⁷, 再発の早期判定^{68,69}, 術後残存病変の検出⁷⁰⁻⁷², 治療効果の早期判定・予測) においてその活用が期待されている。以下、本研究に関連する内容として、「治療効果の早期判定・予測」に関する知見について解説する。

がんの病勢の評価は、通常、CT による画像評価で行われるが、ctDNA 変化がこれら画像による病勢変化よりも早く起こるといふ知見が蓄積しつつあり注目されている。特に、がん治療開始後“早期”の ctDNA の変化が、その後の治療効果 (腫瘍サイズ変化, 無増悪生存期間 (progression free survival : PFS), 生存期間 (overall survival : OS)) と関連するという事象が様々な癌腫で報告されている。選択した治療の効果が早期に判定・予測できることの意義は、臨床的にも、医療経済的にも大きい。

Tie らは大腸癌患者を対象に、化学療法 2 サイクル目を開始するまで (治療開始後 3 週以内) の早期の ctDNA の変化を測定し、ctDNA の変化が治療 8-10 週後の腫瘍の縮小効果と関連することを示した⁷³。また Osumi らにより大腸癌を対象に同様のスタディが行われ、治療 8 週後の ctDNA 変化が腫瘍縮小効果のみならず PFS, さらに OS と関連することが明らかになった⁷⁴。

大腸癌以外では、卵巣癌において、化学療法 1 サイクル後の ctDNA を測定し、ctDNA の減少率が 60%未満の症例で無増悪期間が短縮されることが

報告されている⁷⁵。同様に乳癌でも、複数の治療薬で治療開始後早期（～1か月）の ctDNA の変化が PFS と関連する旨が報告されている^{76,77}。また、肺癌では、上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor : EGFR）遺伝子変異を対象とした ctDNA の検出・モニタリングの知見が数多く蓄積しており、ctDNA の分子標的治療薬開始後早期の変化が腫瘍縮小効果や長期予後と関連することが多々報告されている⁷⁸⁻⁸²。

これらの知見の多くは、治療後早期（～治療開始後 2 か月）の ctDNA の減少、あるいは陰性化が認められた症例群で、画像による腫瘍径の評価、あるいは生存期間による治療効果が高いことを報告したものである。一方、治療開始後、一時的な ctDNA の増加（スパイク）が検出される例で治療効果が高いという報告も散見される^{83,84}。このスパイクは治療に反応した腫瘍細胞の破壊を捉えたものと考えられている⁵³。スパイクが検出されるタイミングは治療法（の機序）により異なると考えられ、肺癌への EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-tyrosine kinase inhibitor : EGFR-TKI）治療では治療開始後～1か月⁸³、メラノーマへの腫瘍浸潤 T 細胞療法では治療開始後～約 1 週間と報告されている⁸⁴。スパイクの検出は、同一の治療法でも個人差があること、タイミングよく検査ができるかどうかなどの課題はあるものの、ctDNA の減少・陰性化が起こるより早く治療反応が捉えられる可能性があり、予後との関連も含め、さらなる知見の蓄積が期待されている。

以上の ctDNA によるがん治療効果の早期判定（予測）に関する知見は、主に従来の治療（化学療法や分子標的治療薬）に関するものがほとんどである。ICIs を対象とした報告はごく僅かであり⁸⁵⁻⁸⁸、それら研究も症例数が少ない、採血ポイントが規定されていないなどエビデンスとしてはまだまだ不十分なものが多い。

1-6. 本研究の目的

以上のがん治療薬としての ICIs の課題、および ctDNA のがん治療効果の早期判定バイオマーカーとしての可能性を鑑み、本研究では、ICIs の治療開始後 1 か月までの ctDNA を経時的に測定し、その動態により治療効果が予測可能かどうかを検証することとした。癌の種類としては、患者数が多く、ICIs による治療が最も多く行われている肺癌を対象とした。また、治療に用いる ICIs としては、本邦で最も早く臨床応用されたニボルマブ（商品名：オプジーボ）を対象とした【表 1】。ctDNA の測定には著者らのグループが開発した高感度 DNA 検出法である NOIR-SS 法（1-4-2 項参照）を用い、本研究のために肺癌遺伝子の検出に特化した NOIR-SS 肺癌パネルを設計し、解析に用いることとした。ctDNA 測定のポイントは、治療前、治療開始後 4

時間および 2, 8, 15, 29 日と厳密にコントロールし, 臨床応用につながる知見を得ることを目的とした.

第2章 材料と方法

2-1. 研究体制

本研究は、大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（大阪府大阪市中央区）および株式会社DNAチップ研究所（東京都港区）との共同研究として行った。大阪府立病院機構大阪国際がんセンターでは肺がん患者からの検体採取および臨床情報収集を、DNAチップ研究所では次世代シーケンサーによるシーケンスデータ取得を行った。検体を用いた実験、およびシーケンスデータ解析、臨床情報との関連解析については、奈良先端科学技術大学院大学にて著者が行った。

2-2. 検体および臨床情報の収集

- ・倫理審査委員会の承認

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学倫理審査委員会、ならびに大阪国際がんセンター倫理審査委員会の承認のもと行った。

- ・対象症例の選択基準

非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer : NSCLC）患者のうち、二次治療としてニボルマブ投与を予定している患者を適格とした。3ヶ月の生存の期待できない患者、HIV, HBV, HCV の感染が証明されている患者は除外した。このうち、本研究に対する文書による同意が取得できた患者を本研究に登録した。

- ・ニボルマブの投与

通常の用法に従い、原則1回240mgを2週間間隔で点滴静注した。

- ・血液検体の取得

1被験者あたり、6つのタイムポイント（治療前、初回治療4時間後および2日、8日、15日、29日後）において5mLの血液を採取した。なお、採血日は±2日のずれを許容した。採血後24時間以内に血漿分離を行い、分離した血漿はDNA抽出まで-80℃冷凍庫にて保管した。

- ・臨床情報の取得

年齢、性別、喫煙歴、肺癌組織型、治療履歴等の被験者背景情報を取得し

た。ニボルマブ治療効果の評価は、CT 画像による腫瘍径評価、無増悪生存期間（progression-free survival : PFS）、全生存期間（overall survival : OS）により行った。CT 画像による腫瘍径の評価は、治療前、治療 4 週後、8 週後、12 週後、16 週後、6 か月後に response evaluation criteria for solid tumors (RECIST) ver1.1 に基づき行った。

- ・ ctDNA 検出法の変異検出性能確認用の検体

本研究で用いる NOIR-SS 肺癌パネルの変異検出性能を確認するため、変異率が明らかな市販の DNA 検体を購入して使用した。Multiplex I cfDNA (Horizon Discovery) は、リキッドバイオプシーによる cfDNA 解析用の標準検体であり、変異を導入した細胞株由来のゲノム DNA を ccfDNA に特徴的な鎖長（平均 160-170bp）になるよう断片化して作られたものである。特定の遺伝子変異について、0.1、1、5%の変異率が含まれるように調製されている。

2-3. ccfDNA の抽出・クオリティチェック

- ・ 血漿量の調整

5 mL 血液から得られた血漿が 2 mL に満たない場合、PBS (Thermo Fisher Scientific, 以降 Thermo と記載) を添加し、2 mL にメスアップした。

- ・ ctDNA の抽出

QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) を用いて、2 mL の血漿から DNA の抽出を行った。抽出はキットのマニュアルに従い行った。抽出作業は PCR 産物のコンタミネーション防止のため、クリーンベンチ内で行った。

- ・ 2 本鎖 DNA 量の測定

Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit および Qubit 2.0 Fluorometer (いずれも Thermo) を用いて、抽出 ccfDNA 検体中の 2 本鎖 DNA の濃度測定を行った。測定は 1 μ L の ccfDNA 抽出液を用い、キットのマニュアルに従い行った。

- ・ 2 本鎖 DNA 鎖長分布の測定

Agilent High Sensitivity DNA キットおよび Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム (いずれも Agilent) を用いて、抽出 ccfDNA 検体中の 2 本鎖 DNA の鎖長分布の測定を行った。測定は 1 μ L の ccfDNA 抽出液を用

い、キットのマニュアルに従って行った。

2-4. NOIR-SS 肺癌パネルの設計・検体カバー率の推定

本研究は NSCLC 症例を対象とするため、NSCLC で頻度の高い変異を重点的にカバーできるようなプライマーセット (NOIR-SS 肺癌パネル) を設計した【表 2】。今後、作成したパネルを分子標的薬の耐性変異の検出にも使用するため、耐性変異が生じることが知られている箇所もカバーすることとした。NSCLC で頻度の高い変異および耐性変異はがん関連体細胞変異データベース⁸⁹ (catalogue of somatic mutations in cancer : COSMIC) で調査し、抽出した。

また、設計した NOIR-SS 肺癌パネルがどの程度の NSCLC 症例をカバーできるか確認するべく、COSMIC データベースより NSCLC の原発巣手術検体、1451 検体のデータを取得し、【表 2】に示した解析対象領域で体細胞変異が検出される検体の割合を算出した。

【表 2】 NOIR-SS 肺癌パネルの解析対象領域

Gene name	Cocktail-1 (f primer set)			Cocktail-2 (r primer set)		
	Region name	Genome	Amino acid	Region name	Genome	Amino acid
ALK	1f	chr2:29432654-29432731	1253-1278	2r	chr2:29443653-29443731	1172-1188
	2f	chr2:29443577-29443658	1187-1214			
	3f	chr2:29445243-29445320	1151-1161			
BRAF	2f	chr7:140453103-140453177	586-611			
EGFR	4f	chr7:55241614-55241715	695-721	4r	chr7:55241653-55241736	701-726
	5f	chr7:55242412-55242488	729-753	5r	chr7:55242461-55242540	744-761
	8f	chr7:55259506-55259584	855-875	6r	chr7:55249018-55249096	772-798
ERBB2	1f	chr17:37880213-37880287	753-769	2r	chr17:37880984-37881061	771-797
	2f	chr17:37880954-37881033	770-788	3r	chr17:37881377-37881453	857-882
	3f	chr17:37881325-37881402	839-865			
KRAS	2f	chr12:25380261-25380337	41-66	1r	chr12:25398241-25398311	3-26
MET	4f	chr7:116411879-116411954	981-998	4r	chr7:116411927-116411997	989-1012
TP53	1f	chr17:7579854-7579929	1-20	1r	chr17:7579884-7579960	1-10
	2f	chr17:7579351-7579429	86-112	2r	chr17:7579407-7579485	68-94
	3f	chr17:7578517-7578598	126-138	3r	chr17:7578526-7578601	126-135
	4f	chr17:7578353-7578434	166-187	4r	chr17:7578404-7578483	149-176
	5f	chr17:7578181-7578259	197-223	5r	chr17:7578221-7578298	187-210
	6f	chr17:7577509-7577588	231-258	6r	chr17:7577537-7577612	225-248
	7f	chr17:7577016-7577095	281-307	7r	chr17:7577079-7577151	263-287
	8f	chr17:7573924-7574004	341-367	8r	chr17:7573954-7574035	332-358
NFE2L2				1r	chr2:178098758-178098835	71-95
				2r	chr2:178098907-178098980	23-46
PIK3CA				7r	chr3:178936038-178936111	528-551
				10r	chr3:178952026-178952097	1028-1050

2-5. NOIR-SS 実験

・アダプターの調製

【表 3】に示すオリゴを用いて、以下の手順でアダプターを調製した。なお、アダプターは IDT 社から購入し、精製グレードは PAGE で入手した。

5 μ L の ionBATbluntSTxx (100 μ M), 5 μ L の sp_trP1A04s (100 μ M), 0.5 μ L の NE buffer2 (New England Biolabs, 以降 NEB と記載) を混合し, Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler (Thermo) を用いて ramp speed 0.8% で 95°C から 25°C に冷却した。アニーリング後, 15 μ L の nuclease free water (NFW, Thermo) を添加し, 冷蔵 (4°C) にて保存した。

【表 3】アダプター合成のためのオリゴ一覧

緑字部分は検体識別用インデックス配列 (5 塩基), 赤字部分は分子バーコード配列 (12 塩基) を示す。検体識別用のインデックス配列は 8 種類準備し, 実験に用いた。*は Phosphorothioate Bond を示す。

使用目的	オリゴ名	オリゴ配列	塩基数
adapter (sense strand)	ionBATbluntST01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACAGTNNNNNNNNNNNGTACATATTGTCGTTAGCAT	67
	ionBATbluntST02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGTANNNNNNNNNNNGTACATATTGTCGTTAGCAT	67
	ionBATbluntST05	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCATNNNNNNNNNNNGTACATATTGTCGTTAGCAT	67
	ionBATbluntST10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGACNNNNNNNNNNNGTACATATTGTCGTTAGCAT	67
	ionBATbluntST12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGATANNNNNNNNNNNGTACATATTGTCGTTAGCAT	67
	ionBATbluntST15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTATGNNNNNNNNNNNGTACATATTGTCGTTAGCAT	67
	ionBATbluntST18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGANNNNNNNNNNNNGTACATATTGTCGTTAGCAT	67
	ionBATbluntST24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGACTIONNNNNNNNNNNNGTACATATTGTCGTTAGCAT	67
adapter (antisense strand)	sp_trP1A04s2	ATGCTAACGACAATATGTACATCACCGACTGCCCATAGAGAGGGATGAGATGG*T	57

・PCR プライマーカクテルの調製

【表 4】に示すオリゴおよび混合比率に従い、プライマーカクテルを調製した。1st PCR は混合に用いる各オリゴの濃度を 100 μ M, 2nd PCR は 10 μ M とした。

【表 4】 PCR プライマーオリゴ一覧

使用目的	オリゴ名	プライマーミックス カクテル単位	プライマー 混合比率	オリゴ配列	塩基数	
Universal adapter primer	TPCRA		-	CCATCTCATCCCTGCGTGTG	20	
	ALK_TKlr_1f_out		1	GAGGGGTGAGGCAGTCTTTA	20	
	ALK_TKlr_2f_out		1	AGCAAAGACTGGTTCTCACTCACC	24	
	ALK_TKlr_3f_out		1	GATCAGGGCTTCCATGAGGAAATC	24	
	BRAF_2f_out		1	AGCCTCAATTCTTACCATCCAC	22	
	EGFR_4f_out		1	CCAGCTTGTGGAGCCTCTTA	20	
	EGFR_5f_out		1	CCAGTTAACGTCTCTCTCTCTCTC	25	
	EGFR_8f_out_2		1	ACACCGCAGCATGTCAAGATCA	22	
	ERBB2_1f_out		1	TGGGGAGAATGTGAAAATCCAGTG	25	
	ERBB2_2f_out		1	TTTGGGGGTGTGTGGTCTC	19	
	ERBB2_3f_out		1	CCATTCCAGGGGATGAGCTAC	21	
	KRAS_2f_out	1st PCR cocktail-1	1	CCCCAGTCTCATGTACTGG	20	
	MET_4f_out		1	GGCCCATGATAGCCGTCTT	19	
	TP53_1f_out		1	CTGCCCTTCCAATGGATCCA	20	
	TP53_2f_out		1	AGACTTGGCTGTCCCAGAATG	21	
	TP53_3f_out		1	CAACCACAGCTGCACAG	18	
	TP53_4f_out		1	GAATCAGAGGCTGGGGAC	19	
	TP53_5f_out		1	ACCCAGTTCGCAACCAGA	19	
	TP53_6f_out		1	CAAGTGGCTCTGACCTGGA	20	
	TP53_7f_out		1	CACCGCTTCTGTCTGTC	18	
	TP53_8f_out		1	CTAGGAAGGCAGGGGAGTAG	20	
	1st PCR gene-specific primer	ALK_TKlr_2r_out		1	TTAAGATTGCCAGACTCAGCTC	24
		EGFR_4r_out		1	CTGTGCCAGGACCTTACCT	20
		EGFR_5r_out		1	TGAGAAAAGTGGGCTGAG	20
		EGFR_6r_out_2		1	GTCTTGTGTCCCGGACATAGT	23
		ERBB2_2r_out		1	GAGGCAGCCATAGGGCATAA	20
ERBB2_3r_out			1	GCTCTTGGTCTTCACTAA	21	
KRAS_1r_out			1	GTACATTTTCATTATTTTATTAAAGCCTGC	34	
MET_4r_out			1	AGCTCGTAGTCTACAGATTCATTGA	27	
TP53_1r_out			1	CCAGGGTGGAAAGTGTCTCA	20	
TP53_2r_out		1st PCR cocktail-2	1	GTCCAGATGAAGCTCCCAGAA	21	
TP53_3r_out			1	TTCTTTGCTGCCGTCTTCCA	20	
TP53_4r_out			1	CCTGTGCAGCTGTGGGTT	18	
TP53_5r_out			1	CCCAGGCCTCTGATTCTCA	20	
TP53_6r_out			1	CCTCATCTTGGGCTGTGTT	20	
TP53_7r_out			1	TCTTGCTTCTCTTTTCTATCCTGAGT	27	
TP53_8r_out			1	ACTTCTCCCCCTCTCTGT	20	
PIK3CA_7r_out			1	TCTCCATTTTAGCACTACCTGTGACT	28	
PIK3CA_10r_out			1	GTTTAATTGTGGGAAGATCCAATCCATTTTGC	33	
NFE2L2_1r_out			1	TCCAAAAGGAGCAAGAGAAAAGC	22	
NFE2L2_2r_out			1	TCTTAAACATAGGACATGGATTTGATTGAC	30	

使用目的	オリゴ名	プライマーミックス カクテル単位	プライマー 混合比率	オリゴ配列	塩基数	
1st PCR nested primer	ALK_TKlr_1f_ne_trP1		1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTGAGGCAGTCTTTACTACCT	45	
	ALK_TKlr_2f_ne_trP1		1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGTTCTCACTCACCAGGGC	41	
	ALK_TKlr_3f_ne_trP1		2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGCTTCCATGAGGAAATCCAGT	45	
	BRAF_2f_ne_trP1	2nd PCR cocktail-1	1.6	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCCAAATGGATCCAGACAACCTGT	48	
	EGFR_4f_ne_trP1	(1st PCR cocktail-1)産物のうち、増幅効率の悪いアンプリコンを対象としたカクテル)	0.8	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTGGAGCCTCTTACACCCA	43	
	EGFR_8f_ne_trP1_2		2.5	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGCAGCATGTCAAGATCACAG	44	
	ERBB2_2f_ne_trP1		1.6	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGGTGTGTGGTCTCCCATAC	43	
	KRAS_2f_ne_trP1		1.8	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTCATGACTGGTCCCTCATT	46	
	MET_4f_ne_trP1		1.8	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCCATGATAGCCGTCTTTAACAAG	47	
	TP53_2f_ne_trP1		1.8	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGCTGTCCAGAATGCAAGAA	44	
	TP53_8f_ne_trP1		2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGAAGGGGCTGAGGTCCT	42	
	EGFR_5f_ne_trP1		1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATACGTCTTCTCTCTCTGTCA	46	
	ERBB2_1f_ne_trP1		1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGAATGTGAAAATCCAGTGGCCATC	48	
	ERBB2_3f_ne_trP1	2nd PCR cocktail-2	0.8	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGATGAGCTACCTGGAGGATGT	45	
	TP53_1f_ne_trP1	(1st PCR cocktail-1)産物のうち、増幅効率の悪いアンプリコンを対象としたカクテル)	1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCACTCACAGTTCCATAGGCTCT	47	
	TP53_3f_ne_trP1		2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGACAGGGCAGGCTCTTG	41	
	TP53_4f_ne_trP1		1.3	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATACCAGCCCTGTCTCTCT	41	
	TP53_5f_ne_trP1		1.2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCAGTTGCAAAACAGACCTCA	44	
	TP53_6f_ne_trP1		1.3	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGCTCCTGACCTGGAGCTCT	43	
	TP53_7f_ne_trP1		1.2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGCTCTTGTCTCTGCTTGTCT	43	
	2nd PCR nested primer	ALK_TKlr_2r_ne_trP1		1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGCCAGACTCAGCTCAGTTA	44
		EGFR_4r_ne_trP1		1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTCAGGGACCTTACCTATAC	46
		EGFR_5r_ne_trP1	2nd PCR cocktail-3	0.8	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTGAGGTTCCAGAGACTGGA	43
		KRAS_1r_ne_trP1	(1st PCR cocktail-2)産物のうち、増幅効率の悪いアンプリコンを対象としたカクテル)	1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTTATTAAAGCCTGCTGAAAATGACTG	52
		MET_4r_ne_trP1		0.8	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGGTAGTCTACAGATTCATTTGAAACCAT	52
		NFE2L2_1r_ne		1.2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAAAAGGAGCAAGAGAAAGCCTT	45
NFE2L2_2r_ne			1.4	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATACATAGGACATGGATTTGATTGACA	49	
PIK3CA_7r_ne			1.4	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCA	50	
PIK3CA_10r_ne			1.4	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGAAGATCCAATCCATTTTGTGTCT	51	
EGFR_6r_ne_trP1_2			2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTTCCCGGACATAGTCCAG	44	
ERBB2_2r_ne_trP1			1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGCCATAGGGCATAAAGCTGTCT	45	
ERBB2_3r_ne_trP1			1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCTTGGTCTTCCACTAACCTTG	46	
TP53_1r_ne_trP1		2nd PCR cocktail-4	1.2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTTGGAAGTGTCTCATGCTGGAT	46	
TP53_2r_ne_trP1		(1st PCR cocktail-2)産物のうち、増幅効率の悪いアンプリコンを対象としたカクテル)	1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGATGAAGCTCCAGAAATGCCA	44	
TP53_3r_ne_trP1			2.5	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCGCTTCCAGTTGCTTTATCTGT	47	
TP53_4r_ne_trP1			1.4	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGTCAGCTGTGGGTTGATTC	43	
TP53_5r_ne_trP1			1.2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAGGCCTCTGATTCCTCACTGAT	45	
TP53_6r_ne_trP1			1.3	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTCATCTTGGGCTGTGTTATCTC	47	
TP53_7r_ne_trP1			1.2	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATTTCTCTTTTCTATCCTGAGTGTGTT	50	
TP53_8r_ne_trP1			1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCCCTCTCTGTTGCTGTC	41	

• DNA 末端処理反応

以下のレシピで末端処理反応プレミックス液を調製した。

NFW (Thermo)	3.9 μ L
10x ER Buffer (NEB)	3.0 μ L
4 U/ μ L T4 DNA Pol (TAKARA)	1.2 μ L
10 U/ μ L T4 PNK (NEB)	1.5 μ L
KOD DNA polymerase (TOYOBO)	0.4 μ L

	10.0 μ L

10 μ L の末端処理反応プレミックス液と 20 μ L の ccfDNA 検体を混合し、25 $^{\circ}$ C で 30 分間保温後、75 $^{\circ}$ C で 20 分間保温した。

• アダプターライゲーション

以下のレシピでライゲーション反応プレミックス液を調製した。

NFW (Thermo)	3.0 μ L
10x T4DNA Lig. Buffer (NEB)	1.0 μ L
High conc. T4 DNA ligase (NEB)	2.0 μ L

	6.0 μ L

4 μ L の 20 μ M アダプターを末端処理反応液に加えた。攪拌およびスピンドアウンの後、ライゲーション反応プレミックス液 6 μ L を末端処理反応液に加えた。攪拌およびスピンドアウンの後、25 $^{\circ}$ C で 15 分間保温した。反応後、直ちに氷上に移動した。

• ライゲーション産物の精製

ライゲーション反応液に 48 μ L の AMPure XP (Beckman Coulter) を加え、ピペッティングで 20 回攪拌し、室温に 5 分間放置した。マグネットプレート上に 5 分間放置し、上清を除去した後、150 μ L の 75% EtOH で洗浄を行った。室温で 5 分間風乾した後、30 μ L の NFW を加え、ピペッティングで 20 回攪拌し、室温に 3 分間放置した。マグネットプレート上に 3 分間放置し、上清を新しいチューブに移した。36 μ L の AMPure XP を加え、ピペッティングで 20 回攪拌し、室温に 5 分間放置した。マグネットプレート上に 3 分間放置し、上清を除去した後、150 μ L の 75% EtOH で 2 回洗浄を行った。室温で 5 分間風乾した後、15 μ L の NFW を加え、ピペッティングで 20 回攪拌し

た.

- 単鎖増幅反応

以下のレシピで単鎖増幅反応プレミックス液を調製した.

NFW (Thermo)	3.9 μ L
5x Q5 Reaction Buffer (NEB)	6.0 μ L
2 mM dNTP (TOYOBO)	3.0 μ L
100 μ M 1 st PCR primer mix (cocktail-1 or 2)	1.8 μ L
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	0.3 μ L

	15.0 μ L

15 μ L のビーズ液 (ライゲーション産物精製液) と 15 μ L の単鎖増幅反応プレミックス液を混合し, ピペッティングで 20 回攪拌し, 室温に 5 分間放置した. マグネットプレート上に 3 分間放置し, 上清を新しいチューブに移した. Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 (Thermo) を用いて, 98 $^{\circ}$ C で 30 秒間保温後, 熱変性反応を 98 $^{\circ}$ C で 10 秒間, アニーリング・伸長反応を 65 $^{\circ}$ C で 2 分間にて, 15 サイクルの単鎖増幅反応を行った.

- PCR 反応 (1st PCR)

単鎖増幅反応液に 1.8 μ L の 100 μ M ユニバーサルアダプタープライマー (【表 4】のオリゴ名 T_PCR_A) を加え, 攪拌, スピンドアウンした. Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 を用いて, 熱変性反応を 98 $^{\circ}$ C で 10 秒間, アニーリング反応を 65 $^{\circ}$ C で 30 秒間, 伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 30 秒間にて, 15 サイクルの PCR 反応を行った.

- 1st PCR 産物の精製

1st PCR 反応液に 37.5 μ L の AMPure XP を加え, ピペッティングで 20 回攪拌し, 室温に 5 分間放置した. マグネットプレート上に 3 分間放置し, 上清を除去した後, 150 μ L の 75% EtOH で 2 回洗浄を行った. 室温で 5 分間風乾した後, 20 μ L の 0.1 x TE (DOJINDO) を加え, ピペッティングで 20 回攪拌し, 室温に 2 分間放置した. マグネットプレート上に 2 分間放置し, 上清を新しいチューブに移した.

- PCR 反応 (2nd PCR : nested PCR)

以下のレシピで 2nd PCR 反応プレミックス液を調製した.

NFW (Thermo)	10.2 μ L
10x High Fidelity Buffer (Thermo)	2.0 μ L
2 mM dNTP (TOYOBO)	2.0 μ L
50 mM MgSO ₄ (Thermo)	0.8 μ L
10 μ M universal adapter primer (T_PCR_A)	1.0 μ L
2 nd PCR primer mix (cocktail-1, 2, 3, 4)	1.0 μ L
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo)	0.08 μ L

	17.08 μ L

3 μ L の精製後 1st PCR 反応液と 17 μ L の 2nd PCR 反応プレミックス液を混合し、攪拌し、スピンドウンした。Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 を用いて、95 $^{\circ}$ C で 2 分間保温後、熱変性反応を 95 $^{\circ}$ C で 15 秒間、アニーリング・伸長反応を 63 $^{\circ}$ C で 1 分間にて、増幅効率の悪いプライマーカクテルである cocktail-1,3 については 30 サイクル、増幅効率の良いプライマーカクテルである cocktail-2,4 については 25 サイクルで PCR 反応を行った。

- ・ PCR 産物（ネスト）の精製

2nd PCR 反応液に 24 μ L の AMPure XP を加え、ピペッティングで 20 回攪拌し、室温に 5 分間放置した。マグネットプレート上に 3 分間放置し、上清を除去した後、100 μ L の 75% EtOH で 2 回洗浄を行った。室温で 5 分間風乾した後、20 μ L の 0.1 x TE を加え、ピペッティングで 20 回攪拌し、室温に 2 分間放置した。マグネットプレート上に 2 分間放置し、上清を新しいチューブに移した（NGS ライブラリの合成完了）。

- ・ 調製 NGS ライブラリの濃度測定および濃度調整

Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit および Qubit 2.0 Fluorometer あるいは、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo) および蛍光プレートリーダー TriStar2 LB942 (Berthold Technologies) を用いて、調製 NGS ライブラリの濃度測定を行った。測定はライブラリ調製液 1 μ L を用い、キットのマニュアルに従った。

得られた dsDNA 濃度から、産物の長さを平均 250 bp としてライブラリ調製液のモル濃度を算出した。得られた濃度をもとに各ライブラリ調製液から 0.01 pmol ずつ分取し、16 ライブラリ分を pool したのち、NFW を添加し、濃度を 1 nM に調整し、次世代シーケンサーでの DNA シーケンス実験まで冷蔵（4 $^{\circ}$ C）にて保管した。

- ・ 次世代シーケンサーによる DNA 配列読み取り

NOIR-SS ライブラリのシーケンス実験は，共同研究先である株式会社DNAチップ研究所にて行った．シーケンスは，Ion Torrent Next-Generation Sequencing Ion Chef™ System および Ion Torrent™ Ion S5 Sequencer, Ion 540 Chip（いずれも Thermo）を用いて行った．操作は Ion シーケンシングシステムの操作マニュアルに従って行った．

2-6. NOIR-SS 解析

NOIR-SS の解析は，Kukita らの先行論文^{60,61}に従って行った．概略は以下のとおりである．

- ①シーケンサーから得られた生リードファイル（FASTQ format）の各リード配列情報に対して，5塩基の個人識別タグ配列を対応させ，検体情報を付加した．
- ②個人識別タグ配列とアダプター内のスペーサー配列の間の配列を分子バーコード配列として抽出した．
- ③各リードのスペーサー配列以降の配列（> 50塩基以上）について，BWA-MEM⁹⁰（version 0.6.2）を用いて，NOIR-SS ターゲット領域（【表 2】参照）にマッピングし，アライメント情報を得た．この際，マッピングされた塩基が 40塩基未満であったリードは除外した．
- ④同一の分子バーコードを有するリードをグルーピングし，分子バーコードあたりのリード数を集計した．
- ⑤さらに分子バーコードあたりのリード数とエラーを含まない分子バーコードの割合をプロットし，エラーを含まない分子バーコードの割合が 90%未満のフラクションを除去した．
- ⑥エラーバーコードフラクションを除去したリードについて，VarScan⁹¹（version 2.2.11）を用いて，同一分子バーコードを有するリードのコンセンサス配列を作成した．各塩基について，85%以上のリードで共通したものをコンセンサス塩基と判定した．
- ⑦コンセンサス配列の FASTQ ファイルを作成し，リファレンス配列にマッピングし（BWA-MEM）した．
- ⑧マッピングデータから，SAMtools（version 0.1.18）および VarScan2 を用いて，ターゲット領域の遺伝子変異情報（VCF ファイル）を得た．
- ⑨VCF ファイルから各塩基位置での解析分子数の情報（リファレンス／変異塩基数）を抽出した．
- ⑩ターゲット領域の広さ，リード数，エラー率から，ポアソン分布モデルにより得られた変異が偽陽性である確率（ P 値）を算出した．本研究では $P =$

10^{-4} を変異判定閾値として設定した。得られた変異のうち，Common SNP に該当する変異は解析から除外した。

⑩ 検出された変異に CV78 フィルター⁶¹ を適用し，腫瘍由来変異の濃縮を行った。腫瘍遺伝子変異データベース COSMIC version 78 に登録がない変異，および登録数が少ないもの（1 以下，TP53 のみ 9 以下）を腫瘍特異的変異ではないとして，検出変異リストから除去した。

2-7. 統計解析

統計解析は，統計解析環境 R (version 3.6.2)，Microsoft Excel もしくは Stata/IC (version 16.1, StataCorp) を用いて行った。用いた統計検定手法については各結果の項に記載した。特に記載のない場合， $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

第3章 結果

3-1. NOIR-SS 肺癌パネルのデザインと検体カバー率の推定

本研究は NSCLC 患者を対象とするため、NSCLC で頻度の高い変異を重点的にカバーした NOIR-SS 肺癌パネルを設計した。パネルデザインは【表 2】に示した。

次に、設計した NOIR-SS 肺癌パネルがどれだけの割合の NSCLC 症例の体細胞変異が検出可能かを推定すべく、がん関連体細胞変異データベース COSMIC より原発巣手術検体 1451 検体（いずれも何らかの遺伝子に変異を有する検体）の変異データを取得し、解析した。結果、NOIR-SS 肺癌パネルがカバーする領域に変異が認められた検体は 82.1% (1191/1451) であった。

3-2. NOIR-SS 肺癌パネルの変異検出性能の確認

NOIR-SS 肺癌パネルの変異検出性能について、変異率が明らかな市販の標準 ccfDNA 検体を用いて評価した。EGFR p.T790M (COSMIC ID: COSM6240) および PIK3CA p.E545K (COSM763) の 2 種類について、変異率 0.1, 1, 5% の 3 検体を用いた NOIR-SS 解析を行い、変異検出を試みた。結果、いずれの変異も 0.1%まで検出可能であった【表 5】。

【表 5】 標準 ccfDNA 検体の変異検出結果

変異の種類	標準検体の変異率	NOIR-SS測定結果		
		変異分子数	全分子数	変異率
EGFR p.T790M (COSM6240)	0.10%	8	4505	0.18%
	1.00%	19	2094	0.91%
	5.00%	139	2632	5.28%
PIK3CA p.E545K (COSM763)	0.10%	3	640	0.47%
	1.00%	10	282	3.55%
	5.00%	14	243	5.76%

3-3. 検体背景

本研究への参加に同意し、登録された NSCLC 患者は全 30 例であった。被験者の臨床背景を【表 6】に示す。

【表 6】本研究に登録された 30 症例の臨床背景

項目	調査時期	指標	被験者数 (割合) または平均値
年齢	ニボルマブ治療開始時	平均±標準偏差 (歳)	66.1±8.7
性別	ニボルマブ治療開始時	男性 (%)	23 (76.7%)
罹病期間	ニボルマブ治療開始時	平均±標準偏差 (年)	1.9±1.9
組織型	肺癌治療開始時	腺癌	23 (76.7%)
		扁平上皮癌	6 (20.0%)
		不明	1 (3.3%)
ステージ	肺癌治療開始時	II B	2 (6.7%)
		III A	5 (16.7%)
		III C	1 (3.3%)
		IV A	22 (73.0%)
EGFR遺伝子変異 (腫瘍組織)	肺癌治療開始時	エクソン19欠損	2 (6.7%)
		陰性	26 (86.7%)
		不明	2 (6.7%)
ALK融合遺伝子 (腫瘍組織)	肺癌治療開始時	陽性	2 (6.7%)
		陰性	25 (83.3%)
		不明	3 (10.0%)
喫煙歴	肺癌治療開始時	あり (%)	24 (80.0%)
ブリンクマンインデックス	肺癌治療開始時	喫煙歴ありの平均±標準偏差	958±371
腫瘍径 (sum of diameters)	ニボルマブ治療開始時	平均±標準偏差 (mm)	56.4±45.9
過去治療レジメン数	ニボルマブ治療開始時	1種類	13 (43.3%)
		2種類	7 (23.3%)
		3種類	4 (13.3%)
		4種類	2 (6.7%)
		5種類	1 (3.3%)
		7種類	2 (6.7%)
		10種類	1 (3.3%)

30 例の被験者の平均年齢は 66.1±8.7 歳で、男性が多く、全体の 76.7%を占めた。肺癌と診断されてからの平均罹病期間は 1.9 年であった。肺癌診断時の組織型は腺癌が多く 76.7%であった。ステージは 28 例でステージ III 以上であった。肺癌診断時のドライバー遺伝子検査では、EGFR 遺伝子変異、anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子それぞれ 2 例ずつが確認されていた。喫煙歴は 80%、喫煙歴がある患者のブリンクマンインデックス (1 日当たりの喫煙本数×喫煙年数) の平均は 958±371 であった。ニボルマブ開始時の腫瘍径の平均は 56.4±45.9 mm であった。肺癌診断以降、ニボルマブ治療導入までの過去治療レジメン数は 1-3 種類が多く、全体の 8 割を占めた。中には 5 レジメン以上の治療を受けている症例も存在した。

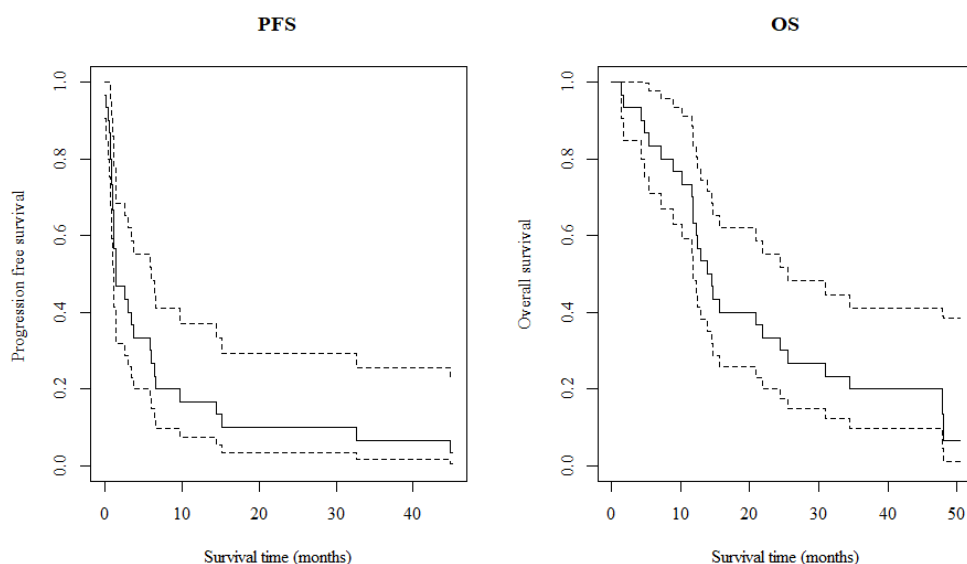
3-4. ニボルマブ治療成績

治療効果の指標として、客観的腫瘍縮小効果（objective response : OR）と無増悪生存期間（progression free survival : PFS）、全生存期間（overall survival : OS）を調査した。

ORはCT画像による腫瘍の大きさによる評価であり、完全奏功（complete response : CR, すべての標的病変が消失）、部分奏功（partial response : PR, 標的病変の最長径の和が30%以上減少）、進行（progressive disease : PD, 標的病変の最長径の和が20%以上増加）、安定（stable disease : SD, PRとPDの間）、評価不能（Not evaluable : NE, 副作用等の何らかの事情により病巣の評価を未施行）の5段階に分類される。PFSは治療開始後、がんが進行せず安定した状態であった期間、OSは治療開始後死亡するまでの期間を示す。治療効果として、臨床において最も重要視されるのはOSである。OSを知るための早期サロゲートマーカーとしてPFSが活用される。

試験登録30例のORは、CRが3例（10.0%）、PRが6例（20.0%）、PDが16例（53.3%）、SDが3例（10.0%）、NEが2例（6.7%）であった。客観的奏効率（objective response rate : ORR, 全投与例のうちCRあるいはPRだった症例数の割合）は30.0%（9/30）であった。NEの2例は、副作用が生じた症例であり、それぞれ脳梗塞、アナフィラキシーにより1回でニボルマブの投薬が中止された症例であった。

生存時間分析によるPFSの中央値は1.4か月（95%信頼区間（CI）：1.1, 6.1）、OSの中央値は14.2か月（95%CI：11.8, 25.6）であった【図5】。



【図5】ニボルマブ治療30例のPFSおよびOS

点線は95%信頼区間（CI）を示す。PFSの中央値は1.4か月（95%CI：1.1, 6.1）、OSの中央値は14.2か月（95%CI：11.8, 25.6）。統計解析環境Rのsurvivalパッケージを用いて解析した。

3-5. ccfDNA 量の経時的变化

各被験者から、ニボルマブ治療開始前、治療後 4 時間、2 日、8 日、15 日、29 日の全 6 ポイントで採血を行った。一部の被験者において臨床現場での検体取り忘れ、研究の中止などの理由で検体欠損が発生したため、最終的に実験がスタートできた血液（血漿）検体は全 173 検体であった。これら血液検体すべてについて ccfDNA の精製・取得に成功した。得られた ccfDNA 量は 2 本鎖 DNA 量の測定が可能な QUBIT 法（蛍光法）で定量した。本研究は ccfDNA ではなく、あくまで ctDNA にフォーカスを当てた研究であるが、ICIs 投与後の ccfDNA 量をこれほど厳密に調べたスタディはこれまでに存在しないため、参考情報としてその結果を【表 7】に示した。

【表 7】抽出 ccfDNA 量一覧

血漿から得られた各タイムポイントの ccfDNA 量を被験者ごとに示した。数値は血漿 1 mL あたりの DNA 量 (ng) を示す。表の左部には参考のためニボルマブの治療成績を記載した。序論でも触れたが、ccfDNA は腫瘍細胞由来の DNA だけでなく正常細胞由来の DNA も含めた血漿中遊離 DNA を示すため、データ理解の際は注意されたい。"missing"は検体の欠損を示す。

被験者No.	OR		PFS		OS		ccfDNA (ng/mL plasma)					
	判定月	効果判定	判定月	イベント	判定月	イベント	治療前	治療4時間	治療2日	治療8日	治療15日	治療29日
1	0.9	PD	0.9	憎悪	11.7	死亡	26.8	13.4	20.9	52.0	23.3	21.0
2	3.8	PD	3.8	憎悪	13.8	死亡	15.3	11.1	17.9	16.7	25.3	12.1
3	6.5	PR	6.5	憎悪	47.9	死亡	16.5	10.7	22.3	13.5	10.9	11.4
4	9.8	PR	9.8	憎悪	34.5	死亡	10.3	7.6	9.0	10.0	10.3	8.4
5	0.5	PD	0.5	憎悪	15.6	死亡	10.3	10.9	11.4	17.0	11.3	missing
6	1.4	PD	1.4	憎悪	14.6	死亡	7.9	7.9	7.6	8.1	7.1	7.6
7	3.5	SD	3.5	憎悪	8.9	死亡	8.4	9.3	9.6	12.3	16.2	13.0
8	44.8	CR	44.8	憎悪	50.4	生存	14.8	12.5	17.0	18.4	16.0	17.8
9	0.2	NE (副作用: 脳梗塞)	0.2	憎悪	1.4	死亡	84.5	81.5	188.0	101.0	missing	missing
10	15.2	SD	15.2	憎悪	25.6	死亡	16.0	10.4	13.7	13.5	23.3	18.0
11	1.1	PD	1.1	憎悪	4.3	死亡	20.7	17.7	missing	23.7	19.7	29.8
12	6.6	PR	6.6	憎悪	12.3	死亡	24.1	25.8	29.3	24.0	28.8	19.0
13	14.5	PR	14.5	憎悪	48.0	死亡	17.9	22.2	21.9	14.2	19.0	13.2
14	6.1	PR	6.1	憎悪	20.9	死亡	15.0	12.4	15.3	19.1	15.8	missing
15	0.6	PD	0.6	憎悪	11.8	死亡	15.0	11.4	18.6	18.5	22.8	21.6
16	1.1	PD	1.1	憎悪	21.8	死亡	10.8	9.2	20.4	14.3	12.4	11.8
17	5.9	PR	5.9	憎悪	24.4	死亡	16.7	12.9	15.2	15.8	16.1	17.6
18	0.7	PD	0.7	憎悪	5.4	死亡	17.8	19.1	22.2	25.3	17.3	missing
19	1.1	PD	1.1	憎悪	12.4	死亡	13.3	12.0	missing	13.5	15.5	12.3
20	2.6	PD	2.6	憎悪	47.1	生存	13.9	9.9	12.9	20.7	14.3	19.2
21	0.0	NE (副作用: アナフィラキシー)	0.0	憎悪	11.6	死亡	14.6	122.0	36.0	25.3	16.7	22.0
22	1.4	PD	1.4	憎悪	4.7	死亡	25.9	16.2	22.3	32.4	26.6	24.8
23	0.7	PD	0.7	憎悪	10.2	死亡	13.8	10.8	14.4	25.0	39.8	28.0
24	unknown	CR	45.1	未憎悪	45.1	生存	21.3	15.2	20.9	21.7	23.3	22.0
25	32.7	CR	32.7	憎悪	44.9	生存	15.5	15.3	11.9	17.9	27.1	31.7
26	3.1	SD	3.1	憎悪	30.9	死亡	15.4	22.8	16.9	15.8	15.2	12.1
27	1.0	PD	1.0	憎悪	7.2	死亡	19.8	15.0	17.6	26.5	28.3	25.5
28	1.0	PD	1.0	憎悪	1.7	死亡	16.6	17.5	15.2	52.0	47.5	37.8
29	1.4	PD	1.4	憎悪	14.5	死亡	32.0	25.8	28.0	35.7	33.4	26.9
30	0.9	PD	0.9	憎悪	12.9	死亡	20.2	15.5	15.7	17.8	19.7	34.3

副作用で OR が NE となった 2 症例（被験者 No.9 と No.21）において特徴的な ccfDNA 動態が確認された。被験者 No.9 は、ニボルマブ治療前の ccfDNA が他の被験者と比べて顕著な高値を示した。治療 2 日後にはさらに約 2 倍の増加が認められ、その後 7 日目で脳梗塞が確認され、研究中止に至った（ccfDNA 採血は 7 日目が最終）。

一方、被験者 No.21 は、ニボルマブ治療前の値は他の被験者と変わりなかったが、治療 4 時間後に ccfDNA 量の顕著な増加を認めた。この症例は投与直後にアナフィラキシーを発症し、試験中止となっていた。

3-6. ニボルマブ投薬履歴の確認と解析症例の選別

本研究ではニボルマブ治療開始 1 か月の ctDNA 動態に注目するため、その間の投薬状況（通常 2 週間に 1 回）が結果に影響を与えると考えられた。治療開始 1 か月のニボルマブの投薬情報の確認結果を【表 8】に示す。

【表 8】ニボルマブ投与履歴

ニボルマブ投与 1 か月まで（2 回目まで）の投与履歴をまとめた。ニボルマブは 2 週間に 1 回の投薬のため、1 回目と 2 回目の間隔に逸脱がないかを確認した。期待値である 14 日を大きく超える症例（> 30 日）は、解析から除外することとした。

被験者No.	ニボルマブ 投与1回目	ニボルマブ 投与2回目	1回目投与と2回目 投与の間隔（日）	終了理由	ctDNA時系列解析の可否
1	2016/2/10	2016/2/26	16		可
2	2016/2/10	2016/2/25	15		可
3	2016/2/10	2016/2/26	16		可
4	2016/2/17	2016/3/2	14		可
5	2016/2/17			PD (RECIST)	不可
6	2016/2/17	2016/3/4	16		可
7	2016/2/23	2016/3/9	15		可
8	2016/2/25	2016/3/11	15		可
9	2016/2/25			AE中止（脳梗塞）	不可
10	2016/3/8	2016/5/12	65		不可
11	2016/3/17	2016/4/20	34		不可
12	2016/3/29	2016/4/13	15		可
13	2016/3/31	2016/4/22	22		可
14	2016/4/5	2016/4/20	15		可
15	2016/4/19			AE中止（肝障害）	不可
16	2016/5/6	2016/5/19	13		可
17	2016/5/9	2016/5/25	16		可
18	2016/5/9			AE中止（癌性リンパ管症）	不可
19	2016/6/3	2016/6/17	14		可
20	2016/6/6	2016/6/20	14		可
21	2016/7/12			AE（アナフィラキシー）	不可
22	2016/6/28	2016/7/13	15		可
23	2016/7/6	2016/7/20	14		可
24	2016/7/20	2016/8/4	15		可
25	2016/8/16	2016/8/30	14		可
26	2016/9/6	2016/9/20	14		可
27	2016/9/13			PD (RECIST)	不可
28	2016/9/27			PD (RECIST)	不可
29	2016/9/29	2016/10/14	15		可
30	2016/10/6	2016/10/20	14		可

ニボルマブの投薬が 1 回のみでの被験者は 7 例存在した。前述した OR が NE の症例 2 例（被験者 No.9, 21）に加え、副作用が原因で No.15, 18 が、病勢進行（PD）で No.5, 27, 28 が該当した。また、ニボルマブ投与 1 回目と 2 回目の間隔に逸脱が認められた症例（>30 日）は 2 例（No.10, 11）存在した。

これらニボルマブ治療開始 1 か月内に投薬の逸脱が認められた 9 例は以

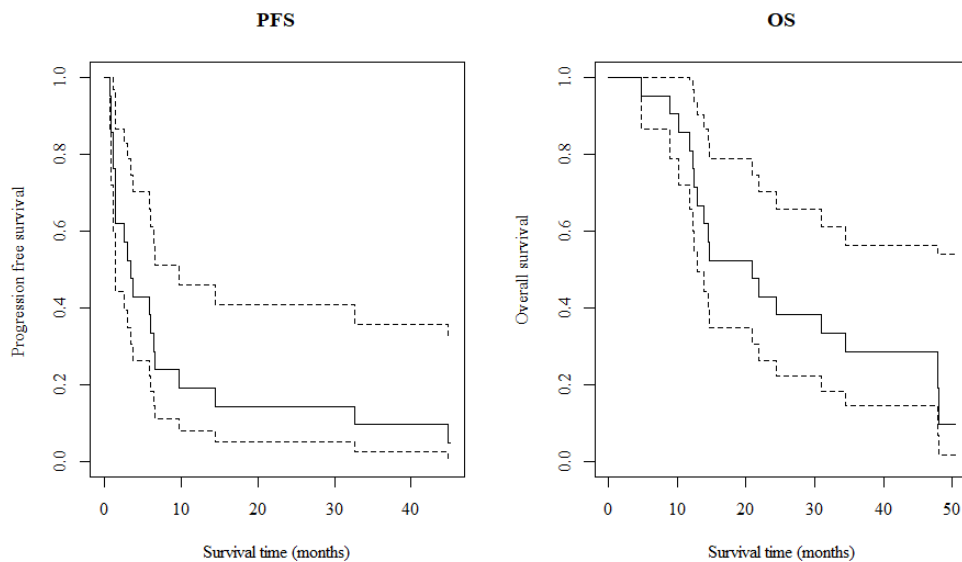
降の解析から除外することとした。解析対象 21 例の被験者の臨床背景を【表 9】に示す。

【表 9】 解析対象 21 症例の臨床背景

項目	調査時期	指標	被験者数 (割合) または平均値
年齢	ニボルマブ治療開始時	平均±標準偏差 (歳)	65.8±8.6
性別	ニボルマブ治療開始時	男性 (%)	18 (85.7%)
罹病期間	ニボルマブ治療開始時	平均±標準偏差 (年)	1.8±1.9
組織型	肺癌治療開始時	腺癌	17 (81.0%)
		扁平上皮癌	4 (19.0%)
ステージ	肺癌治療開始時	II B	2 (9.5%)
		III A	4 (19.0%)
		III C	1 (4.8%)
		IV A	14 (66.7%)
EGFR遺伝子変異 (腫瘍組織)	肺癌治療開始時	エクソン19欠損	1 (4.8%)
		陰性	18 (85.7%)
		不明	2 (9.5%)
ALK融合遺伝子 (腫瘍組織)	肺癌治療開始時	陽性	2 (9.5%)
		陰性	16 (76.2%)
		不明	3 (14.3%)
喫煙歴	肺癌治療開始時	あり (%)	18 (85.7%)
ブリンクマンインデックス	肺癌治療開始時	喫煙歴ありの平均±標準偏差	995±332
腫瘍径 (sum of diameters)	ニボルマブ治療開始時	平均±標準偏差 (mm)	43.7±18.3
過去治療レジメン数	ニボルマブ治療開始時	1種類	8 (38.1%)
		2種類	7 (33.3%)
		3種類	4 (19.0%)
		4種類	2 (9.5%)

本研究の解析対象として選別された 21 例の被験者の臨床背景は選別前【表 6】とほぼ同等であったが、選別前に 4 例存在した過去治療レジメン数が 5 種類以上の症例は脱落していた。

次に解析対象 21 例のニボルマブの治療効果を再集計した。OR については、CR が 3 例 (14.3%)、PR が 6 例 (28.6%)、PD が 10 例 (47.6%)、SD が 2 例 (9.5%) で、ORR は 42.9%であった。また、PFS、OS の生存時間分析では、PFS の中央値は 3.5 か月 (95% 信頼区間 (CI) : 1.4, 9.8)、OS の中央値は 20.9 か月 (95% CI : 12.9, 未到達) であった【図 6】。



【図 6】ニボルマブ治療開始後 1 か月の投薬が逸脱なく行われた 21 例のニボルマブ治療の PFS および OS

点線は 95%信頼区間 (CI) を示す。PFS の中央値は 3.5 か月 (95% CI : 1.4, 9.8)、OS の中央値は 20.9 か月 (95% CI : 12.9, 未到達)。統計解析環境 R の survival パッケージを用いて解析した。

3-7. ctDNA の検出結果および経時的変化の概観

3-6 で解析対象とされた 21 例について、NOIR-SS 法にて ccfDNA 中の遺伝子変異を検出し、CV78 フィルター⁶¹ (1-4-2, および 2-6 項参照) にて腫瘍由来変異の濃縮を行った。一連の解析の結果検出された全遺伝子変異 (ctDNA) を【表 10】に示した。

【表 10】 検出された ctDNA の一覧

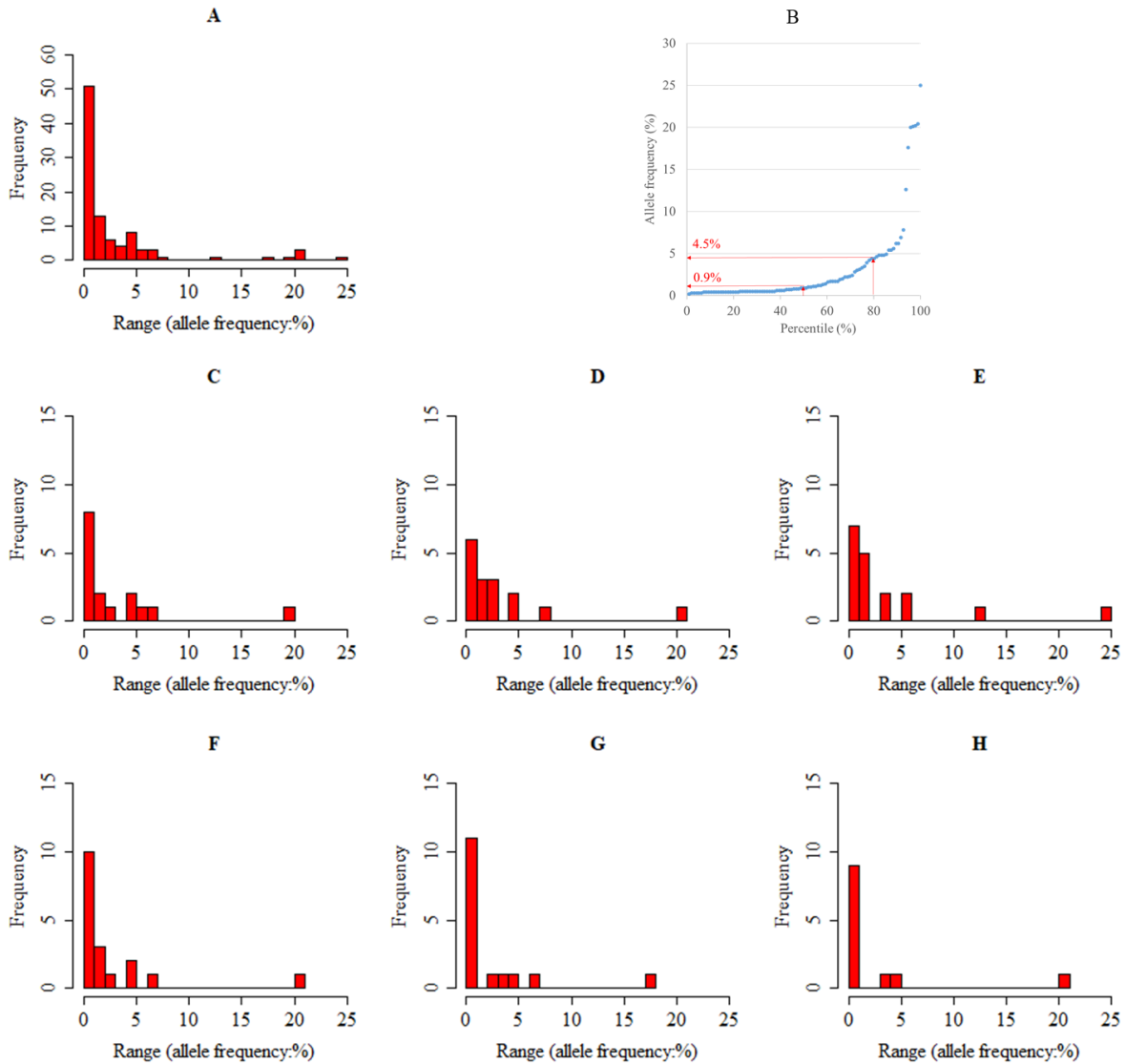
“missing”は検体の欠損を示す。全 21 症例中、ニボルマブ治療 1 か月まで ctDNA が一度も検出されなかった症例が 5 例 (うち 2 例は検体の欠損あり) 存在した。

被験者No.	遺伝子	Mutation (AA)	COSMIC ID	変異率 (%)					
				治療前	治療4時間	治療2日	治療8日	治療15日	治療29日
1	BRAF	p.V600E	COSM476	0	1.7	0	0	0	0
2	KRAS	p.G12V	COSM520	0	0	1.1	0	0	0
	TP53	p.R248W	COSM10656	0	0.5	0	0	0	0
3	EGFR	p.L858R	COSM6224	0.9	2.2	1.6	1.9	0.3	0
	EGFR	p.T790M	COSM6240	0.3	1.2	0	0.4	0.4	0
	TP53	p.C135R	COSM10684	0	0	0	0	0.4	0
4	TP53	p.V274F	COSM10769	1.7	3	1.2	2.8	0	0
	NFE2L2	p.E82D	COSM251434	0	0	0.7	0	0	0
6	TP53	p.R283C	COSM10911	0	0	0	0.4	0	0
	PIK3CA	p.H1047Q	COSM24714	0	0	0	0	0	0.5
7	TP53	p.P190L	COSM43657	0.5	0	1.4	0	0.5	0.4
	ERBB2	p.R868W	COSM289684	0	0	0	0.5	0	0
	KRAS	p.G13=	COSM537	0.5	0	0	0	0	0
	TP53	p.C135R	COSM10684	0	0	0.8	0	0	0
8	TP53	p.R282G	COSM10992	5.4	2.4	3.5	4.8	3.1	3.3
	TP53	p.P278H	COSM43755	0	0	0	1.1	0	0
	TP53	p.H179R	COSM10889	0	0.5	0	0	0	0
12	NFE2L2	p.R34Q	COSM132849	0	0	0.4	0	0	0
	TP53	p.R273L	COSM10779	6.2	4.9	3.9	4.4	4.8	4.8
13	PIK3CA	p.R537*	COSM5613080	0	0	0	0.4	0	0
	TP53	p.Y220C	COSM10758	4.4	4.6	5.6	6.2	6.9	0
	TP53	p.C277Y	COSM43737	0.5	0	0	0	0	0
	TP53	p.S127Y	COSM43970	0	0	0	0.5	0	0
14	変異検出なし	-	-	-	-	-	-	-	missing
16	変異検出なし	-	-	-	-	-	-	-	-
17	KRAS	p.V14I	COSM12722	0	0	0	0.3	0	0
	KRAS	p.G12C	COSM516	0	0	1	0	0	0
	NFE2L2	p.D29H	COSM124736	0	0	0	0	0.5	0
	TP53	p.C135R	COSM10684	0.3	0	0	0	0	0
	TP53	p.P278L	COSM10863	0	0	0	0.7	0	0
19	TP53	p.G245S	COSM6932	0	0.5	0	0	0.2	0.6
19	変異検出なし	-	-	-	missing	-	-	-	-
20	変異検出なし	-	-	-	-	-	-	-	-
22	KRAS	p.G12D	COSM521	0.6	0.5	0	0.5	2.2	0.9
	PIK3CA	p.N1044S	COSM22541	0	0	0	0	0.4	0
23	BRAF	p.R603*	COSM33729	0	0	0.6	0	0	0
	KRAS	p.G12C	COSM516	0.5	0	0	0.4	0	0.8
24	変異検出なし	-	-	-	-	-	-	-	-
25	TP53	p.R175H	COSM10648	0	0	0	0	0.4	0
	TP53	p.G245S	COSM6932	0	0	0	0.3	0	0
26	KRAS	p.A11=	COSM328030	0	0	0.4	0	0	0
	PIK3CA	p.E545K	COSM763	4.2	7.8	12.6	1.7	0.9	1
	TP53	p.R175H	COSM10648	0	0.5	0	0	0	0
	TP53	p.P278A	COSM10814	2.3	2	5.4	0	0	0
	TP53	p.Y126N	COSM44380	0	0	0	0	0.7	0.4
29	TP53	p.S241F	COSM10812	0	0	0.4	0	0	0
	TP53	p.C277Y	COSM43737	0	0	0	0	0	0.4
	TP53	c.673-1G>T (splicesite)	COSM45135	20	20.2	25	20.1	17.6	20.4
30	TP53	p.G245V	COSM11196	1.7	0.8	1.3	0	0.4	0.6

検体欠損が認められた 2 例を除いた 19 例中、治療 29 日までになんらか

の変異 (ctDNA) が検出された症例は 16 例 (84.2%) であった。検出された変異の数は 1~6 か所で、個人差が認められた。

次に、ニボルマブ治療 1 か月までに検出された ctDNA の変異率の頻度分布を確認した【図 7】。



【図 7】 検出された ctDNA の変異率の頻度分布

A : ニボルマブ投与前から投与 29 日後のすべてのタイムポイントのデータを合わせた場合の ctDNA 変異率の頻度分布, B : 投与前から投与 29 日後のすべてのタイムポイントの変異率と percentile のプロット. C-H : 各タイムポイントにおける変異率の頻度分布 (C : 投与前, D : 投与 4 時間後, E : 投与 2 日後, F : 投与 8 日後, G : 投与 15 日後, H:投与 29 日後)

ニボルマブ治療前から治療 29 日後の間のすべてのタイムポイントを対象に検出された全 21 被験者の遺伝子変異の変異率の分布を【図 7A】に示した。変異率が通常の NGS 法の感度である 1%以下の変異が多く認められ、ま

た，検出された変異の約 5 割が変異率 0.9%以下の変異，8 割は変異率 4.5%以下の変異であった【図 7B】。またタイムポイント別にみると，1%以下の変異数の割合は，ニボルマブ治療前が 50%，治療 4 時間 37.5%，治療 2 日 33.3%，と治療 2 日にかけて減少し，その後，治療 8 日 55.6%，治療 15 日 68.8%，治療 29 日 66.7%と増加する傾向が認められた【図 7C-H】。

3-8. ctDNA 動態データの集約・簡略化と傾向解析

【表 10】の変異検出データは、そのままでは解釈し難いため、被験者ごとに変異プロファイルを集約・簡略化する工夫が必要と考えた。

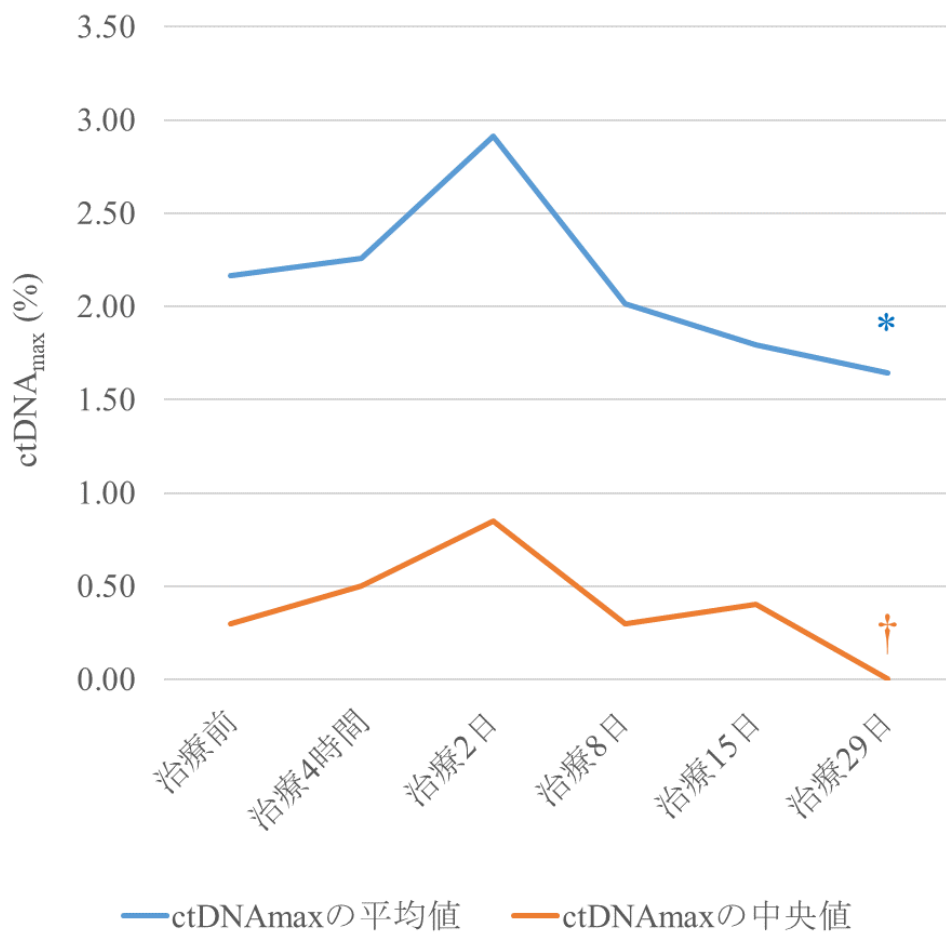
3-8-1. ctDNA_{max} の算出と傾向の確認

各タイムポイントで複数の遺伝子変異が確認された場合、より変異率の高い ctDNA が病態を反映する可能性が高いと考えた。検出された最大値をそのポイントの代表変異率 (ctDNA_{max}) とみなし、時系列変異データを集約することとした。ctDNA_{max} を【表 11】に、その平均値および中央値の挙動を【図 8】に示した。

【表 11】 ctDNA_{max} の一覧

変異が検出されなかった検体は、値として”0”を代入した。“missing”は検体の欠損を示す。スパイク判定カラムの説明については、3-8-2 項を参照。

被験者No.	ctDNA _{max} (%)						スパイク判定
	治療前	治療4時間	治療2日	治療8日	治療15日	治療29日	
1	0	1.7	0	0	0	0	Positive
2	0	0.5	1.1	0	0	0	Positive
3	1.7	3	1.6	2.8	0.4	0	Negative
4	0	0	0.7	0.4	0	0	Positive
6	0.5	0	1.4	0	0.5	0.5	Positive
7	5.4	2.4	3.5	4.8	3.1	3.3	Negative
8	0	0.5	0	0	0	0	Positive
12	6.2	4.9	3.9	4.4	4.8	4.8	Negative
13	4.4	4.6	5.6	6.2	6.9	0	Negative
14	0	0	0	0	0	missing	Negative
16	0	0	0	0	0	0	Negative
17	0.3	0.5	1	0.7	0.5	0.6	Positive
19	0	0	missing	0	0	0	Unknown
20	0	0	0	0	0	0	Negative
22	0.6	0.5	0	0.5	2.2	0.9	Positive
23	0.5	0	0.6	0.4	0	0.8	Negative
24	0	0	0	0	0	0	Negative
25	0	0	0	0.3	0.4	0	Positive
26	4.2	7.8	12.6	1.7	0.9	1	Positive
29	20	20.2	25	20.1	17.6	20.4	Negative
30	1.7	0.8	1.3	0	0.4	0.6	Negative



【図 8】 ctDNA_{max} の平均値および中央値の挙動

21 症例 ctDNA_{max} の平均値（青線），および中央値（橙線）の経時変化をプロットした． *は治療前に対する変化が有意（Paired T-test $p < 0.05$ ）， †は治療前に対する変化が有意（Wilcoxon signed rank test $p < 0.1$ ）を示す．

ctDNA_{max} の平均値および中央値はいずれもニボルマブ治療 2 日後に増加傾向を示し，その後徐々に減少し，治療 29 日には治療前より低値を示した【図 8】．

3-8-2. ctDNA スパイク症例の同定

がん治療開始後，一時的な ctDNA の増加（スパイク）が検出される例が過去に報告されており^{83,84}，これは治療に反応した腫瘍細胞の破壊を捉えたものと考えられている⁵³。【表 11】および【図 8】に示すように，本研究においてもそのような ctDNA の挙動を示す症例が存在した。スパイクが認められた症例が良いがん治療効果を示したという報告^{83,84}もあり，本研究でもスパイクが検出された症例を抽出・同定し，薬剤効果との関連を解析すべきと考えた。本研究では，ニボルマブ治療 4 時間後から 15 日目までの間に，治療前の ctDNA_{max} の 2 倍以上の値を示したポイントが存在する場合にスパイク陽性と判定した【表 11】。投与 1 か月内に ctDNA スパイクを示した症例の割合は 45% (9/20 ※検体欠損により判定不能の 1 例を除いて集計) であった。

3-8-3. ctDNA 検出の「有無」に注目した傾向の確認

次に，個々の ctDNA の変異の程度（変異率）ではなく，被験者ごとに ctDNA が検出されたかどうか（検出の有無）に注目して，集計を行った。さらに遺伝子ごとの傾向を確認するため，遺伝子を区別しない場合と区別する場合でタイムポイントごとに集計した。結果を【表 12】に示す。

【表 12】 ctDNA が検出された被験者数および割合

項目	治療前		治療4時間		治療2日		治療8日		治療15日		治療29日		治療前～29日		
全解析症例数	21	(100%)	21	(100%)	20	(100%)	21	(100%)	21	(100%)	20	(100%)	19	(100%)	
ctDNA陽性症例数 (%)	11	(52.4%)	12	(57.1%)	12	(60%)	11	(52.4%)	11	(52.4%)	9	(45%)	16	(84.2%)	
遺伝子別 陽性症例数 (%)	BRAF	0	(0%)	1	(4.8%)	1	(5%)	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	2	(10.5%)
	EGFR	1	(4.8%)	1	(4.8%)	1	(5%)	1	(4.8%)	1	(4.8%)	0	(0%)	1	(5.3%)
	ERBB2	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)	1	(4.8%)	0	(0%)	0	(0%)	1	(5.3%)
	KRAS	3	(14.3%)	1	(4.8%)	3	(15%)	3	(14.3%)	1	(4.8%)	2	(10%)	6	(31.6%)
	NFE2L2	0	(0%)	0	(0%)	2	(10%)	0	(0%)	1	(4.8%)	0	(0%)	3	(15.8%)
	PIK3CA	1	(4.8%)	1	(4.8%)	1	(5%)	2	(9.5%)	2	(9.5%)	2	(10%)	4	(21.1%)
	TP53	9	(42.9%)	10	(47.6%)	8	(40%)	8	(38.1%)	10	(47.6%)	7	(35%)	12	(63.2%)

ctDNA が検出された症例はニボルマブ治療前で約半数（52.4%）であり，その後のタイムポイントでもほぼ同様の値であった。ただし，【表 11】からも読み取れるように，陽性症例はタイムポイントごとに入れ替わっている状況であった。6 つのタイムポイントのいずれかで ctDNA が検出された症例は 16 例（84.2% ※検体 missing 症例除いた 19 例を対象）

変異検出遺伝子としては TP53 の頻度が最も高く、全期間累積で 12 例（63.2%）であった。次に KRAS が 6 例（31.6%），PIK3CA が 4 例（21.1%）であった。

3-9. ctDNA 検出とニボルマブ治療効果の関連解析

解析対象 21 例の ctDNA_{max}, ctDNA スパイクの有無とニボルマブ効果 (OR, PFS, OS) の対応表を【表 13】にまとめた。

【表 13】 ctDNA_{max} および ctDNA スパイクの有無とニボルマブ効果の一覧

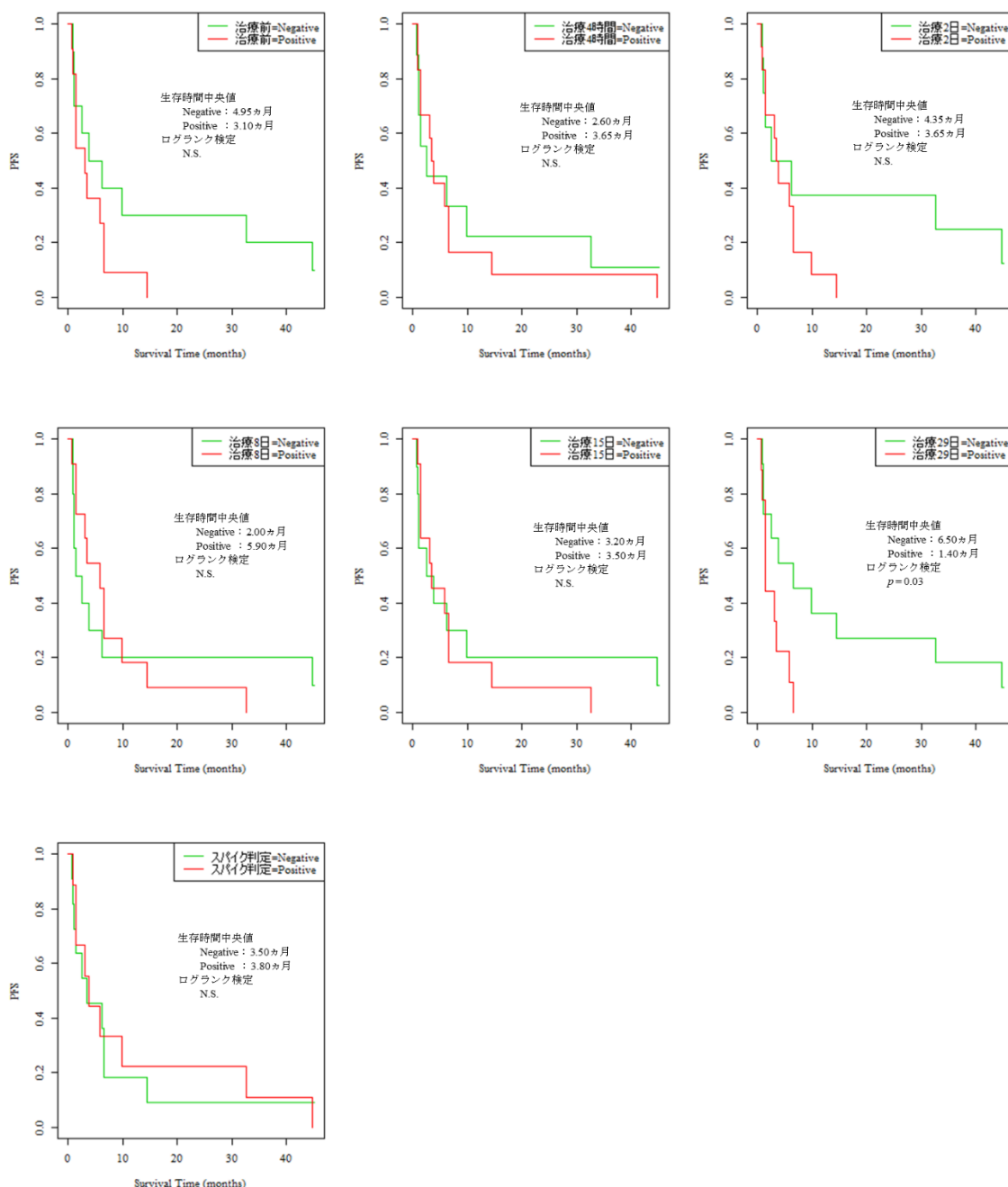
“missing”は検体の欠損を示す。OR は CT 画像による腫瘍の大きさによる評価 (客観的腫瘍縮小効果: objective response), PFS は治療開始後がんが進行せず安定した状態であった期間 (無増悪生存期間: progression free survival), OS は治療開始後死亡するまでの期間 (全生存期間 (overall survival: OS) を示す。OR は完全奏功 (complete response: CR, すべての標的病変が消失), 部分奏功 (partial response: PR, 標的病変の最長径の和が 30%以上減少), 進行 (progressive disease: PD, 標的病変の最長径の和が 20%以上増加), 安定 (stable disease: SD, PR と PD の間), 評価不能 (Not evaluable: NE, 副作用等の何らかの事情により病巣の評価を未施行) の 5 段階に分類される。スパイク判定カラムの説明については, 3-8-2 項を参照。

被験者No.	OR		PFS		OS		ctDNA _{max} (%)						スパイク判定
	判定月	効果判定	判定月	イベント	判定月	イベント	治療前	治療4時間	治療2日	治療8日	治療15日	治療29日	
1	0.9	PD	0.9	増悪	11.7	死亡	0	1.7	0	0	0	0	Positive
2	3.8	PD	3.8	増悪	13.8	死亡	0	0.5	1.1	0	0	0	Positive
3	6.5	PR	6.5	増悪	47.9	死亡	1.7	3	1.6	2.8	0.4	0	Negative
4	9.8	PR	9.8	増悪	34.5	死亡	0	0	0.7	0.4	0	0	Positive
6	1.4	PD	1.4	増悪	14.6	死亡	0.5	0	1.4	0	0.5	0.5	Positive
7	3.5	SD	3.5	増悪	8.9	死亡	5.4	2.4	3.5	4.8	3.1	3.3	Negative
8	44.8	CR	44.8	増悪	50.4	生存	0	0.5	0	0	0	0	Positive
12	6.6	PR	6.6	増悪	12.3	死亡	6.2	4.9	3.9	4.4	4.8	4.8	Negative
13	14.5	PR	14.5	増悪	48.0	死亡	4.4	4.6	5.6	6.2	6.9	0	Negative
14	6.1	PR	6.1	増悪	20.9	死亡	0	0	0	0	0	missing	Negative
16	1.1	PD	1.1	増悪	21.8	死亡	0	0	0	0	0	0	Negative
17	5.9	PR	5.9	増悪	24.4	死亡	0.3	0.5	1	0.7	0.5	0.6	Positive
19	1.1	PD	1.1	増悪	12.4	死亡	0	0	missing	0	0	0	Unknown
20	2.6	PD	2.6	増悪	47.1	生存	0	0	0	0	0	0	Negative
22	1.4	PD	1.4	増悪	4.7	死亡	0.6	0.5	0	0.5	2.2	0.9	Positive
23	0.7	PD	0.7	増悪	10.2	死亡	0.5	0	0.6	0.4	0	0.8	Negative
24	unknown	CR	45.1	未増悪	45.1	生存	0	0	0	0	0	0	Negative
25	32.7	CR	32.7	増悪	44.9	生存	0	0	0	0.3	0.4	0	Positive
26	3.1	SD	3.1	増悪	30.9	死亡	4.2	7.8	12.6	1.7	0.9	1	Positive
29	1.4	PD	1.4	増悪	14.5	死亡	20	20.2	25	20.1	17.6	20.4	Negative
30	0.9	PD	0.9	増悪	12.9	死亡	1.7	0.8	1.3	0	0.4	0.6	Negative

ICIs の効果判定に関して, CT 画像上の腫瘍サイズの変化をもとに評価する OR では, pseudoprogression の影響により正確な効果判定が行えない可能性が懸念された。そこで本研究では, ニボルマブの治療効果の評価方法に関して PFS および OS に注目して解析を行った。

3-9-1. ctDNA 検出とニボルマブ治療 PFS との関連解析

ニボルマブ治療 1 か月までの各タイムポイントにおける ctDNA 検出有無、およびスパイク判定と PFS との関連を生存時間分析（カプラン・マイヤー法）、およびログランク検定により評価した【図 9】。



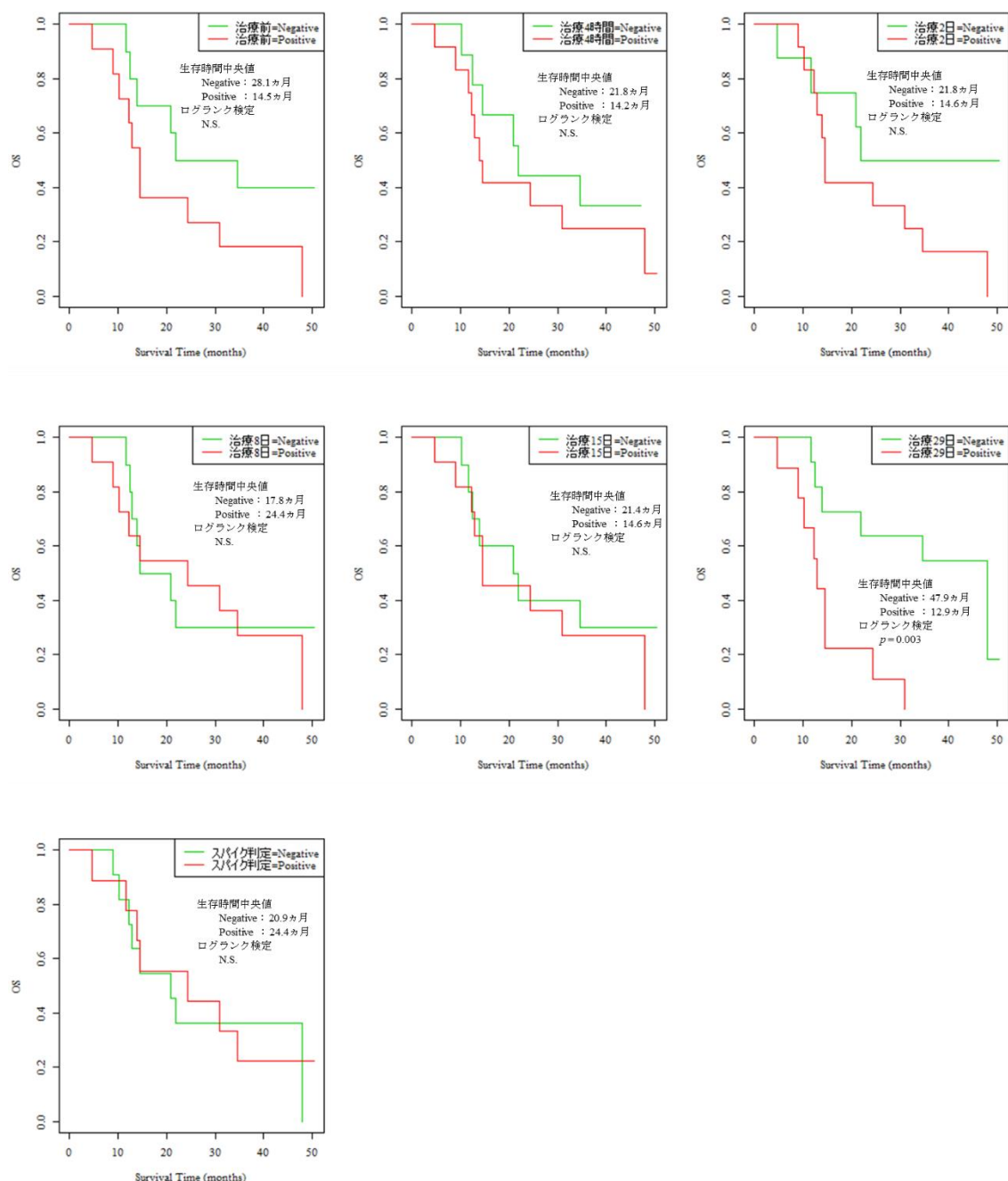
【図 9】各タイムポイントの ctDNA 検出有無およびスパイク判定有無とニボルマブ治療 PFS との関連

ニボルマブ治療 1 か月までの各タイムポイントにおいて、ctDNA 検出有無で症例を 2 群に群分けし、その群間での PFS の違いを生存時間分析（カプラン・マイヤー法、ログランク検定）で比較した。ニボルマブ治療 1 か月までの ctDNA スパイク有無の間の PFS の違いについても同様に比較解析した。統計解析環境 R の survival パッケージを用いて解析した。

ニボルマブ治療 29 日における ctDNA 検出の有無により PFS に有意な差が認められた (ログランク検定 : p -value = 0.03). PFS の中央値は治療 29 日 ctDNA 陰性群で 6.5 か月 (95% CI : 2.6, 未到達), 陽性群で 1.4 か月 (95% CI : 1.4, 未到達) であった. それ以外のタイムポイントにおける ctDNA 検出およびスパイク判定と PFS との間には関連は認められなかった.

3-9-2. ctDNA 検出とニボルマブ治療 OS との関連

ニボルマブ治療 1 か月までの各タイムポイントの ctDNA 検出有無およびスパイク判定と OS の関連を生存時間分析（カプラン・マイヤー法），およびログランク検定により評価した【図 10】。



【図 10】各タイムポイントの ctDNA 検出有無およびスパイク判定有無とニボルマブ治療 OS との関連

ニボルマブ治療 1 か月までの各タイムポイントにおいて，ctDNA 検出有無で症例を 2 群に群分けし，その群間での OS の違いを生存時間分析（カプラン・マイヤー法，ログランク検定）で比較した．ニボルマブ治療 1 か月までの ctDNA スパイク有無の間の OS の違いについても同様に比較解析した．統計解析環境 R の survival パッケージを用いて解析した．

PFS 同様にニボルマブ治療 29 日における ctDNA 検出の有無間で OS に有意差が認められた (ログランク検定: p -value = 0.003). OS の中央値は治療 29 日 ctDNA 陰性群で 47.9 か月 (95% CI: 21.8, 未到達), 陽性群で 12.9 か月 (95% CI: 10.2, 未到達) であった. 1 年生存率は陰性群で 90.9%, 陽性群で 55.6%, 2 年生存率は陰性群で 63.6%, 陽性群で 11.1% と顕著な差が認められた. それ以外のタイムポイントにおける ctDNA 検出およびスパイク判定と OS との間には関連は認められなかった.

3-9-3. ニボルマブ OS に影響する ctDNA 以外の因子の影響の確認

ここまでの解析により, ニボルマブ治療 29 日の ctDNA 検出がニボルマブ治療予後 (PFS, OS) と関連することが明らかとなった. 次に, 結果の交絡因子を確認すべく, ノンパラメトリックな生存時間分析手法の一つである COX 比例ハザードモデルを用いた単変量解析により, OS に影響がある被験者背景情報の抽出を試みた【表 14】.

【表 14】被験者背景情報の OS への影響 (単変量 COX 比例ハザードモデル解析結果)

COX 比例ハザードモデルを用いて, OS に影響を及ぼす被験者背景情報の同定を試みた. 解析は単変量で行った. 統計解析環境 R の survival パッケージを用いて解析した. *は OS への寄与が有意 ($p < 0.05$) であったことを示す.

項目	調査時期	モデルへの投入単位	ハザード比	ハザード比の信頼区間	p-value
年齢	ニボルマブ治療開始時	年 (連続量)	0.98	(0.91, 1.04)	0.474
性別	ニボルマブ治療開始時	男性/女性 (カテゴリーカル)	0.42	(0.11, 1.52)	0.186
罹病期間	ニボルマブ治療開始時	年 (連続量)	0.75	(0.51, 1.10)	0.141
組織型	肺癌治療開始時	扁平上皮癌/腺癌 (カテゴリーカル)	2.27	(0.69, 7.44)	0.175
ステージ	肺癌治療開始時	IIIB未満/IIIB以上 (カテゴリーカル)	0.58	(0.18, 1.80)	0.343
腫瘍径	ニボルマブ治療開始時	mm (連続量)	1.03	(1.00, 1.06)	0.047 *
喫煙歴	肺癌治療開始時	あり/なし (カテゴリーカル)	1.31	(0.29, 5.86)	0.728
ctDNA検出	ニボルマブ治療29日	あり/なし (カテゴリーカル)	5.20	(1.55, 17.4)	0.007 *

OS と関連がある背景情報として, ニボルマブ治療開始時の腫瘍径 (p -value = 0.047) が抽出され, 腫瘍径が大きいほど治療開始後の死亡リスクが高かった. またニボルマブ治療 29 日の ctDNA 検出についても, カプランマイヤー法 (ログランク検定) 同様, COX 解析にて OS との有意な関連 (p -value = 0.007) が検出された.

続いて、OS との関連が明らかとなったニボルマブ治療開始時の腫瘍径と治療 29 日の ctDNA 検出の独立性について、多変量 COX 比例ハザードモデルで評価した。

【表 15】被験者背景情報の OS への影響（多変量 COX 比例ハザードモデル解析結果）

多変量 COX 比例ハザードモデルを用いて、OS に影響を及ぼす因子として同定された「ニボルマブ治療開始時の腫瘍径」と「治療 29 日の ctDNA 検出」を評価した。統計解析環境 R の survival パッケージを用いて解析した。*は OS への寄与が有意 ($p < 0.05$) であったことを示す。

項目	調査時期	モデルへの投入単位	ハザード比	ハザード比の信頼区間	p-value
腫瘍径	ニボルマブ治療開始時	mm (連続量)	1.01	(0.98, 1.05)	0.362
ctDNA検出	ニボルマブ治療29日	あり/なし (カテゴリカル)	4.08	(1.10, 15.1)	0.036 *

多変量 COX 解析の結果、ニボルマブ治療 29 日の ctDNA 検出のみが有意な因子として抽出された ($p\text{-value} = 0.036$)。治療 29 日の ctDNA 検出は被験者背景情報とは独立した OS の予測因子であることが示された。

第4章 考察

本研究では、21例のNSCLC患者を対象に、ニボルマブ治療開始早期のctDNA動態が治療効果の予測因子となりうるかを検討した。ニボルマブ治療開始前、治療後4時間、2日、8日、15日、29日と、コントロールされたインターバルで血漿を採取し、肺癌遺伝子の検出に特化したNOIR-SS肺癌パネルを用いてctDNAを検出した。検出されたctDNAと治療予後との関連を解析し、治療29日にctDNAが検出されなかった患者では、検出された患者に比べて治療予後が改善されることを見出した。ICIsは画像的な効果発現までに2~3ヶ月程度を擁すると報告されており^{13,14}、本研究で得られた知見は、それよりも早い、治療1か月後のctDNAを検査することで、その後の治療予後が予測できる可能性を示すものであった。

以下に本研究で得られた知見について、要点ごとに考察する。

4-1. NOIR-SS肺癌パネルについて

ctDNAは、正常細胞由来の多量のccfDNAとともに血漿中に存在するため、一般的にその相対存在量は少なく、検出される変異率が低くなる。Lanmanらは1000例の癌患者のctDNAの変異率を測定し、その第一四分位数、中央値、第三四分位数はそれぞれ0.2、0.5、2.5%であったと報告している⁵⁷。通常、NGSによる変異検出感度は約1%とされており⁵³、そのままでは大部分の癌患者のctDNAは偽陰性となる。より多くの癌患者のctDNAを検出するためには、より高感度な手法である分子バーコード法の活用が必要となる。しかし、分子バーコード法は1分子当たり複数のリードを確保してコンセンサス配列を取る必要があるため、十分な精度確保のためには必要NGSリード数が多くなり、シーケンス試薬コストの増大につながる。現実的なコストで高感度を達成するには、ターゲット領域を効率的に絞り込む必要がある。

本研究では、できる限り多くのNSCLC症例のctDNAを検出するため、NSCLCで変異頻度が高い遺伝子領域をカバーしたNOIR-SS肺癌パネル【表2】を設計した。COSMICに登録されているNSCLC検体の遺伝子変異データを用いて本パネルの検体カバー率を確認したところ、約80%と十分に高い値であった。一方、本パネルの変異検出感度は0.1%を達成し、ctDNAを検出するために十分な性能であることが確認できた【表5】。NOIR-SSの高い感度を保ちつつ、高いNSCLC症例カバー率を確保したパネルを作成することに成功した。

本研究において、NOIR-SS 肺癌パネルで ctDNA が検出された NSCLC 患者の割合は、ニボルマブ治療の 1 つのタイムポイントのみで 45-60%、治療前～治療 1 か月までの 6 つのタイムポイント全てを考慮すると 84%であった【表 12】。NSCLC 患者の血中への ctDNA 滲出率は約 60-80%と報告されており⁹²⁻⁹⁴、これを前述のパネルのカバー率（80%）と合わせて考慮すると本研究の ctDNA 陽性率は概ね妥当かそれ以上であると考えられた。

本研究で ctDNA が検出された遺伝子としては、*TP53* が最も多く 42.9%、続いて *KRAS* が 14.3%であった。*TP53* および *KRAS* 遺伝子の変異は喫煙者で特に頻度が高いことが明らかとなっている⁹⁵。本研究で解析対象とした 21 例の喫煙歴も 85.7%と高かったことが *TP53* および *KRAS* を中心とした遺伝子変異プロファイルに寄与しているものと考えられた。また、通常、日本人の NSCLC で最も変異頻度が高い *EGFR*⁹⁵ の変異が検出された被験者は 1 例のみであった。これは *EGFR* 遺伝子変異を有する NSCLC 患者は漏れなく EGFR-TKI で治療されるため、ニボルマブ治療にエントリーされにくい実臨床の状況を反映した結果と考えられた。

4-2. ニボルマブ治療について

本研究では、二次治療としてニボルマブの投薬が決定した NSCLC 症例 30 名を登録した。30 例の ORR は 30%、生存時間分析による PFS の中央値は 1.4 か月、OS の中央値は 14.2 か月であり【図 5】、過去に報告されたニボルマブの治療成績と遜色ない結果であった⁹⁶。

一方、本研究ではニボルマブ治療開始 1 か月の ctDNA 動態に注目するため、その間の投薬状況（通常 2 週間に 1 回）が結果に影響を及ぼすと考えた。そこで、治療開始 1 か月のニボルマブの投薬情報を詳細に確認したところ、ニボルマブ投薬が初回のみで被験者が 7 例（副作用が 4 例、病勢進行が 3 例）、ニボルマブ投与 1 回目と 2 回目の間隔に逸脱が認められた症例（>30 日）が 2 例存在した【表 8】。これら計 9 例については ctDNA 解析結果にバイアスを生じる可能性があると考え、解析から除外することとした。

本研究の主題ではないが、これら解析脱落例の中に特徴的な ccfDNA 動態が確認された症例が 2 例（被験者 No.9 と No.21）存在した。いずれも副作用が原因で初回の投薬のみでニボルマブ治療が中止された症例である。被験者 No.9 は、ニボルマブ治療 7 日目で脳梗塞が確認されて投薬中止に至っている。脳梗塞は ICIs の重大な副作用の 1 つとして知られている。その明確な機序は明らかでないものの、免疫チェックポイントタンパク質がアテローム発生の根底にある炎症反応を制御しているためと考えられている⁹⁷。この症例では、ニボルマブ治療前の ccfDNA が他の被験者と比べて顕著な高値を

示し、治療 2 日後にはさらに約 2 倍の増加を認めた【表 7】。ccfDNA は正常組織の破壊により増加することから、この増加は脳梗塞の予兆を捉えたものである可能性が考えられた。一方、被験者 No.21 は、投与直後にアナフィラキシーを発症し、試験中止となった症例である。治療前の ccfDNA 量は他の被験者と同程度であったが、治療 4 時間後に ccfDNA 量の著しい増加を認めた【表 7】。この ccfDNA 顕著な増加は、アナフィラキシーにより正常細胞が破壊された影響で生じた可能性がある。以上の ccfDNA に関する 2 症例の知見から、ccfDNA をモニタリングすることで、ICIs の副作用の発生を早期に評価できる可能性が示唆された。本研究は ccfDNA ではなく、あくまで ctDNA にフォーカスを当てた研究ではあるが、副作用の予測は治療効果の予測とともに極めて重要な課題であり、ICIs 投与後の ccfDNA 量をこれほど厳密に調べたスタディはこれまでに存在しないことから、これら結果は貴重な知見であると考えられた。一方で、これら症例が示したように、ccfDNA 量は腫瘍以外の因子で顕著に変動するため、ccfDNA 量で腫瘍の変化をモニタリングすることは困難であろうと考えられた。

4-3. ctDNA によるニボルマブ治療効果予測について

本研究では、ニボルマブ治療開始前、治療後 4 時間、2 日、8 日、15 日、29 日の ctDNA 検出有無と、治療予後指標である PFS および OS との関連解析を行い、治療 29 日の ctDNA 検出が PFS および OS の予測因子であることを見出した【図 9 および図 10】。治療 29 日の ctDNA 陽性群に対し、陰性群では、PFS、OS いずれも約 4 倍の延長が認められた。

ctDNA 動態と ICIs の治療効果との関連は、まず ICIs の臨床応用が早かった悪性黒色腫（メラノーマ）で知見が重ねられた⁹⁸⁻¹⁰⁰。最も初めに報告したのは Lipson らであり、ICIs の一つであるイピリムマブ投与 4 例の治療開始後 ctDNA 量と画像上の腫瘍サイズ変化が相関することを示した⁹⁸。この研究の中で著者らは、腫瘍が身体検査あるいは画像上で退縮する数週間前に ctDNA が消失する症例を経験している（腫瘍反応の早期予測マーカーとしての可能性を示唆）。また、Lee らは、ICIs 治療 8 週以内に ctDNA が陰性化する症例で PFS や OS の延長が認められることを報告している¹⁰⁰。

悪性黒色腫に続いて、ICIs の応用が進んだ肺癌についても同様の知見が得られている。Cabel らは、主にデジタル PCR 法を用いた手法で、ニボルマブおよびペンブロリズマブ治療 8 週後に ctDNA が検出されなかった患者で PFS および OS の延長が認められたことを報告している⁸⁵。著者らは論文の中で、より早期のポイントでの検証と NGS による多変異の検出の必要性（良好な予後には全ての腫瘍由来変異の陰性化が必要と考察している）を課題と

して述べており、我々の研究はまさにその要件を満たした仕様となっている。

また、Iijima らは通常の NGS 法を用いてニボルマブの投与 1, 2, 4, 6 週の ctDNA を測定し、治療効果との関連を解析している⁸⁷。評価した N 数が 7 例と極めて限定的であるが、治療前から 2 週間後の ctDNA 減少が認められた 4 名で腫瘍縮小効果が認められたことを報告している。我々の研究との違いは、治療前に ctDNA が 2%以上の変異率を示した症例のみを解析対象としている点、治療効果として長期の予後評価を行っていない点である。前者については、用いた NGS 法は分子バーコードを用いた手法ではないため、感度が十分でなく、そのようなカットオフになったと推察される。実際の癌患者集団では 2%より低い変異率を示す患者が多いこと⁵⁷を鑑みると、検査対象となる患者が限られてしまうため、知見の応用は極めて難しいと考えられた。前述の通り、我々の NOIR-SS 肺癌パネルでは 0.1%の変異率を捉えることができ、より多くの患者をエントリーすることができる仕様となっている。また、長期予後が評価できていない点は、このスタディが 2016 年にスタートして 2017 年にパブリッシュされたものであり、OS を評価するには十分な時間がなかったためと推察される。

これらの過去の報告はいずれも、ICIs 治療開始後約 2 か月以内に ctDNA が陰性化あるいは減少することが、良好な予後と関連することを示しており、本研究で得られた知見と合致する。本研究において、より早い 1 か月のタイミングで、約 50%の NSCLC 患者で ctDNA が陰性化し、かつ、それら患者で長期の治療予後 (OS) が改善する結果を示したことは新規の知見である。

ctDNA の陰性化は、一般的に、腫瘍細胞の退縮を意味すると考えられる。しかし、しばしば CT 画像上の腫瘍消失より先に生じることが報告されており⁹⁸、本研究でも同様の症例が散見された。生物学的にこの現象を説明・証明した報告はこれまでにない。仮説の一つとして、ICIs 治療経過中の ctDNA 陰性化時の画像診断上の”影”が、真には”腫瘍”ではなく、”pseudoprogression¹¹により腫瘍部位に浸潤した免疫細胞集団”である可能性が考えられる。ctDNA 検出と CT 画像診断結果の不一致が認められた症例の組織生検を行うことができれば、その回答が得られ、ICIs 治療中の ctDNA 動態に関する解釈がより一層進むものと考えられる。そのような研究の進展が待たれる。

その他、がん治療の効果の早期予測に関して、治療開始後の ctDNA の一過性の上昇 (スパイク) の出現が良好な効果と関係するという報告が散見される^{83,84}。Kato らは、肺癌患者を対象として、EGFR-TKI 治療後早期の ctDNA を測定し、治療 2 週以内に一過性の ctDNA 上昇 (スパイク) が認められる患者で治療効果が高いことを示した⁸³。Xi らは悪性黒色腫に対する T 細胞免疫療法開始後早期の ctDNA を測定し、治療 1 か月以内に一過性の ctDNA 上昇 (スパイク) を認め、完全に消失する患者で治療効果が高いことを報告した⁸⁴。これらの知見の存在から、本研究においても治療 1 か月内のスパイ

ク検出の有無と ICI の治療効果との関連解析を試みたが、残念ながら傾向は認められなかった。一過性の ctDNA の上昇は、恐らく、患者ごとに、また治療の作業機序ごとにタイミングが異なり、その検出が難しく、再現性が得られにくい検査対象であることが推察された。

4-4. 本研究のリミテーション

本研究で得られた知見の限界を以下のように考える。

一つ目は、解析対象症例数の少なさである。本臨床研究は 30 例の登録目標で計画されたが、ニボルマブ投与 1 か月までに投薬中止が決定された症例が 7 例、通常投薬スケジュールから逸脱が認められた症例が 2 例と、計 9 例が解析から脱落となった。この脱落数は想定外であった。21 例という解析数は、結果を一般化するにはあまりに少ない症例数であり、今後結果を検証するための追試、特に解析条件を決定した上での前向き試験が必要である。

二つ目は、肺癌組織の遺伝子変異プロファイルを取得しておらず、血漿で捉えた遺伝子変異が真に腫瘍組織由来なのかを確認できていない点である。また、ccfDNA には、主に造血系細胞のクローン性造血に伴う遺伝子変異が検出されることが明らかとなっており⁶²、これを腫瘍由来の変異と区別する必要もある。これら問題を解決するには、まず腫瘍組織を取得し、そこで生じている変異を腫瘍由来変異として同定する。さらに白血球の変異プロファイルを取得し、前述の腫瘍由来変異と同一の変異が存在しないかを確認する。これらの処理により、ccfDNA の変異プロファイルから真に純粋な ctDNA 画分を同定することができる。本研究では、検体採取サイトでの通常診療を優先するため、肺癌組織、白血球の検体の取得が叶わなかった。そのため、バイオインフォマティクス技術により腫瘍特異的な変異の濃縮を可能とする CV78 フィルターを適用した⁶¹。先の研究において、NOIR-SS と CV78 フィルターを組み合わせることで、健常者 ccfDNA にて検出された遺伝子変異が除去され、一方、癌患者の変異は除外されずに残存することが検証されている⁶¹。しかし、真に純粋な ctDNA 画分を同定するためには腫瘍組織および白血球検体を用いた前述の手法がベストであることに変わりはなく、それが行えていない点は本研究のリミテーションと言える。

三つ目は、ctDNA が検出できない、滲出しない患者が存在し、それら患者では ctDNA がバイオマーカーとして機能しない可能性があることである。本研究で解析対象とし、かつ全 6 タイムポイントで検体を得られた 19 例のうち、いずれのタイムポイントも ctDNA が検出されなかった患者は 3 例（15.8%、被験者 No.16, 20, 24）であった【表 13】。これら症例はいずれも治療予後が良好であった。しかし、ctDNA が検出されない患者が真に治療予

後が良いのか、腫瘍組織で遺伝子変異を有しない、あるいは血漿に滲出しにくい（あるいはされても分解が早く進む）だけなのかは、本研究の知見だけではわからない。血漿に全く ctDNA が検出されない患者の治療予後については、今後症例数を増やして精査していく必要がある。

4-5. 結語

NOIR-SS 肺癌パネルを用いて、ニボルマブ治療開始 1 か月後の NSCLC 患者の ctDNA を測定することで、治療予後を予測できる可能性がある（治療 1 か月後 ctDNA 陰性化は治療予後である PFS や OS を延長する）。得られた知見の一般化および臨床応用に向けて、さらに症例数を増やしての検証が望まれる。

謝辞

本研究の実施にあたり、被験者としてご協力いただきました肺癌患者の皆様
様に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行、ならびに博士論文執筆に際し、終始多大なるご指導、ご鞭撻
を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 分子免疫制御研究室 河合太郎教授、疾患ゲノム医学研究室 加藤菊也教授、大阪国際がんセンター 呼吸器内科 今村文生先生、西野和美先生に謹んで感謝の意を表しますとともに厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、懇切な御指導、御助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 機能ゲノム医学研究室 石田靖雅准教授、計算生物学研究室 作村諭一准教授、疾患ゲノム医学研究室 久木田洋児准教授（現大阪国際がんセンター研究所）に心より御礼申し上げます。

次世代シーケンサーによる DNA 配列読み取りにご協力いただきました共同研究先の株式会社 DNA チップ研究所 診断事業部 佐藤慶治氏、石井美穂氏に、心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Wei, S. C., Duffy, C. R., and Allison, J. P. (2018) Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov* **8**, 1069-1086
2. Brahmer, J., Reckamp, K. L., Baas, P., Crino, L., Eberhardt, W. E., Poddubskaya, E., Antonia, S., Pluzanski, A., Vokes, E. E., Holgado, E., Waterhouse, D., Ready, N., Gainor, J., Aren Frontera, O., Havel, L., Steins, M., Garassino, M. C., Aerts, J. G., Domine, M., Paz-Ares, L., Reck, M., Baudelet, C., Harbison, C. T., Lestini, B., and Spigel, D. R. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **373**, 123-135
3. Weber, J. S., D'Angelo, S. P., Minor, D., Hodi, F. S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N. I., Miller, W. H., Jr., Lao, C. D., Linette, G. P., Thomas, L., Lorigan, P., Grossmann, K. F., Hassel, J. C., Maio, M., Sznol, M., Ascierto, P. A., Mohr, P., Chmielowski, B., Bryce, A., Svane, I. M., Grob, J. J., Krackhardt, A. M., Horak, C., Lambert, A., Yang, A. S., and Larkin, J. (2015) Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **16**, 375-384
4. Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., and Urba, W. J. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711-723
5. Gandhi, L., Rodriguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M. J., Powell, S. F., Cheng, S. Y., Bischoff, H. G., Peled, N., Grossi, F., Jennens, R. R., Reck, M., Hui, R., Garon, E. B., Boyer, M., Rubio-Viqueira, B., Novello, S., Kurata, T., Gray, J. E., Vida, J.,

- Wei, Z., Yang, J., Raftopoulos, H., Pietanza, M. C., Garassino, M. C., and Investigators, K.-. (2018) Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **378**, 2078-2092
6. Ribas, A., Puzanov, I., Dummer, R., Schadendorf, D., Hamid, O., Robert, C., Hodi, F. S., Schachter, J., Pavlick, A. C., Lewis, K. D., Cranmer, L. D., Blank, C. U., O'Day, S. J., Ascierto, P. A., Salama, A. K., Margolin, K. A., Loquai, C., Eigentler, T. K., Gangadhar, T. C., Carlino, M. S., Agarwala, S. S., Moschos, S. J., Sosman, J. A., Goldinger, S. M., Shapira-Frommer, R., Gonzalez, R., Kirkwood, J. M., Wolchok, J. D., Eggermont, A., Li, X. N., Zhou, W., Zernhelt, A. M., Lis, J., Ebbinghaus, S., Kang, S. P., and Daud, A. (2015) Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **16**, 908-918
 7. Kaufman, H. L., Russell, J., Hamid, O., Bhatia, S., Terheyden, P., D'Angelo, S. P., Shih, K. C., Lebbe, C., Linette, G. P., Milella, M., Brownell, I., Lewis, K. D., Lorch, J. H., Chin, K., Mahnke, L., von Heydebreck, A., Cuillerot, J. M., and Nghiem, P. (2016) Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **17**, 1374-1385
 8. Ritchie, G., Gasper, H., Man, J., Lord, S., Marschner, I., Friedlander, M., and Lee, C. K. (2018) Defining the Most Appropriate Primary End Point in Phase 2 Trials of Immune Checkpoint Inhibitors for Advanced Solid Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol* **4**, 522-528
 9. Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., Rubinstein, L., Shankar, L., Dodd, L., Kaplan, R., Lacombe, D., and Verweij, J. (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* **45**, 228-247
 10. Jia, W., Gao, Q., Han, A., Zhu, H., and Yu, J. (2019) The potential mechanism, recognition and clinical significance of tumor pseudoprogression after immunotherapy. *Cancer Biol Med* **16**, 655-670

11. West, H. J. (2015) JAMA Oncology Patient Page. Immune Checkpoint Inhibitors. *JAMA Oncol* **1**, 115
12. Robert, C., Long, G. V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J. C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocha, E., Savage, K. J., Hernberg, M. M., Lebbe, C., Charles, J., Mihalcioiu, C., Chiarion-Sileni, V., Mauch, C., Cognetti, F., Arance, A., Schmidt, H., Schadendorf, D., Gogas, H., Lundgren-Eriksson, L., Horak, C., Sharkey, B., Waxman, I. M., Atkinson, V., and Ascierto, P. A. (2015) Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* **372**, 320-330
13. Carbone, D. P., Reck, M., Paz-Ares, L., Creelan, B., Horn, L., Steins, M., Felip, E., van den Heuvel, M. M., Ciuleanu, T. E., Badin, F., Ready, N., Hiltermann, T. J. N., Nair, S., Juergens, R., Peters, S., Minenza, E., Wrangle, J. M., Rodriguez-Abreu, D., Borghaei, H., Blumenschein, G. R., Jr., Villaruz, L. C., Havel, L., Krejci, J., Corral Jaime, J., Chang, H., Geese, W. J., Bhagavatheeswaran, P., Chen, A. C., Socinski, M. A., and CheckMate, I. (2017) First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **376**, 2415-2426
14. Hui, R., Garon, E. B., Goldman, J. W., Leighl, N. B., Hellmann, M. D., Patnaik, A., Gandhi, L., Eder, J. P., Ahn, M. J., Horn, L., Felip, E., Carcereny, E., Rangwala, R., Lubiniecki, G. M., Zhang, J., Emancipator, K., Roach, C., and Rizvi, N. A. (2017) Pembrolizumab as first-line therapy for patients with PD-L1-positive advanced non-small cell lung cancer: a phase 1 trial. *Ann Oncol* **28**, 874-881
15. Haanen, J., Carbone, F., Robert, C., Kerr, K. M., Peters, S., Larkin, J., Jordan, K., and Committee, E. G. (2017) Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **28**, iv119-iv142
16. Postow, M. A., Sidlow, R., and Hellmann, M. D. (2018) Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* **378**, 158-168
17. Khan, O. F., and Monzon, J. (2020) Diagnosis, monitoring, and management of adverse events from immune checkpoint inhibitor

- therapy. *Curr Oncol* **27**, S43-S50
18. Chow, L. Q. M., Haddad, R., Gupta, S., Mahipal, A., Mehra, R., Tahara, M., Berger, R., Eder, J. P., Burtness, B., Lee, S. H., Keam, B., Kang, H., Muro, K., Weiss, J., Geva, R., Lin, C. C., Chung, H. C., Meister, A., Dolled-Filhart, M., Pathiraja, K., Cheng, J. D., and Seiwert, T. Y. (2016) Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort. *J Clin Oncol* **34**, 3838-3845
 19. Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M. J., Felip, E., Lee, J. S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J. C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R. Z., Zhang, J., Luceford, J. K., Rangwala, R., Lubiniecki, G. M., Roach, C., Emancipator, K., Gandhi, L., and Investigators, K.-. (2015) Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **372**, 2018-2028
 20. Herbst, R. S., Baas, P., Kim, D. W., Felip, E., Perez-Gracia, J. L., Han, J. Y., Molina, J., Kim, J. H., Arvis, C. D., Ahn, M. J., Majem, M., Fidler, M. J., de Castro, G., Jr., Garrido, M., Lubiniecki, G. M., Shentu, Y., Im, E., Dolled-Filhart, M., and Garon, E. B. (2016) Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1540-1550
 21. Le, D. T., Kim, T. W., Van Cutsem, E., Geva, R., Jager, D., Hara, H., Burge, M., O'Neil, B., Kavan, P., Yoshino, T., Guimbaud, R., Taniguchi, H., Elez, E., Al-Batran, S. E., Boland, P. M., Crocenzi, T., Atreya, C. E., Cui, Y., Dai, T., Marinello, P., Diaz, L. A., Jr., and Andre, T. (2020) Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol* **38**, 11-19
 22. Berland, L., Heeke, S., Humbert, O., Macocco, A., Long-Mira, E., Lassalle, S., Lespinet-Fabre, V., Lalvee, S., Bordone, O., Cohen, C., Leroy, S., Hofman, V., Hofman, P., and Ilie, M. (2019) Current views on tumor mutational burden in patients with non-

- small cell lung cancer treated by immune checkpoint inhibitors. *J Thorac Dis* **11**, S71-S80
23. Rimm, D. L., Han, G., Taube, J. M., Yi, E. S., Bridge, J. A., Flieder, D. B., Homer, R., West, W. W., Wu, H., Roden, A. C., Fujimoto, J., Yu, H., Anders, R., Kowalewski, A., Rivard, C., Rehman, J., Batenchuk, C., Burns, V., Hirsch, F. R., and Wistuba, II. (2017) A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol* **3**, 1051-1058
 24. Scheel, A. H., Dietel, M., Heukamp, L. C., Johrens, K., Kirchner, T., Reu, S., Ruschoff, J., Schildhaus, H. U., Schirmacher, P., Tiemann, M., Warth, A., Weichert, W., Fischer, R. N., Wolf, J., and Buettner, R. (2016) Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. *Mod Pathol* **29**, 1165-1172
 25. 日本肺癌学会バイオマーカー委員会. 肺癌患者における PD-L1 検査の手引き第 1 版 (2017 年 3 月 27 日) .
 26. Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhaijee, F., Hiebner, T., Hruban, R. H., Wood, L. D., Cuka, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Zhou, S., Cornish, T. C., Taube, J. M., Anders, R. A., Eshleman, J. R., Vogelstein, B., and Diaz, L. A., Jr. (2015) PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* **372**, 2509-2520
 27. Marabelle, A., Le, D. T., Ascierto, P. A., Di Giacomo, A. M., De Jesus-Acosta, A., Delord, J. P., Geva, R., Gottfried, M., Penel, N., Hansen, A. R., Piha-Paul, S. A., Doi, T., Gao, B., Chung, H. C., Lopez-Martin, J., Bang, Y. J., Frommer, R. S., Shah, M., Gori, R., Joe, A. K., Pruitt, S. K., and Diaz, L. A., Jr. (2020) Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol*

- 38**, 1-10
28. Asaka, S., Arai, Y., Nishimura, Y., Yamaguchi, K., Ishikubo, T., Yatsuoka, T., Tanaka, Y., and Akagi, K. (2009) Microsatellite instability-low colorectal cancer acquires a KRAS mutation during the progression from Dukes' A to Dukes' B. *Carcinogenesis* **30**, 494-499
 29. Dudley, J. C., Lin, M. T., Le, D. T., and Eshleman, J. R. (2016) Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* **22**, 813-820
 30. Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmı, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E. B., Merghoub, T., Wolchok, J. D., Schumacher, T. N., and Chan, T. A. (2015) Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **348**, 124-128
 31. Willis, C., Fiander, M., Tran, D., Korytowsky, B., Thomas, J. M., Calderon, F., Zyczynski, T. M., Brixner, D., and Stenehjem, D. D. (2019) Tumor mutational burden in lung cancer: a systematic literature review. *Oncotarget* **10**, 6604-6622
 32. Hellmann, M. D., Nathanson, T., Rizvi, H., Creelan, B. C., Sanchez-Vega, F., Ahuja, A., Ni, A., Novik, J. B., Mangarin, L. M. B., Abu-Akeel, M., Liu, C., Sauter, J. L., Rekhtman, N., Chang, E., Callahan, M. K., Chaft, J. E., Voss, M. H., Tenet, M., Li, X. M., Covello, K., Renninger, A., Vitazka, P., Geese, W. J., Borghaei, H., Rudin, C. M., Antonia, S. J., Swanton, C., Hammerbacher, J., Merghoub, T., McGranahan, N., Snyder, A., and Wolchok, J. D. (2018) Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Cell* **33**, 843-852 e844
 33. Yarchoan, M., Hopkins, A., and Jaffee, E. M. (2017) Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N Engl J Med* **377**, 2500-2501
 34. Vokes, N. I., Liu, D., Ricciuti, B., Jimenez-Aguilar, E., Rizvi, H., Dietlein, F., He, M. X., Margolis, C. A., Elmarakeby, H. A., Girshman, J., Adeni, A., Sanchez-Vega, F., Schultz, N., Dahlberg, S., Zehir, A., Janne, P. A., Nishino, M., Umeton, R., Sholl, L. M.,

- Van Allen, E. M., Hellmann, M. D., and Awad, M. M. (2019) Harmonization of Tumor Mutational Burden Quantification and Association With Response to Immune Checkpoint Blockade in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Precis Oncol* **3**
35. Hatakeyama, K., Nagashima, T., Urakami, K., Ohshima, K., Serizawa, M., Ohnami, S., Shimoda, Y., Ohnami, S., Maruyama, K., Naruoka, A., Akiyama, Y., Kusuhara, M., Mochizuki, T., and Yamaguchi, K. (2018) Tumor mutational burden analysis of 2,000 Japanese cancer genomes using whole exome and targeted gene panel sequencing. *Biomed Res* **39**, 159-167
36. Chalmers, Z. R., Connelly, C. F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S. M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., Huang, F., He, Y., Sun, J., Tabori, U., Kennedy, M., Lieber, D. S., Roels, S., White, J., Otto, G. A., Ross, J. S., Garraway, L., Miller, V. A., Stephens, P. J., and Frampton, G. M. (2017) Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* **9**, 34
37. Fancello, L., Gandini, S., Pelicci, P. G., and Mazzarella, L. (2019) Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges. *J Immunother Cancer* **7**, 183
38. Merino, D. M., McShane, L. M., Fabrizio, D., Funari, V., Chen, S. J., White, J. R., Wenz, P., Baden, J., Barrett, J. C., Chaudhary, R., Chen, L., Chen, W. S., Cheng, J. H., Cyanam, D., Dickey, J. S., Gupta, V., Hellmann, M., Helman, E., Li, Y., Maas, J., Papin, A., Patidar, R., Quinn, K. J., Rizvi, N., Tae, H., Ward, C., Xie, M., Zehir, A., Zhao, C., Dietel, M., Stenzinger, A., Stewart, M., Allen, J., and Consortium, T. M. B. H. (2020) Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. *J Immunother Cancer* **8**
39. Lui, Y. Y., Chik, K. W., Chiu, R. W., Ho, C. Y., Lam, C. W., and Lo, Y. M. (2002) Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* **48**, 421-427
40. Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., and Grinshpun, A. (2019) Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol*

Ther **20**, 1057-1067

41. Mouliere, F., El Messaoudi, S., Pang, D., Dritschilo, A., and Thierry, A. R. (2014) Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol* **8**, 927-941
42. Vittori, L. N., Tarozzi, A., and Latessa, P. M. (2019) Circulating Cell-Free DNA in Physical Activities. *Methods Mol Biol* **1909**, 183-197
43. Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., and Hjelm, N. M. (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* **64**, 218-224
44. Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S. A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Diaz, L. A., Jr. (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* **14**, 985-990
45. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., and Yaros, M. J. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* **37**, 646-650
46. Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., and Beljanski, M. (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* **46**, 318-322
47. Sorenson, G. D., Pribish, D. M., Valone, F. H., Memoli, V. A., Bzik, D. J., and Yao, S. L. (1994) Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **3**, 67-71
48. Underhill, H. R., Kitzman, J. O., Hellwig, S., Welker, N. C., Daza, R., Baker, D. N., Gligorich, K. M., Rostomily, R. C., Bronner, M. P., and Shendure, J. (2016) Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet* **12**, e1006162
49. Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R. J., Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B. R., Wang, H., Luber, B., Alani, R. M., Antonarakis, E. S., Azad, N. S., Bardelli, A., Brem, H., Cameron, J. L., Lee, C. C., Fecher, L. A., Gallia, G. L., Gibbs, P., Le, D., Giuntoli, R. L., Goggins, M., Hogarty, M. D., Holdhoff, M., Hong, S. M., Jiao, Y., Juhl, H. H., Kim, J. J., Siravegna, G., Laheru, D. A., Lauricella, C., Lim, M., Lipson, E. J., Marie, S. K., Netto, G. J., Oliner, K. S., Olivi, A., Olsson, L., Riggins, G.

- J., Sartore-Bianchi, A., Schmidt, K., Shih I, M., Oba-Shinjo, S. M., Siena, S., Theodorescu, D., Tie, J., Harkins, T. T., Veronese, S., Wang, T. L., Weingart, J. D., Wolfgang, C. L., Wood, L. D., Xing, D., Hruban, R. H., Wu, J., Allen, P. J., Schmidt, C. M., Choti, M. A., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., and Diaz, L. A., Jr. (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* **6**, 224ra224
50. Thierry, A. R., Mouliere, F., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F., Gillet, B., Gongora, C., Dechelotte, P., Robert, B., Del Rio, M., Lamy, P. J., Bibeau, F., Nouaille, M., Lorient, V., Jarrousse, A. S., Molina, F., MATHONNET, M., Pezet, D., and Ychou, M. (2014) Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* **20**, 430-435
51. Leighl, N. B., Page, R. D., Raymond, V. M., Daniel, D. B., Divers, S. G., Reckamp, K. L., Villalona-Calero, M. A., Dix, D., Odegaard, J. I., Lanman, R. B., and Papadimitrakopoulou, V. A. (2019) Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **25**, 4691-4700
52. Li, G., Pavlick, D., Chung, J. H., Bauer, T., Tan, B. A., Peguero, J., Ward, P., Kallab, A., Bufill, J., Hoffman, A., Sadiq, A., Edenfield, J., He, J., Cooke, M., Hughes, J., Forcier, B., Nahas, M., Stephens, P., Ali, S. M., Schrock, A. B., Ross, J. S., Miller, V. A., and Gregg, J. P. (2019) Genomic profiling of cell-free circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer and its fidelity to the genomics of the tumor biopsy. *J Gastrointest Oncol* **10**, 831-840
53. Wan, J. C. M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., 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
54. Kinde, I., Wu, J., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2011) Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9530-9535

55. Forshew, T., Murtaza, M., Parkinson, C., Gale, D., Tsui, D. W., Kaper, F., Dawson, S. J., Piskorz, A. M., Jimenez-Linan, M., Bentley, D., Hadfield, J., May, A. P., Caldas, C., Brenton, J. D., and Rosenfeld, N. (2012) Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* **4**, 136ra168
56. Newman, A. M., Bratman, S. V., To, J., Wynne, J. F., Eclov, N. C., Modlin, L. A., Liu, C. L., Neal, J. W., Wakelee, H. A., Merritt, R. E., Shrager, J. B., Loo, B. W., Jr., Alizadeh, A. A., and Diehn, M. (2014) An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* **20**, 548-554
57. Lanman, R. B., Mortimer, S. A., Zill, O. A., Sebisano, D., Lopez, R., Blau, S., Collisson, E. A., Divers, S. G., Hoon, D. S., Kopetz, E. S., Lee, J., Nikolinakos, P. G., Baca, A. M., Kermani, B. G., Eltoukhy, H., and Talasz, A. (2015) Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *PLoS One* **10**, e0140712
58. Gu, J., Brinza, D., Mongan, A., Chien, R., Dhingra, D., Hyland, F., and Bramlett, K. (2016) Abstract 3622: Complete workflow for detection of low frequency somatic mutations from cell-free DNA using Ion Torrent™ platforms. *Cancer Research* **76**, 3622-3622
59. Shiroguchi, K., Jia, T. Z., Sims, P. A., and Xie, X. S. (2012) Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1347-1352
60. Kukita, Y., Matoba, R., Uchida, J., Hamakawa, T., Doki, Y., Imamura, F., and Kato, K. (2015) High-fidelity target sequencing of individual molecules identified using barcode sequences: de novo detection and absolute quantitation of mutations in plasma cell-free DNA from cancer patients. *DNA Res* **22**, 269-277
61. Kukita, Y., Ohkawa, K., Takada, R., Uehara, H., Katayama, K., and Kato, K. (2018) Selective identification of somatic mutations in pancreatic cancer cells through a combination of next-generation sequencing of plasma DNA using molecular barcodes and a bioinformatic variant filter. *PLoS One* **13**, e0192611

62. Razavi, P., Li, B. T., Brown, D. N., Jung, B., Hubbell, E., Shen, R., Abida, W., Juluru, K., De Bruijn, I., Hou, C., Venn, O., Lim, R., Anand, A., Maddala, T., Gnerre, S., Vijaya Satya, R., Liu, Q., Shen, L., Eattock, N., Yue, J., Blocker, A. W., Lee, M., Sehnert, A., Xu, H., Hall, M. P., Santiago-Zayas, A., Novotny, W. F., Isbell, J. M., Rusch, V. W., Plitas, G., Heerdt, A. S., Ladanyi, M., Hyman, D. M., Jones, D. R., Morrow, M., Riely, G. J., Scher, H. I., Rudin, C. M., Robson, M. E., Diaz, L. A., Jr., Solit, D. B., Aravanis, A. M., and Reis-Filho, J. S. (2019) High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med* **25**, 1928-1937
63. Le Calvez-Kelm, F., Foll, M., Wozniak, M. B., Delhomme, T. M., Durand, G., Chopard, P., Pertesi, M., Fabianova, E., Adamcakova, Z., Holcatova, I., Foretova, L., Janout, V., Vallee, M. P., Rinaldi, S., Brennan, P., McKay, J. D., Byrnes, G. B., and Scelo, G. (2016) KRAS mutations in blood circulating cell-free DNA: a pancreatic cancer case-control. *Oncotarget* **7**, 78827-78840
64. 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
65. FoundationOne Liquid CDx 製品紹介ページ URL.
<https://www.foundationmedicine.com/test/foundationone-liquid-cdx>
66. Guardant360 CDx 製品紹介ページ URL.
<https://guardant360cdx.com/>
67. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構. コバス EGFR 変異検出キット v2.0 添付文書 URL.
http://www.infopmd.go.jp/tgo/pack/22800EZX00011000_A_00011001_00011008/
68. Garcia-Murillas, I., Schiavon, G., Weigelt, B., Ng, C., Hrebien, S., Cutts, R. J., Cheang, M., Osin, P., Nerurkar, A., Kozarewa, I., Garrido, J. A., Dowsett, M., Reis-Filho, J. S., Smith, I. E., and

- Turner, N. C. (2015) Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* **7**, 302ra133
69. Chaudhuri, A. A., Chabon, J. J., Lovejoy, A. F., Newman, A. M., Stehr, H., Azad, T. D., Khodadoust, M. S., Esfahani, M. S., Liu, C. L., Zhou, L., Scherer, F., Kurtz, D. M., Say, C., Carter, J. N., Merriott, D. J., Dudley, J. C., Binkley, M. S., Modlin, L., Padda, S. K., Gensheimer, M. F., West, R. B., Shrager, J. B., Neal, J. W., Wakelee, H. A., Loo, B. W., Jr., Alizadeh, A. A., and Diehn, M. (2017) Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discov* **7**, 1394-1403
70. Olsson, E., Winter, C., George, A., Chen, Y., Howlin, J., Tang, M. H., Dahlgren, M., Schulz, R., Grabau, D., van Westen, D., Ferno, M., Ingvar, C., Rose, C., Bendahl, P. O., Ryden, L., Borg, A., Gruvberger-Saal, S. K., Jernstrom, H., and Saal, L. H. (2015) Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med* **7**, 1034-1047
71. Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I., Silliman, N., Tacey, M., Wong, H. L., Christie, M., Kosmider, S., Skinner, I., Wong, R., Steel, M., Tran, B., Desai, J., Jones, I., Haydon, A., Hayes, T., Price, T. J., Strausberg, R. L., Diaz, L. A., Jr., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Gibbs, P. (2016) Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* **8**, 346ra392
72. Tie, J., Cohen, J. D., Wang, Y., Christie, M., Simons, K., Lee, M., Wong, R., Kosmider, S., Ananda, S., McKendrick, J., Lee, B., Cho, J. H., Faragher, I., Jones, I. T., Ptak, J., Schaeffer, M. J., Silliman, N., Dobbyn, L., Li, L., Tomasetti, C., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Gibbs, P. (2019) Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol*
73. Tie, J., Kinde, I., Wang, Y., Wong, H. L., Roebert, J., Christie, M., Tacey, M., Wong, R., Singh, M., Karapetis, C. S., Desai, J., Tran, B., Strausberg, R. L., Diaz, L. A., Jr., Papadopoulos, N.,

- Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Gibbs, P. (2015) Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* **26**, 1715-1722
74. Osumi, H., Shinozaki, E., Yamaguchi, K., and Zembutsu, H. (2019) Early change in circulating tumor DNA as a potential predictor of response to chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Sci Rep* **9**, 17358
75. Parkinson, C. A., Gale, D., Piskorz, A. M., Biggs, H., Hodgkin, C., Addley, H., Freeman, S., Moyle, P., Sala, E., Sayal, K., Hosking, K., Gounaris, I., Jimenez-Linan, M., Earl, H. M., Qian, W., Rosenfeld, N., and Brenton, J. D. (2016) Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. *PLoS Med* **13**, e1002198
76. Hrebien, S., Citi, V., Garcia-Murillas, I., Cutts, R., Fenwick, K., Kozarewa, I., McEwen, R., Ratnayake, J., Maudsley, R., Carr, T. H., de Bruin, E. C., Schiavon, G., Oliveira, M., and Turner, N. (2019) Early ctDNA dynamics as a surrogate for progression-free survival in advanced breast cancer in the BEECH trial. *Ann Oncol* **30**, 945-952
77. O'Leary, B., Hrebien, S., Morden, J. P., Beaney, M., Fribbens, C., Huang, X., Liu, Y., Bartlett, C. H., Koehler, M., Cristofanilli, M., Garcia-Murillas, I., Bliss, J. M., and Turner, N. C. (2018) Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nat Commun* **9**, 896
78. Marchetti, A., Palma, J. F., Felicioni, L., De Pas, T. M., Chiari, R., Del Grammastro, M., Filice, G., Ludovini, V., Brandes, A. A., Chella, A., Malorgio, F., Guglielmi, F., De Tursi, M., Santoro, A., Crino, L., and Buttitta, F. (2015) Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients. *J Thorac Oncol* **10**, 1437-1443
79. Mok, T., Wu, Y. L., Lee, J. S., Yu, C. J., Sriuranpong, V., Sandoval-Tan, J., Ladrera, G., Thongprasert, S., Srimuninnimit, V., Liao, M., Zhu, Y., Zhou, C., Fuerte, F., Margono, B., Wen, W., Tsai, J., Truman, M., Klughammer, B., Shames, D. S., and Wu, L. (2015) Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in

- NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clin Cancer Res* **21**, 3196-3203
80. Imamura, F., Uchida, J., Kukita, Y., Kumagai, T., Nishino, K., Inoue, T., Kimura, M., and Kato, K. (2016) Early responses of EGFR circulating tumor DNA to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer treatment. *Oncotarget* **7**, 71782-71789
 81. Phallen, J., Leal, A., Woodward, B. D., Forde, P. M., Naidoo, J., Marrone, K. A., Brahmer, J. R., Fiksel, J., Medina, J. E., Cristiano, S., Palsgrove, D. N., Gocke, C. D., Bruhm, D. C., Keshavarzian, P., Adleff, V., Weihe, E., Anagnostou, V., Scharpf, R. B., Velculescu, V. E., and Husain, H. (2019) Early Noninvasive Detection of Response to Targeted Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* **79**, 1204-1213
 82. Zhou, C., Imamura, F., Cheng, Y., Okamoto, I., Cho, B. C., Lin, M. C., Majem, M., Gautschi, O., Gray, J. E., Boyer, M. J., Chmielecki, J., Hartmaier, R., Bulusu, K., Barrett, J. C., Hodge, R., Saggese, M., McKeown, A., and Ramalingam, S. S. (2019) Early clearance of plasma EGFR mutations as a predictor of response to osimertinib and comparator EGFR-TKIs in the FLAURA trial. *Journal of Clinical Oncology* **37**, 9020-9020
 83. Kato, K., Uchida, J., Kukita, Y., Kumagai, T., Nishino, K., Inoue, T., Kimura, M., and Imamura, F. (2016) Transient appearance of circulating tumor DNA associated with de novo treatment. *Sci Rep* **6**, 38639
 84. Xi, L., Pham, T. H., Payabyab, E. C., Sherry, R. M., Rosenberg, S. A., and Raffeld, M. (2016) Circulating Tumor DNA as an Early Indicator of Response to T-cell Transfer Immunotherapy in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* **22**, 5480-5486
 85. Cabel, L., Riva, F., Servois, V., Livartowski, A., Daniel, C., Rampanou, A., Lantz, O., Romano, E., Milder, M., Buecher, B., Piperno-Neumann, S., Bernard, V., Baulande, S., Bieche, I., Pierga, J. Y., Proudhon, C., and Bidard, F. C. (2017) Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol* **28**, 1996-2001
 86. Iijima, Y., Hirotsu, Y., Amemiya, K., Higashi, S., Miyashita, Y., and Omata, M. (2017) Rapid decrease of circulating tumor DNA predicted the treatment effect of nivolumab in a lung cancer

- patient within only 5 days. *Respir Med Case Rep* **22**, 31-33
87. Iijima, Y., Hirotsu, Y., Amemiya, K., Ooka, Y., Mochizuki, H., Oyama, T., Nakagomi, T., Uchida, Y., Kobayashi, Y., Tsutsui, T., Kakizaki, Y., Goto, T., Miyashita, Y., and Omata, M. (2017) Very early response of circulating tumour-derived DNA in plasma predicts efficacy of nivolumab treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* **86**, 349-357
 88. Goldberg, S. B., Narayan, A., Kole, A. J., Decker, R. H., Teysir, J., Carriero, N. J., Lee, A., Nemati, R., Nath, S. K., Mane, S. M., Deng, Y., Sukumar, N., Zelterman, D., Boffa, D. J., Politi, K., Gettinger, S. N., Wilson, L. D., Herbst, R. S., and Patel, A. A. (2018) Early Assessment of Lung Cancer Immunotherapy Response via Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res* **24**, 1872-1880
 89. Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., Boutselakis, H., Cole, C. G., Creatore, C., Dawson, E., Fish, P., Harsha, B., Hathaway, C., Jupe, S. C., Kok, C. Y., Noble, K., Ponting, L., Ramshaw, C. C., Rye, C. E., Speedy, H. E., Stefancsik, R., Thompson, S. L., Wang, S., Ward, S., Campbell, P. J., and Forbes, S. A. (2019) COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* **47**, D941-D947
 90. Li, H., and Durbin, R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-1760
 91. Koboldt, D. C., Zhang, Q., Larson, D. E., Shen, D., McLellan, M. D., Lin, L., Miller, C. A., Mardis, E. R., Ding, L., and Wilson, R. K. (2012) VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* **22**, 568-576
 92. Couraud, S., Vaca-Paniagua, F., Villar, S., Oliver, J., Schuster, T., Blanche, H., Girard, N., Tredaniel, J., Guilleminault, L., Gervais, R., Prim, N., Vincent, M., Margery, J., Larive, S., Foucher, P., Duvert, B., Vallee, M., Le Calvez-Kelm, F., McKay, J., Missy, P., Morin, F., Zalcmán, G., Olivier, M., Souquet, P. J., and Bio, C. I.-i. (2014) Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: a proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-

1002. *Clin Cancer Res* **20**, 4613-4624
93. Guo, N., Lou, F., Ma, Y., Li, J., Yang, B., Chen, W., Ye, H., Zhang, J. B., Zhao, M. Y., Wu, W. J., Shi, R., Jones, L., Chen, K. S., Huang, X. F., Chen, S. Y., and Liu, Y. (2016) Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery. *Sci Rep* **6**, 33519
94. Karachaliou, N., Mayo-de las Casas, C., Queralt, C., de Aguirre, I., Melloni, B., Cardenal, F., Garcia-Gomez, R., Massuti, B., Sanchez, J. M., Porta, R., Ponce-Aix, S., Moran, T., Carcereny, E., Felip, E., Bover, I., Insa, A., Reguart, N., Isla, D., Vergnenegre, A., de Marinis, F., Gervais, R., Corre, R., Paz-Ares, L., Morales-Espinosa, D., Viteri, S., Drozdowskyj, A., Jordana-Ariza, N., Ramirez-Serrano, J. L., Molina-Vila, M. A., Rosell, R., and Spanish Lung Cancer, G. (2015) Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA With Survival in the EURTAC Trial. *JAMA Oncol* **1**, 149-157
95. Kawaguchi, T., Koh, Y., Ando, M., Ito, N., Takeo, S., Adachi, H., Tagawa, T., Kakegawa, S., Yamashita, M., Kataoka, K., Ichinose, Y., Takeuchi, Y., Serizawa, M., Tamiya, A., Shimizu, S., Yoshimoto, N., Kubo, A., Isa, S., Saka, H., and Matsumura, A. (2016) Prospective Analysis of Oncogenic Driver Mutations and Environmental Factors: Japan Molecular Epidemiology for Lung Cancer Study. *J Clin Oncol* **34**, 2247-2257
96. Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Ready, N. E., Chow, L. Q., Vokes, E. E., Felip, E., Holgado, E., Barlesi, F., Kohlhaufl, M., Arrieta, O., Burgio, M. A., Fayette, J., Lena, H., Poddubskaya, E., Gerber, D. E., Gettinger, S. N., Rudin, C. M., Rizvi, N., Crino, L., Blumenschein, G. R., Jr., Antonia, S. J., Dorange, C., Harbison, C. T., Graf Finckenstein, F., and Brahmer, J. R. (2015) Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **373**, 1627-1639
97. Lutgens, E., and Seijkens, T. T. P. (2020) Cancer patients receiving immune checkpoint inhibitor therapy are at an increased risk for atherosclerotic cardiovascular disease. *J Immunother Cancer* **8**
98. Lipson, E. J., Velculescu, V. E., Pritchard, T. S., Sausen, M., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., and Diaz, L. A., Jr. (2014)

- Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. *J Immunother Cancer* **2**, 42
99. Ashida, A., Sakaizawa, K., Uhara, H., and Okuyama, R. (2017) Circulating Tumour DNA for Monitoring Treatment Response to Anti-PD-1 Immunotherapy in Melanoma Patients. *Acta Derm Venereol* **97**, 1212-1218
100. Lee, J. H., Long, G. V., Boyd, S., Lo, S., Menzies, A. M., Tembe, V., Guminski, A., Jakrot, V., Scolyer, R. A., Mann, G. J., Kefford, R. F., Carlino, M. S., and Rizos, H. (2017) Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol* **28**, 1130-1136