

2019年3月9日 がんゲノム医療 Young Summit

# リキッドバイオプシーの現在と未来

**中村能章**

国立がん研究センター東病院 消化管内科



# Agenda

- **リキッドバイオプシー総論**
- **Circulating tumor DNA (ctDNA) とCell-free DNA (cfDNA)**
- **ctDNA解析の臨床的有用性**
- **リキッドバイオプシーの未来**

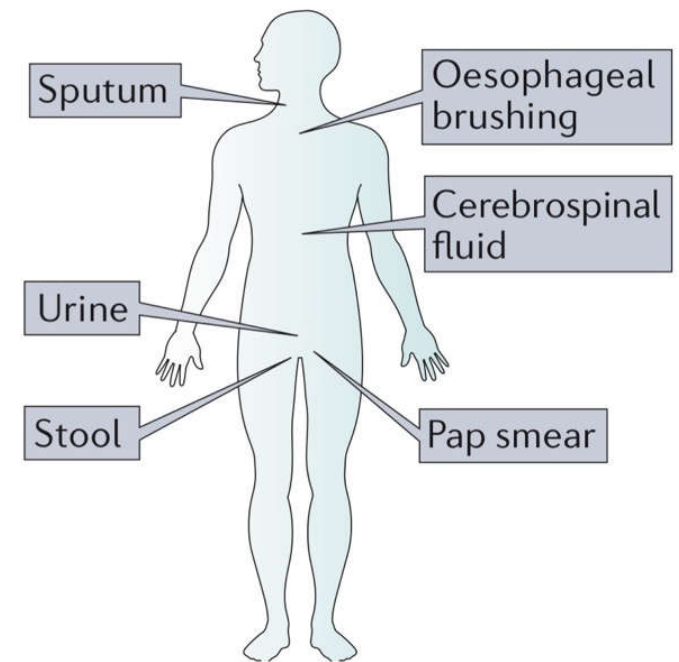
# Agenda

- **リキッドバイオプシー総論**
- **Circulating tumor DNA (ctDNA) とCell-free DNA (cfDNA)**
- **ctDNA解析の臨床的有用性**
- **リキッドバイオプシーの未来**

# What is Liquid Biopsy?

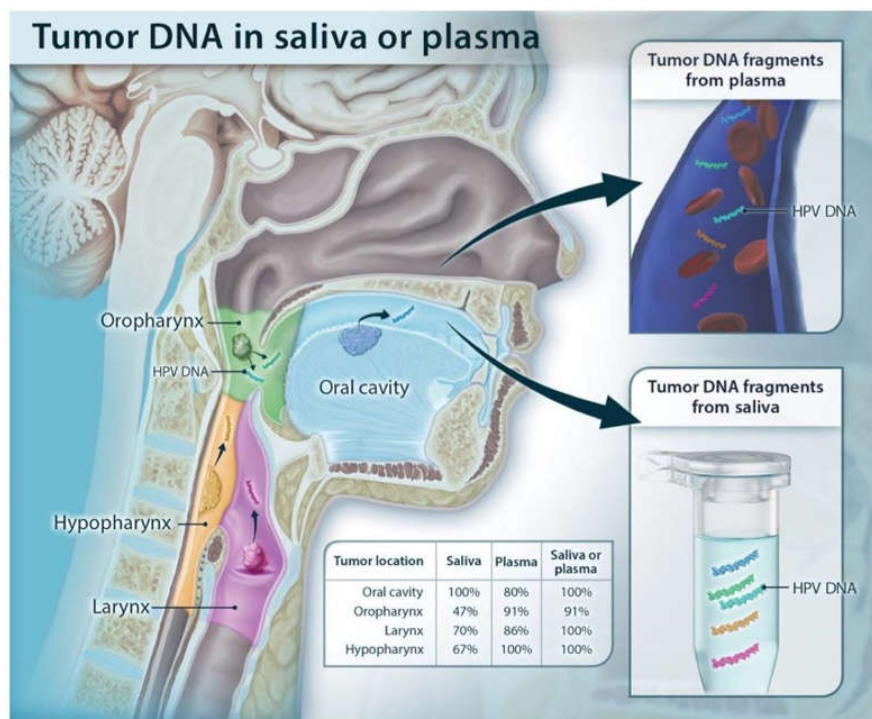
- Analysis of tumor material (for example, cells or nucleic acids) obtained in a minimally invasive or noninvasive manner through the sampling of blood or other body fluids.

低侵襲又は非侵襲的に血液や体液を採取して得た腫瘍検体（例：細胞、核酸）の解析



# Liquid Biopsy of Materials Other Than Blood

## 唾液中のHPV-DNA測定<sup>1</sup>

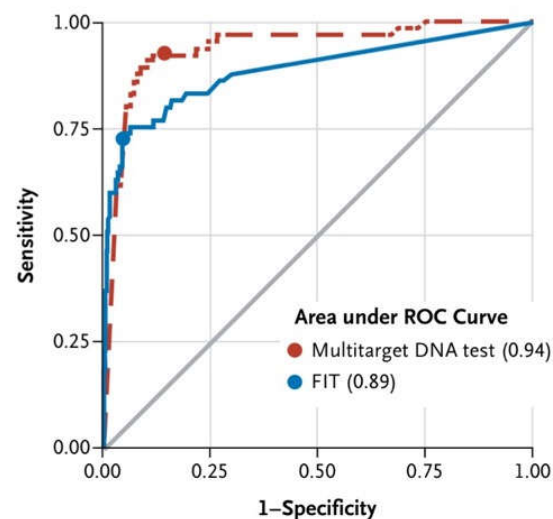


## 便のDNA検査（大腸がん早期発見）<sup>2</sup>



### Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening

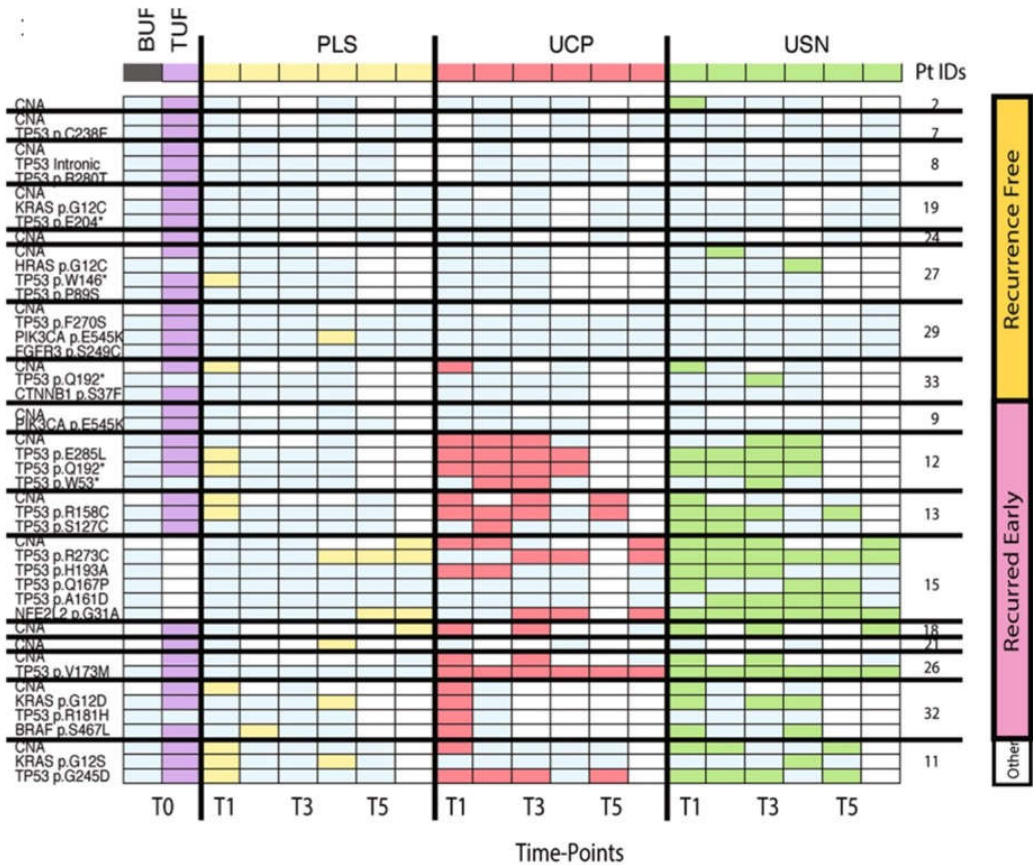
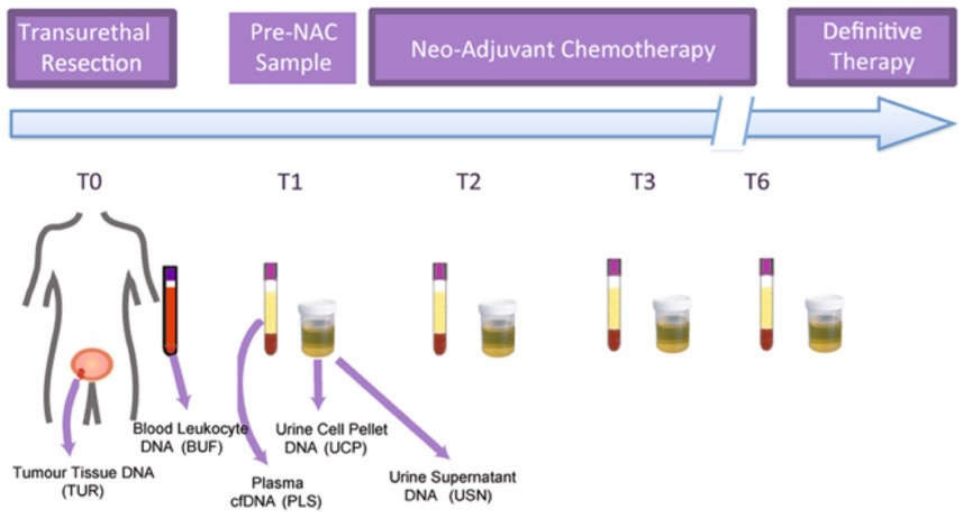
Thomas F. Imperiale, M.D., David F. Ransohoff, M.D., Steven H. Itzkowitz, M.D., Theodore R. Levin, M.D., Philip Lavin, Ph.D., Graham P. Lidgard, Ph.D., David A. Ahlquist, M.D., and Barry M. Berger, M.D.



1. Wang Y, et al. *Sci Transl Med*. 2015.
2. Imperiale TF, et al. *N Engl J Med*. 2014.

# Liquid Biopsy of Materials Other Than Blood

## 尿中ctDNA解析



# Liquid Biopsy of Materials Other Than Blood

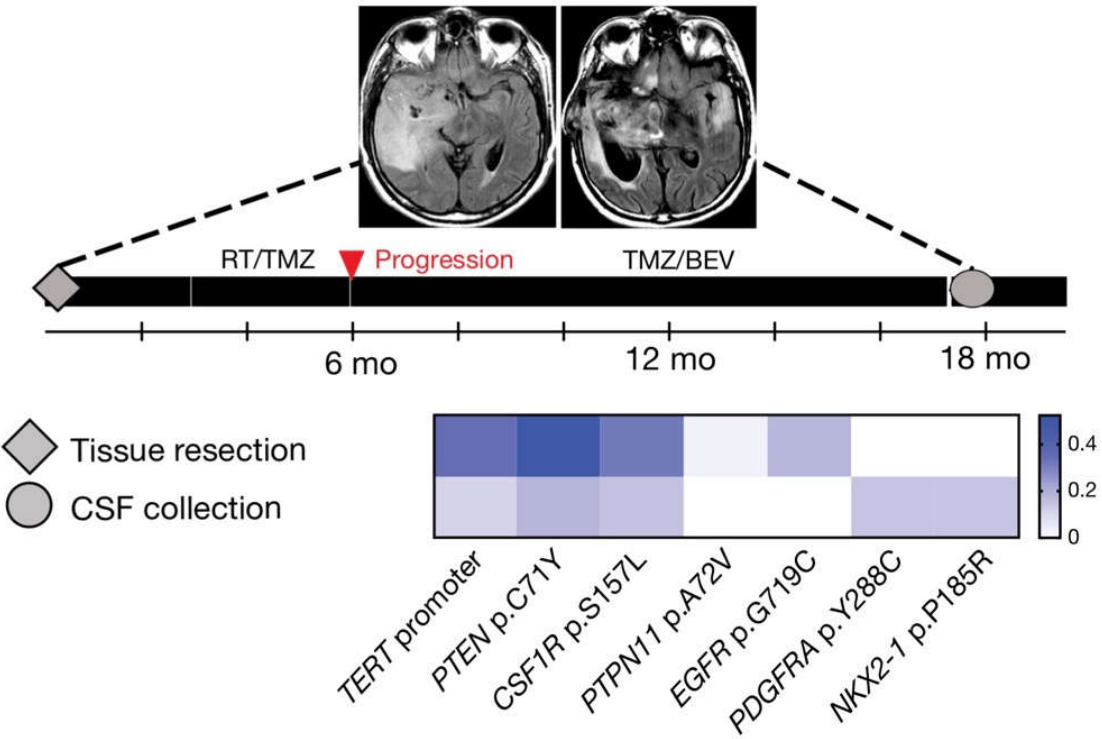
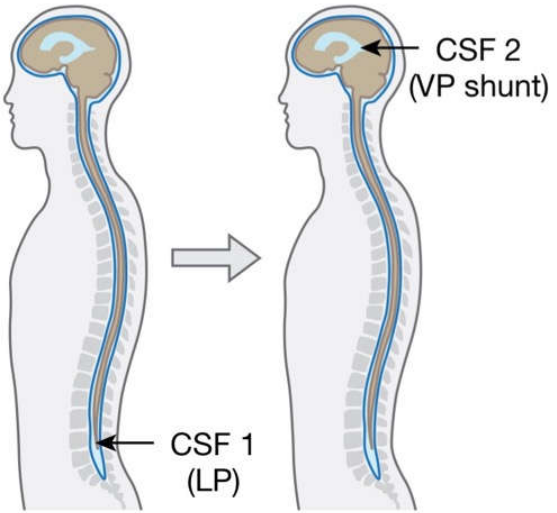
## 脑脊髓液ctDNA解析

### LETTER

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-0882-3>

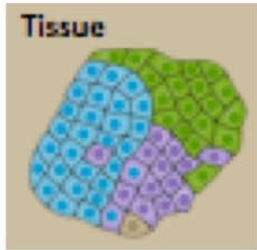
### Tracking tumour evolution in glioma through liquid biopsies of cerebrospinal fluid

Alexandra M. Miller<sup>1,13</sup>, Ronak H. Shah<sup>2,3,12,13</sup>, Elena I. Pentsova<sup>1,13</sup>, Maryam Pourmaleki<sup>4</sup>, Samuel Briggs<sup>1</sup>, Natalie Distefano<sup>5</sup>, Youyun Zheng<sup>2,3</sup>, Anna Skakodub<sup>1</sup>, Smrutiben A. Mehta<sup>4</sup>, Carl Campos<sup>4</sup>, Wan-Ying Hsieh<sup>4</sup>, S. Duygu Selcuklu<sup>1</sup>, Lilan Ling<sup>4</sup>, Fanli Meng<sup>1</sup>, Xiaohong Jing<sup>3</sup>, Aliaksandra Samoila<sup>6</sup>, Tejus A. Bale<sup>2</sup>, Dana W. Y. Tsui<sup>2,3</sup>, Christian Grommes<sup>1</sup>, Agnes Viale<sup>3</sup>, Mark M. Souweidane<sup>2,7</sup>, Viviane Tabar<sup>2</sup>, Cameron W. Brennan<sup>2</sup>, Anne S. Reiner<sup>2</sup>, Marc Rosenblum<sup>2</sup>, Katherine S. Panageas<sup>8</sup>, Lisa M. DeAngelis<sup>1</sup>, Robert J. Young<sup>9</sup>, Michael F. Berger<sup>2,3,4,10\*</sup> & Ingo K. Mellinghoff<sup>1,4,11\*</sup>



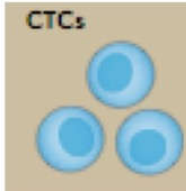
# Materials of Liquid Biopsy

## Tissue biopsy

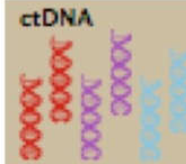


腫瘍組織

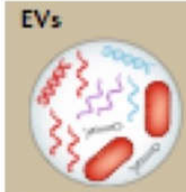
## Liquid biopsy



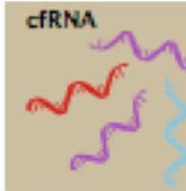
CTCs  
Circulating Tumor Cells  
血中循環腫瘍細胞



ctDNA  
Circulating Tumor DNA  
血中循環腫瘍DNA



EVs  
Extracellular vesicles  
細胞外小胞



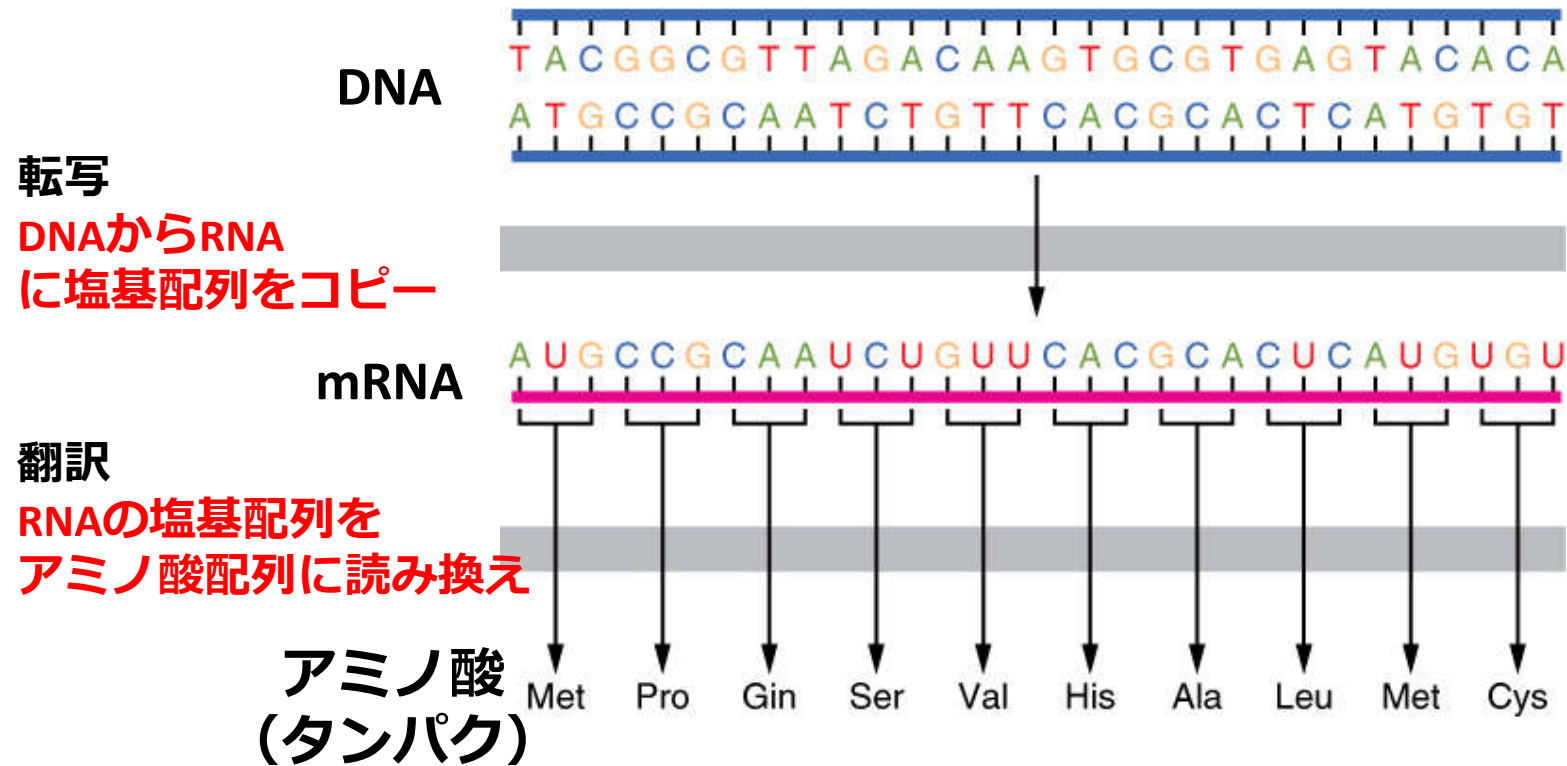
cfrRNA  
Cell-free RNA  
血中循環遊離RNA



miRNA  
マイクロRNA



# セントラルドグマ



ヒト試料の解析は基本的にDNA、RNA、タンパクのいずれかが対象

# Comparison of Analytes

	Tissue	CTCs	ctDNA	EVs	cfRNA	miRNA
DNA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>X</b>	<b>X</b>
RNA	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>X</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
タンパク	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>X</b>	<b>?</b>	<b>X</b>	<b>X</b>

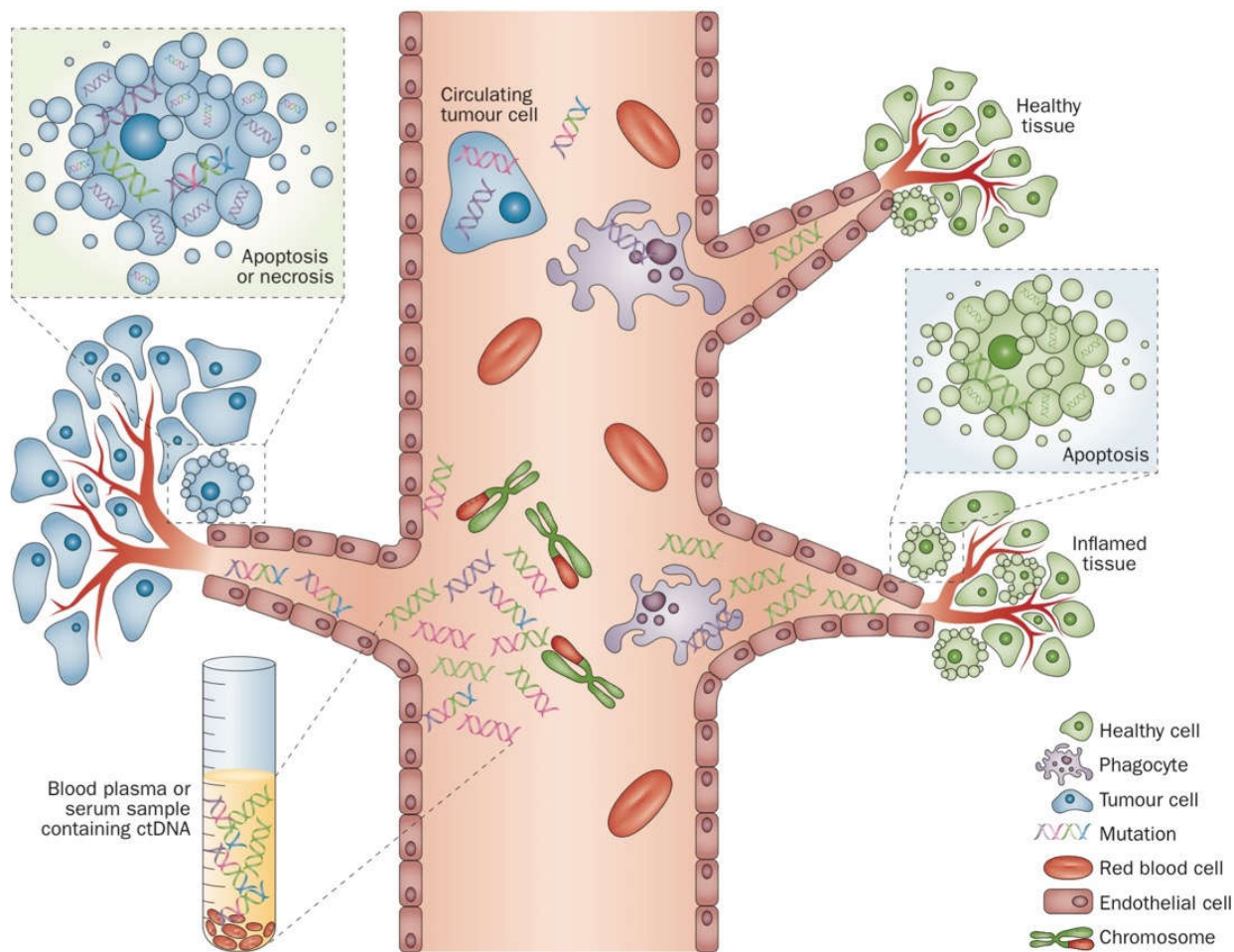
# Agenda

- **リキッドバイオプシー総論**
- **Circulating tumor DNA (ctDNA) とCell-free DNA (cfDNA)**
- **ctDNA解析の臨床的有用性**
- **リキッドバイオプシーの未来**

# Circulating Tumor DNA (ctDNA)

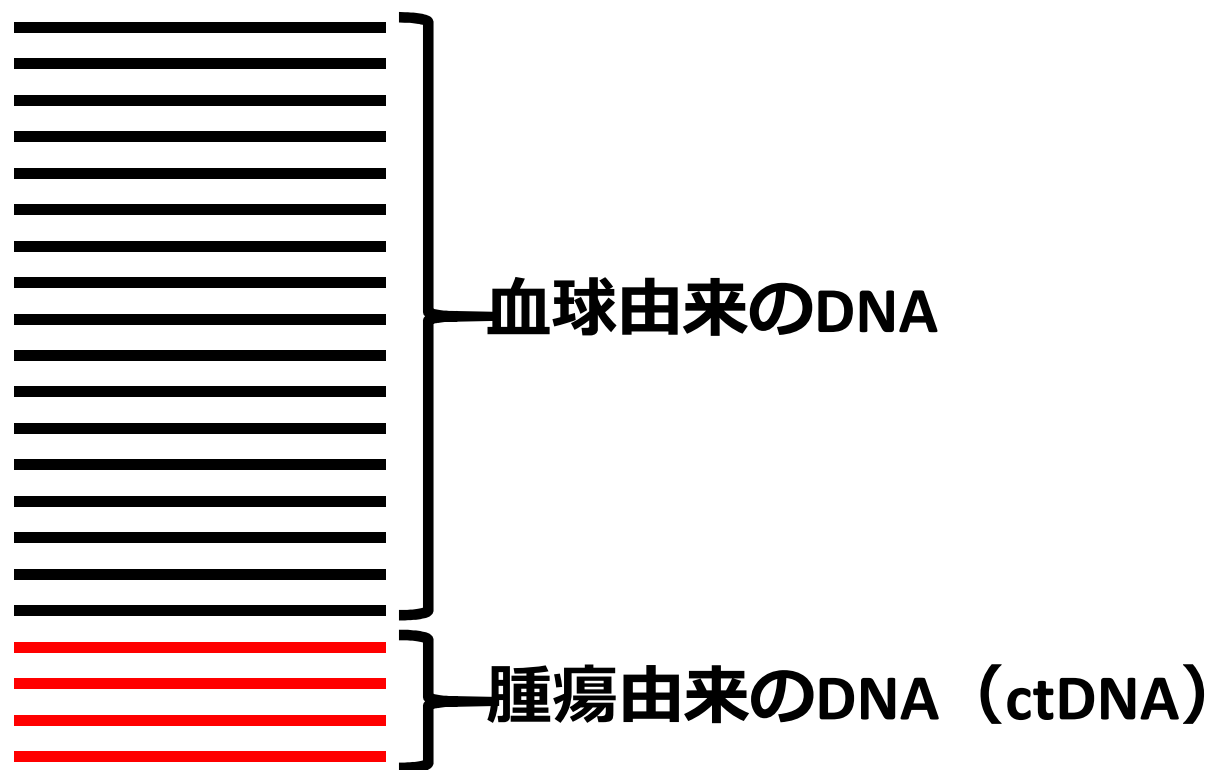
アポトーシスやネクローシス  
を通じて血中に流出した  
腫瘍由来のDNA

血漿又は血清に存在



# ctDNA and cfDNA

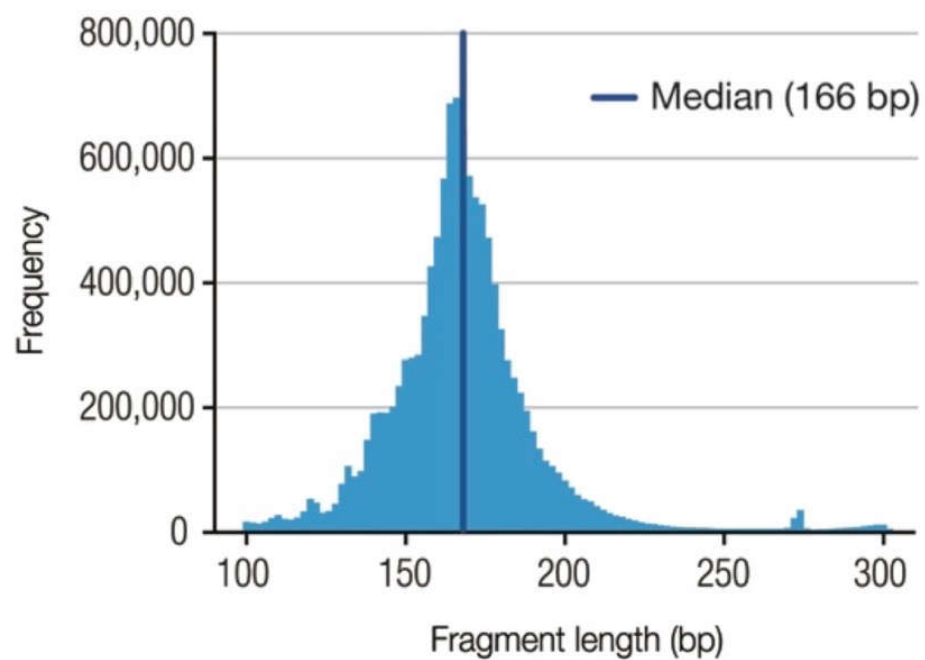
Cell-free DNA (cfDNA) : 血中に遊離しているDNA



# ctDNA/cfDNAの特徴

- 長さ：150～200 bp (base pair: 塩基対)
- 半減期：1時間以下 (腫瘍マーカーは数日～数週)
- 量：10～15 ng / mL
- サンプル：血漿がベター (血清は分離過程で凝固が生じる際に白血球の破砕も起こり、結果として血球由来のDNAが増加する)
- 採血管：EDTA (抗凝固剤) 管が基本  
cfDNA用の Streck tube が最近では用いられることが多い

# Nucleosome-guided Fragmentation Pattern of cfDNA



# cfDNA用採血管

Streck tube

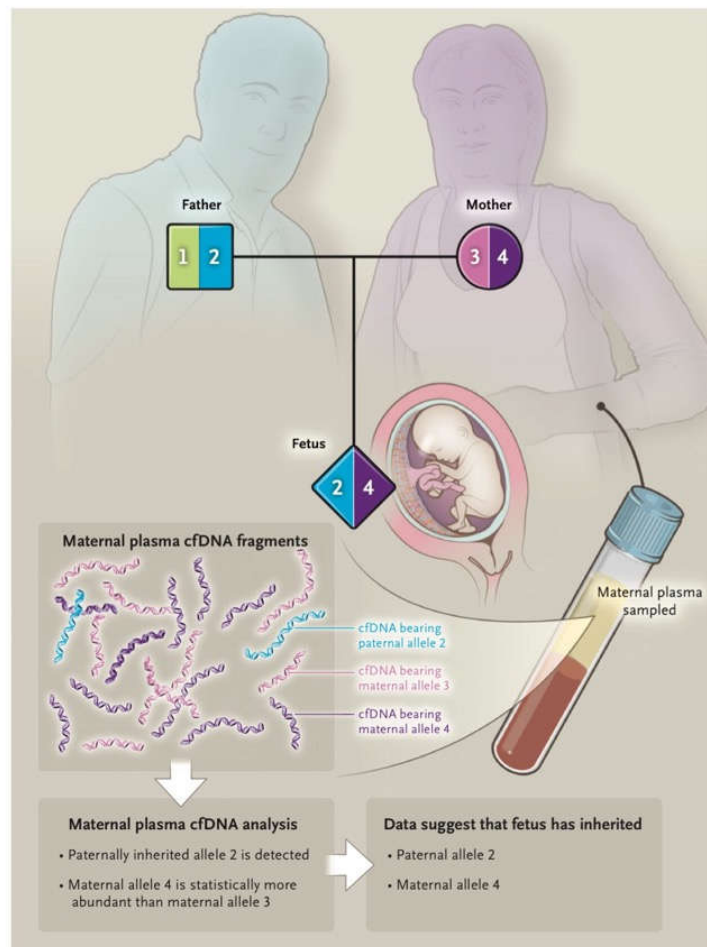


Cell-Free DNA Collection Tube  
(Roche Diagnostics)





# Sequencing of cfDNA during Pregnancy



**Table 2. Conditions for Which Cell-free DNA Testing Is Clinically Available.\***

**Common autosomal aneuploidies**

- Trisomy 21
- Trisomy 18
- Trisomy 13

**Sex chromosome aneuploidies**

- 45,X
- 47,XXX
- 47,XXY
- 47,XYY

**Rare autosomal aneuploidies**

Whole-chromosome aneuploidy of any autosome (trisomy 7, 15, 16, and 22 are the most commonly detected)

**Microdeletion and microduplication syndromes**

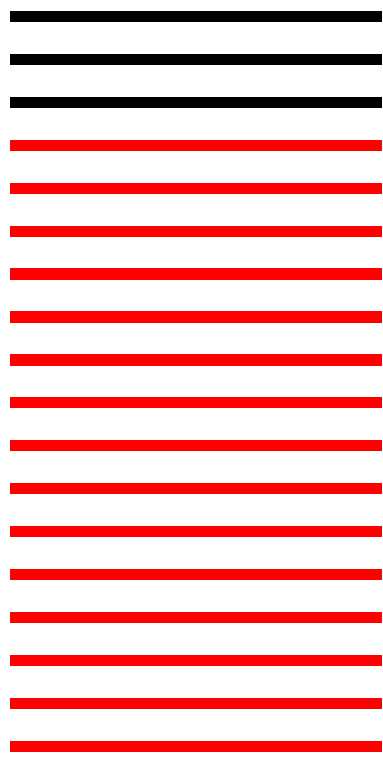
- 1p36 deletion
- Wolf–Hirschhorn syndrome (terminal 4p deletion)
- Cri du chat syndrome (terminal 5p deletion)
- Langer–Giedion syndrome (8q24 deletion)
- Jacobsen’s syndrome (terminal 11q deletion)
- Prader–Willi and Angelman syndromes (15q11.2-q13 deletion)
- DiGeorge syndrome (22q11.2 deletion)

**Copy-number variants larger than 7 Mb**

Triploidy

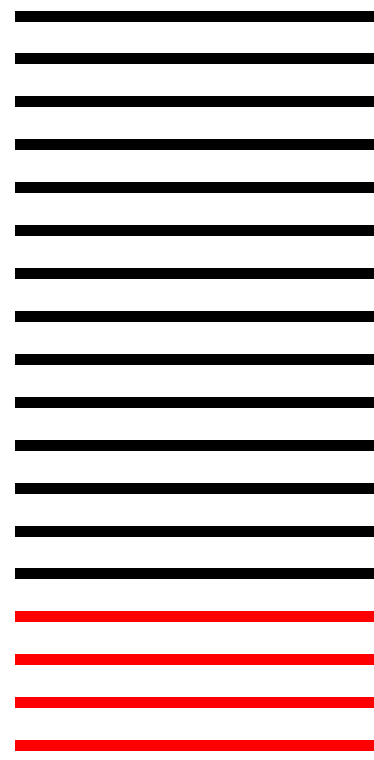
# ctDNA解析

## 腫瘍組織解析



Tumor DNA

## cfDNA解析

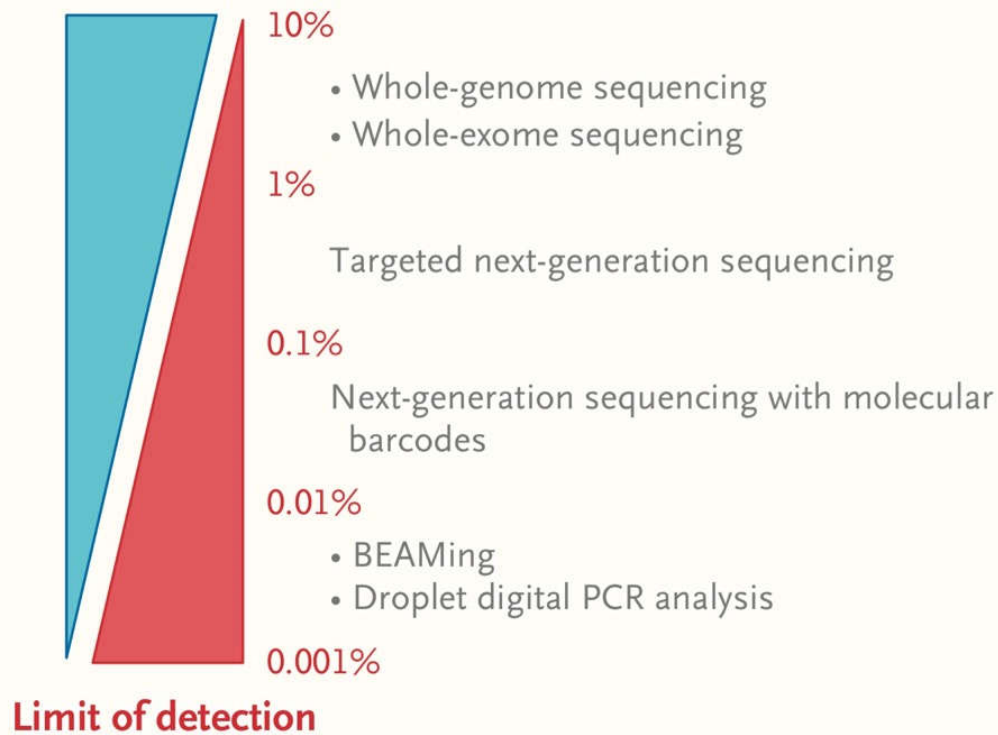


ctDNA

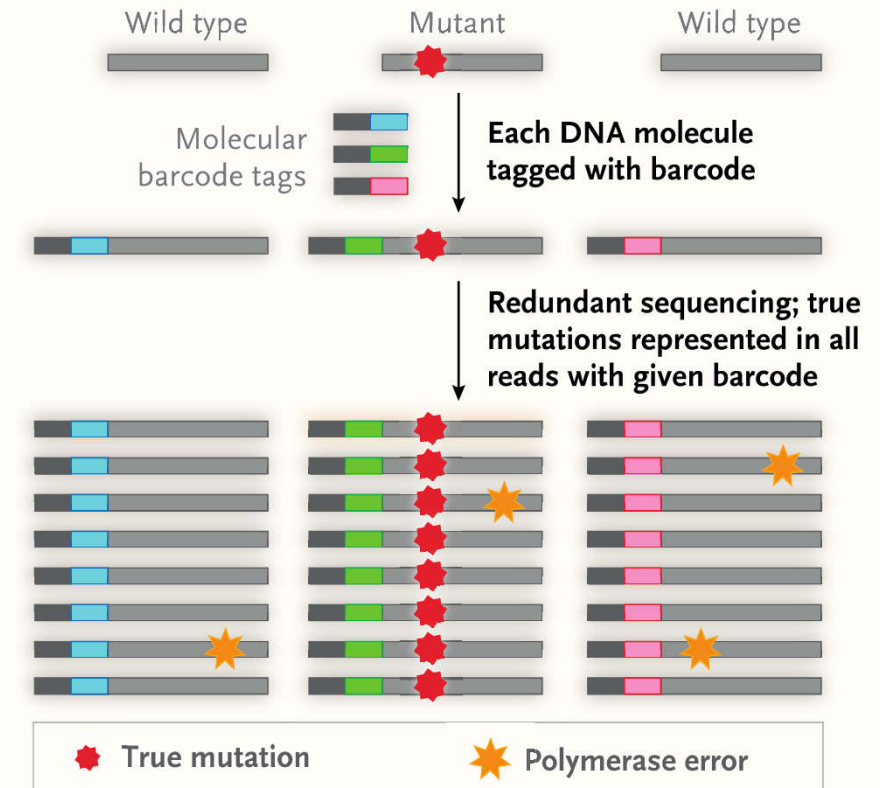
ctDNA解析には検出感度が高い検査が必要！！

# 検査系の検出感度

## Nucleotide coverage



## Next-generation sequencing with molecular barcodes



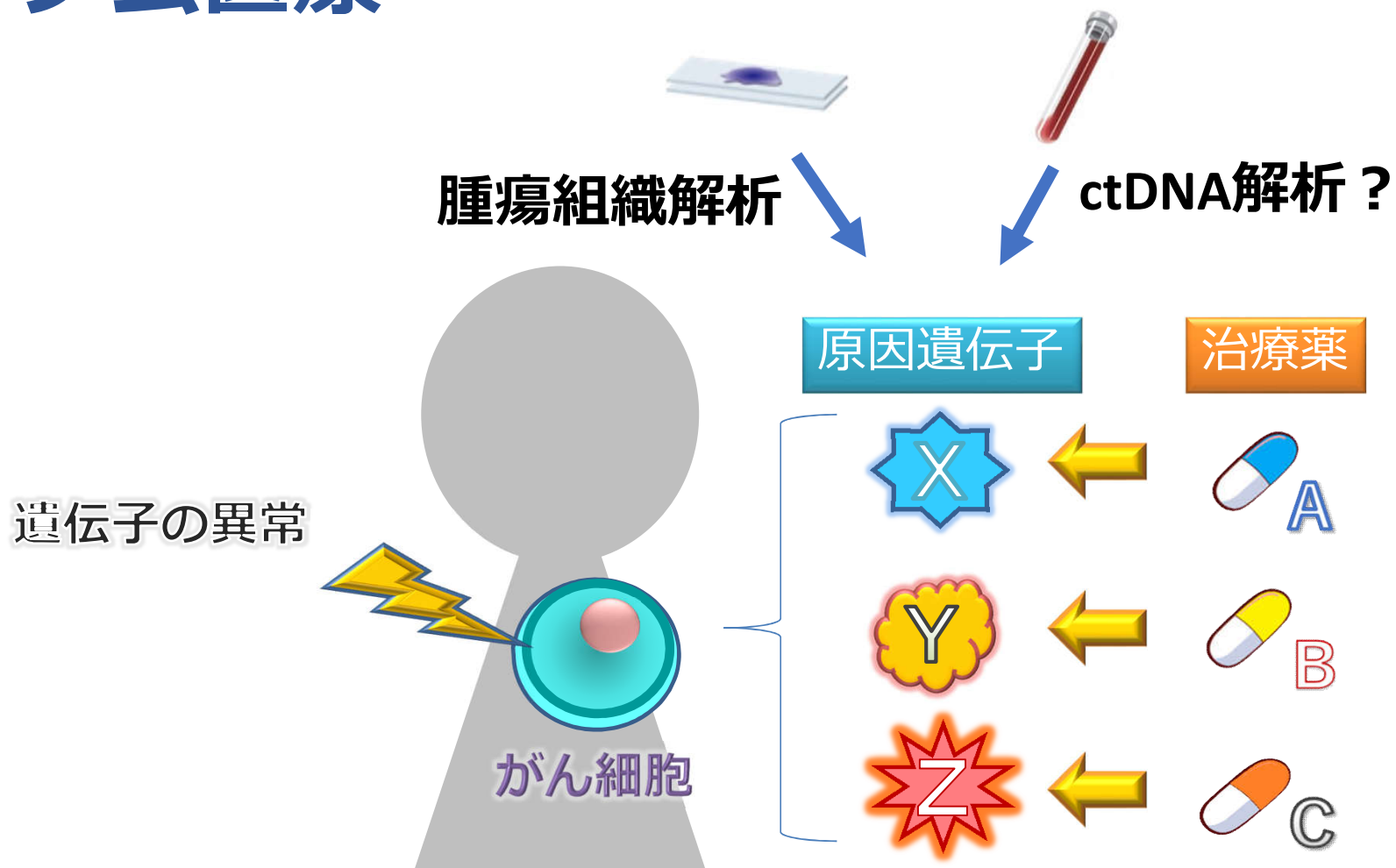
# 代表的なctDNAアッセイ

解析法	アッセイ	対象遺伝子	企業	備考
PCRベース	Cobas EGFR 変異検出キット	EGFR遺伝子変異 (T790M含む)	ロシュ・ダイアグノス ティックス	日本・米国で承認
	OncoBEAM	RAS遺伝子変異	シスメックス	欧州で承認
NGSベース	Guardant360	73遺伝子	Guardant Health	GOZILA試験で使用 FDA迅速審査プログラム
	Foundation Medicine	70遺伝子	FoundationOne Liquid	MONSTAR試験で使用 FDA迅速審査プログラム MSIも測定可能
	PlasmaSELECT-R64	64遺伝子	Personal Genome Diagnostics	FDA迅速審査プログラム MSIも測定可能
	myRisk	35遺伝子	Myriad	生殖細胞系列変異を測定

# Agenda

- **リキッドバイオプシー総論**
- **Circulating tumor DNA (ctDNA) とCell-free DNA (cfDNA)**
- **ctDNA解析の臨床的有用性**
- **リキッドバイオプシーの未来**

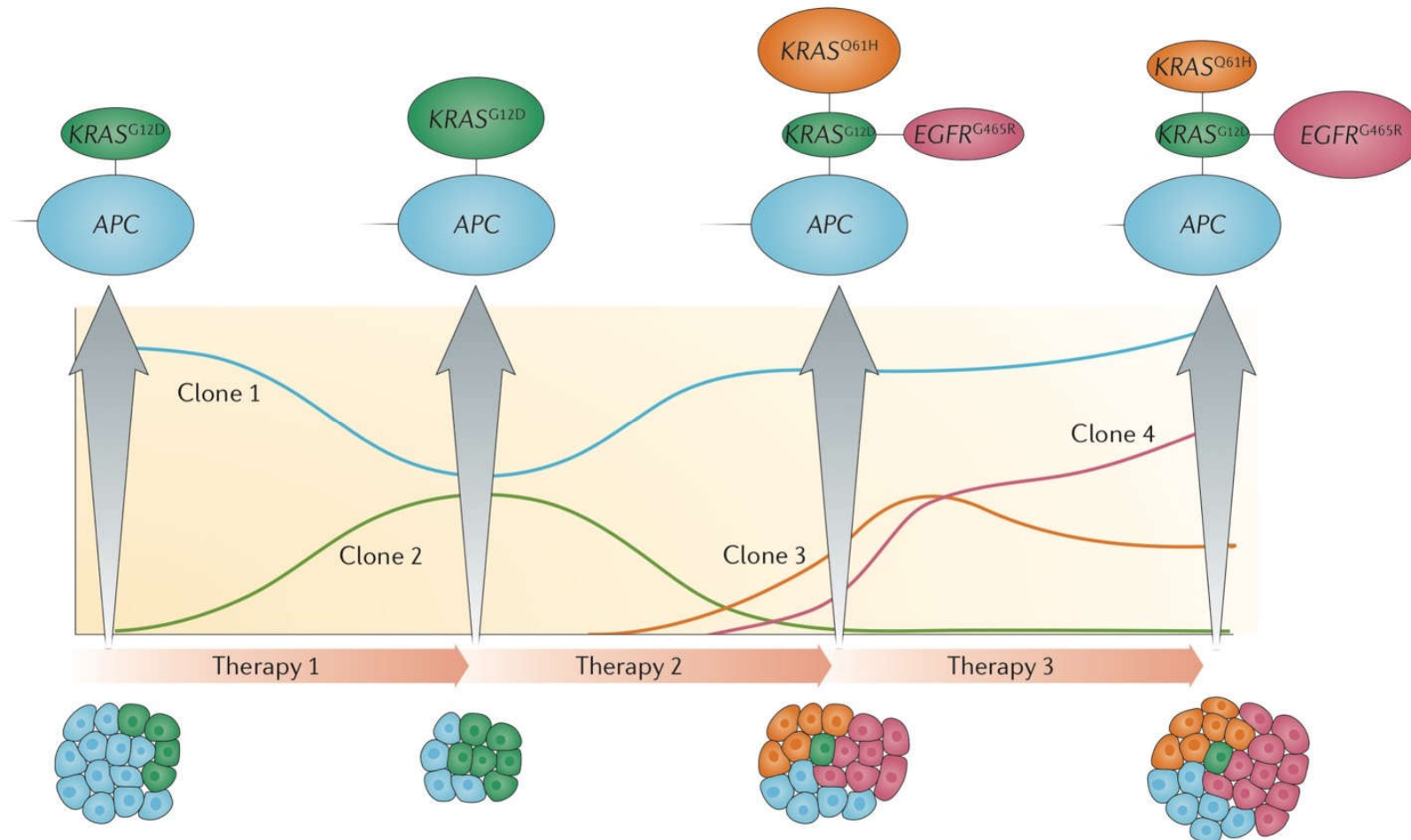
# がんゲノム医療



# ctDNA解析の利点

- 結果の返却が早い（Turn-around-timeが短い）：**素早い治療選択に繋がる**
- 低侵襲・低コスト（？）：**繰り返し測定が可能**
- 腫瘍の全体像を評価できる：**真の標的遺伝子異常を同定できる（？）**

# 繰り返し測定？ | Clonal Evolution

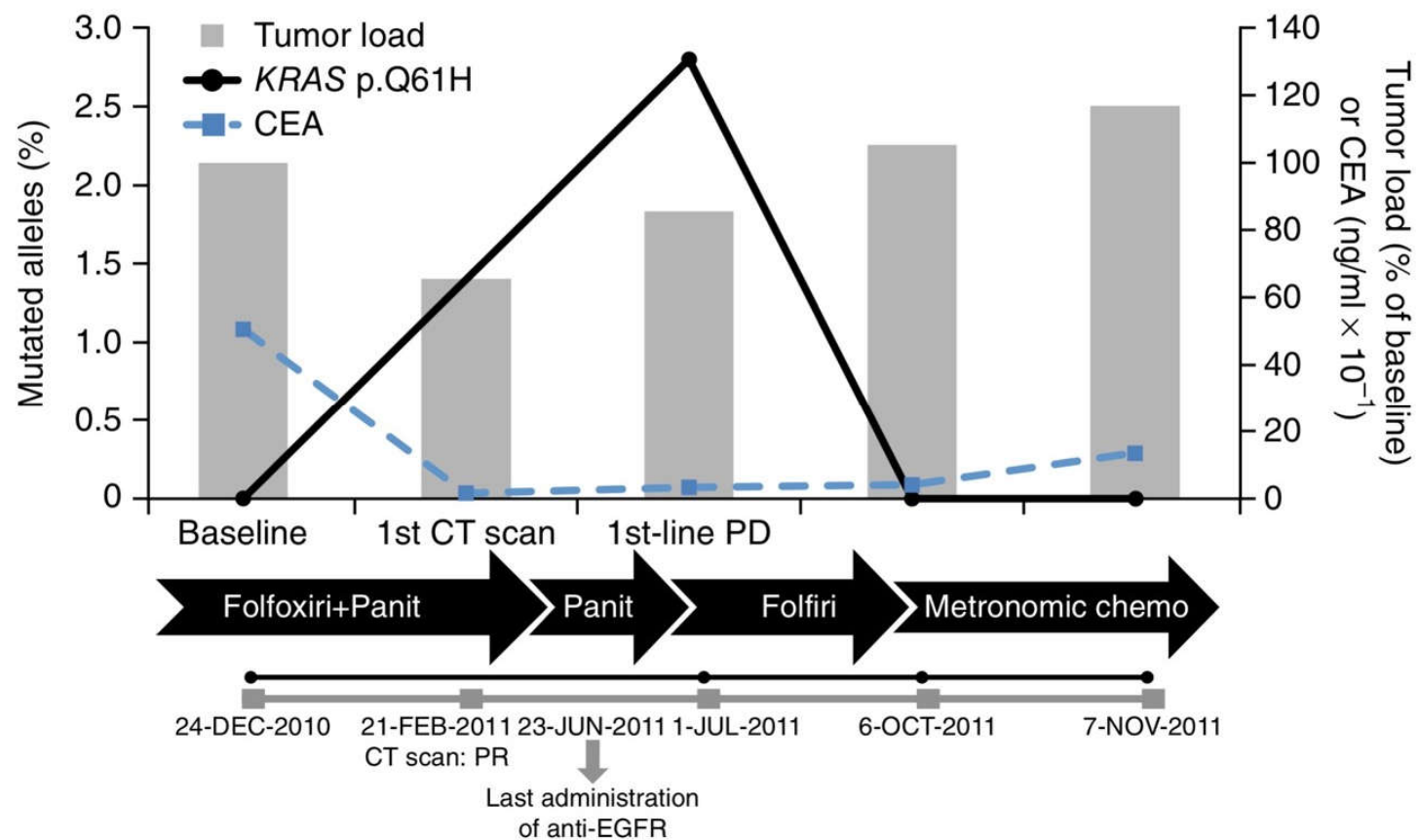




# 代表的なClonal Evolution

がん種	治療	獲得遺伝子異常
肺がん	EGFR-TKI	<i>EGFR</i> T790M変異
乳がん	アロマターゼ阻害薬	<i>ESR1</i> 変異
大腸がん	抗EGFR抗体薬	<i>KRAS</i> 変異 <i>MET</i> 増幅 <i>EGFR</i> ECD変異
NTRK融合遺伝子固形腫瘍	Entrectinib	<i>NTRK1</i> 変異

# 抗EGFR抗体薬中の獲得KRAS変異



# ctDNA解析の利点

- 結果の返却が早い（Turn-around-timeが短い）：**素早い治療選択に繋がる**
- 低侵襲・低コスト（？）：**繰り返し測定が可能**
- 腫瘍の全体像を評価できる：**真の標的遺伝子異常を同定できる（？）**

**ctDNA解析の臨床的有用性を前向きに証明した試験はない！**

# GOZILA Study | 進行消化器がん2000例を対象としたctDNAスクリーニング

## GOZILA Study

Nationwide Genome  
Screening Project

SCRUM-Japan GI-SCREEN



CRC cohort, N = 1,000

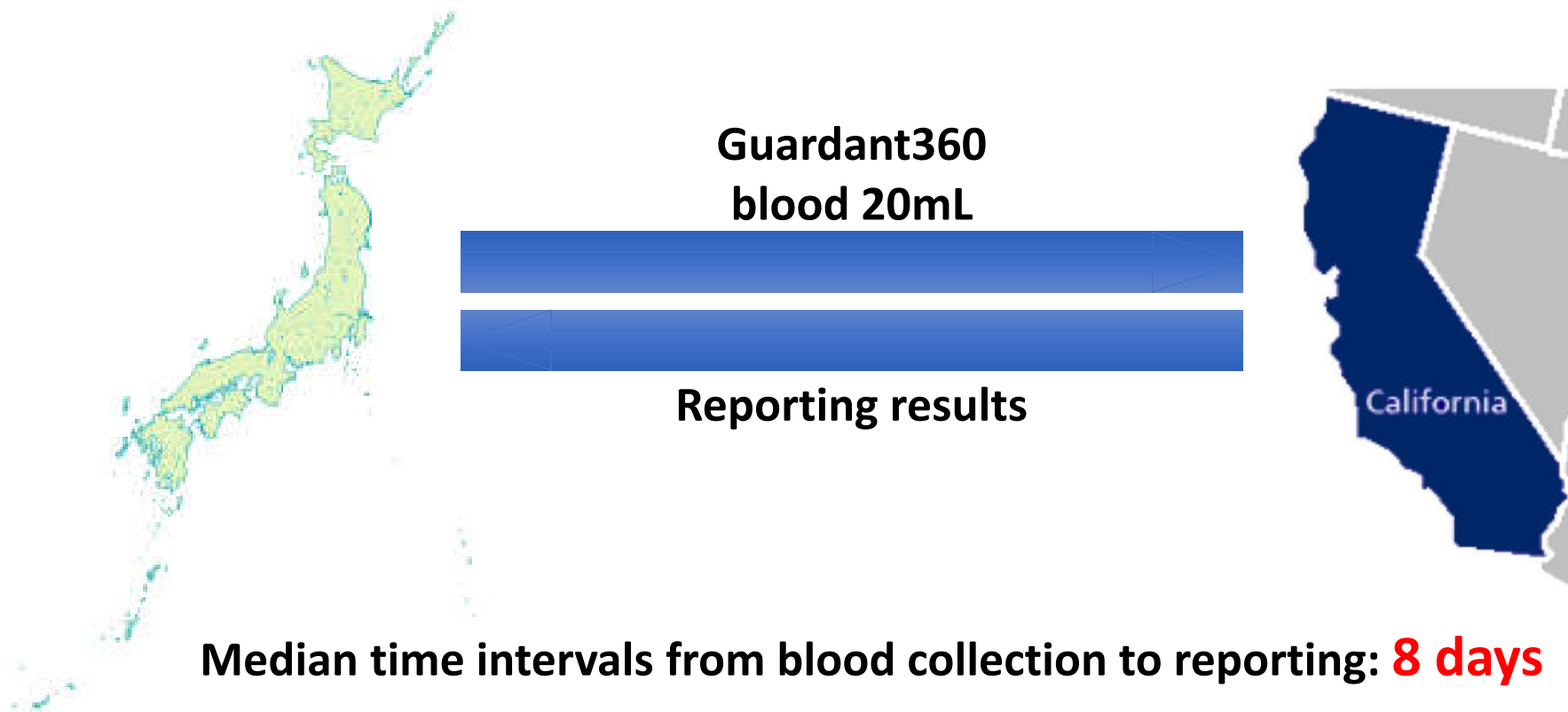
- No history of anti-EGFR, N = 500
- Refractory to anti-EGFR, N = 500

Non-CRC cohort, N = 1,000

- Gastric cancer, N = 300
- Esophageal cancer, N = 150
- Hepatocellular carcinoma, N = 100
- Biliary tract cancer, N = 150
- Pancreatic cancer, N = 100
- Neuroendocrine tumor/carcinoma, N = 50
- GIST, N = 100
- Others, N = 50

ctDNA analysis  
(Guardant360)

# Rapid Turn Around Time



# ctDNA解析の臨床的有用性を検証する試験

## TRIUMPH Study

TRastuzumab combined with pertuzUMab in Patients with HER2 positive mCRC

### 適格規準

- 治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がん
- 組織検査でRAS野生型
- 抗体EGFR抗体薬を含む標準治療に不応・不耐
- **組織検査でHER2陽性**  
かつ/または  
ctDNA解析でHER2増幅かつRAS野生型

Meet  
eligibility  
criteria

Not meet  
eligibility  
criteria

トラスツズマブ  
8 mg/kg followed by 6 mg/kg  
+  
ペルツズマブ  
840 mg followed by 420 mg  
Q3W until PD

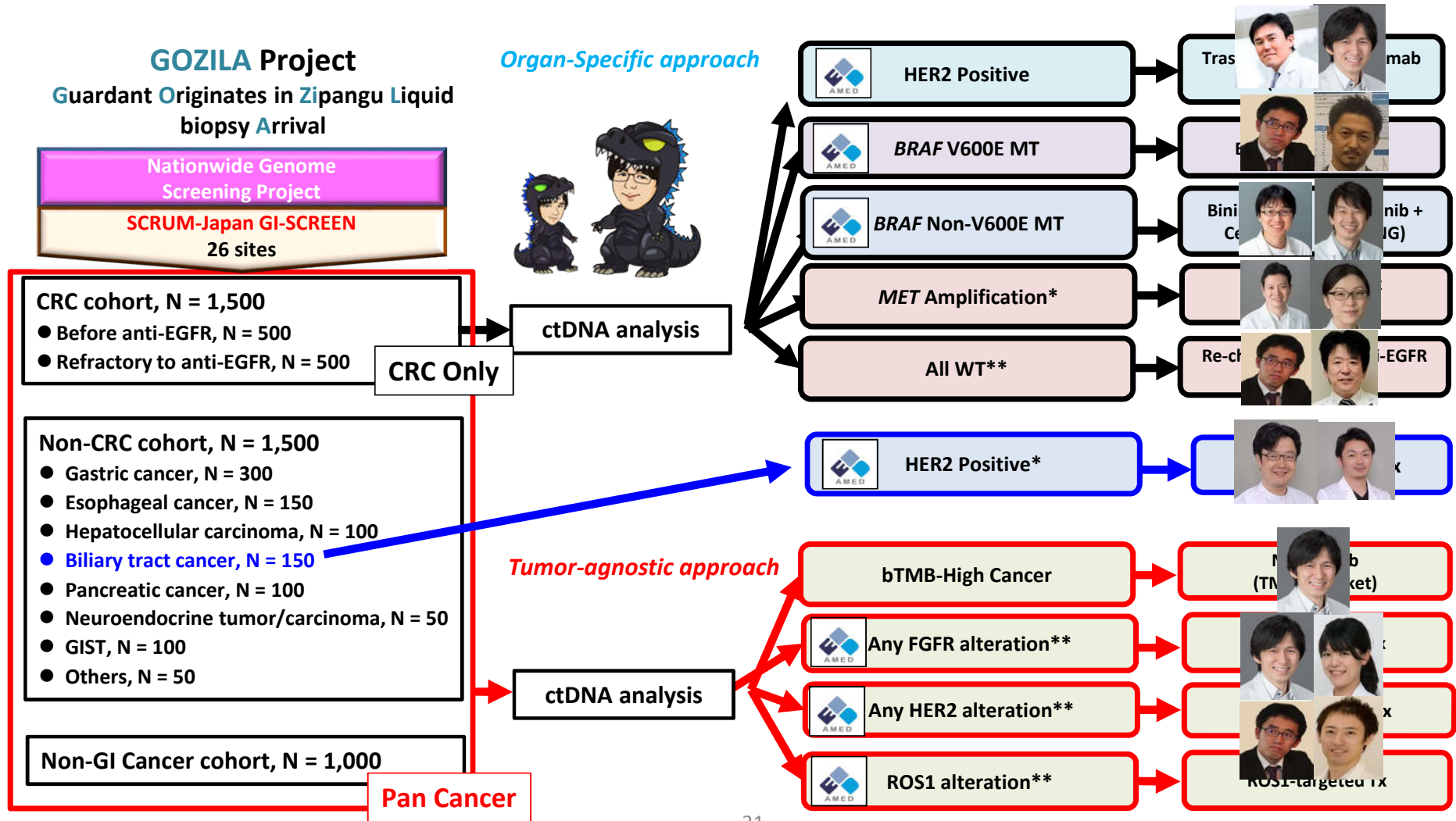
Natural history follow-up

予定症例数：組織・ctDNAそれぞれのグループで25例

主要評価項目：

- Confirmed objective response rate in HER2 positive in tissue
- Confirmed objective response rate in HER2 positive in ctDNA

# GOZILAプロジェクト



# MONSTAR-SCREEN (次期SCRUM-Japanの取り組み)

## SCRUM-Japan MONSTAR-SCREEN



Nationwide Genome  
Screening Project

SCRUM-Japan  
MONSTAR-SCREEN

### 主な適格規準

- 治癒切除不能な固形悪性腫瘍 (肺がん除く)
- 腫瘍組織を用いてがん関連遺伝子パネル検査を行った又は行う予定

N = 2000

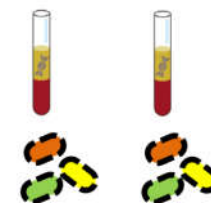
コホートA N = 500  
薬物療法未治療の患者  
(大腸癌・胃癌・乳癌・黒色腫)

コホートB N = 500  
特定の遺伝子異常を有する患者

コホートC N = 500  
免疫チェックポイント阻害薬による治療を予定している患者

コホートD N = 500  
特定の分子標的薬による治療を予定している患者

血液・便検体の  
経時的な採取



ctDNAの  
がん関連遺伝子異常解析



腸内細菌叢解析





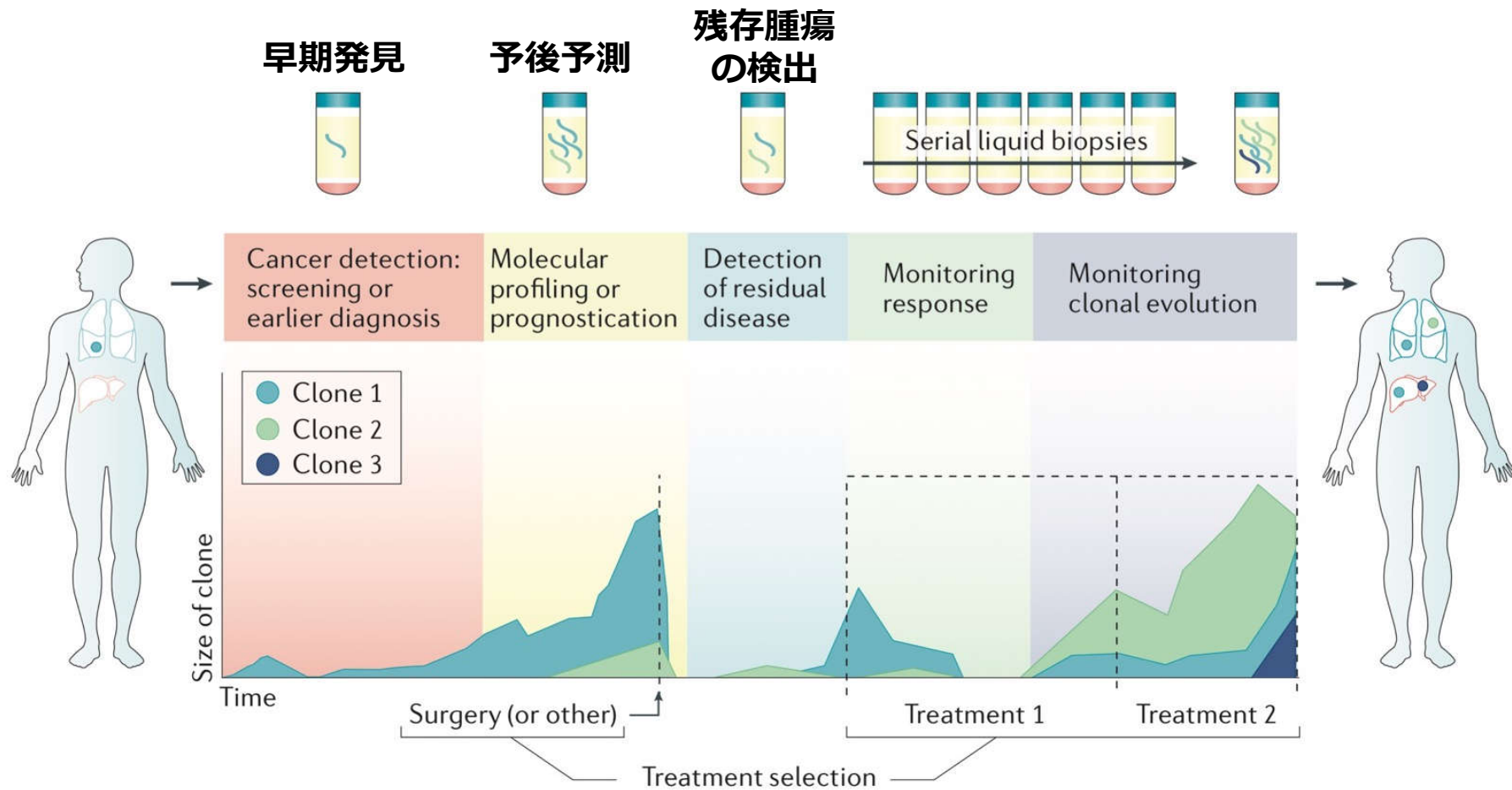
# Agenda

- **リキッドバイオプシー総論**
- **Circulating tumor DNA (ctDNA) とCell-free DNA (cfDNA)**
- **ctDNA解析の臨床的有用性**
- **リキッドバイオプシーの未来**

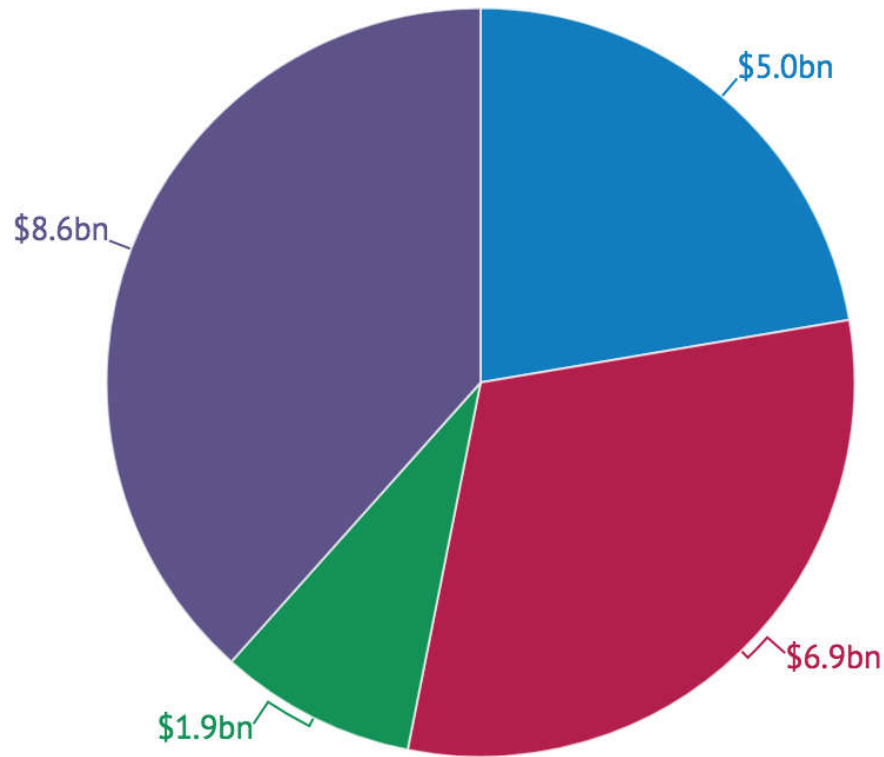
# ctDNA解析の利点

- **低侵襲・低コスト（？）：繰り返し測定が可能**
- **結果の返却が早い（Turn-around-timeが短い）：素早い治療選択に繋がる**
- **腫瘍の全体像を評価できる：真の標的遺伝子異常を同定できる（？）**

# Applications of Liquid Biopsy



# リキッドバイオプシー市場の予測（2020年）



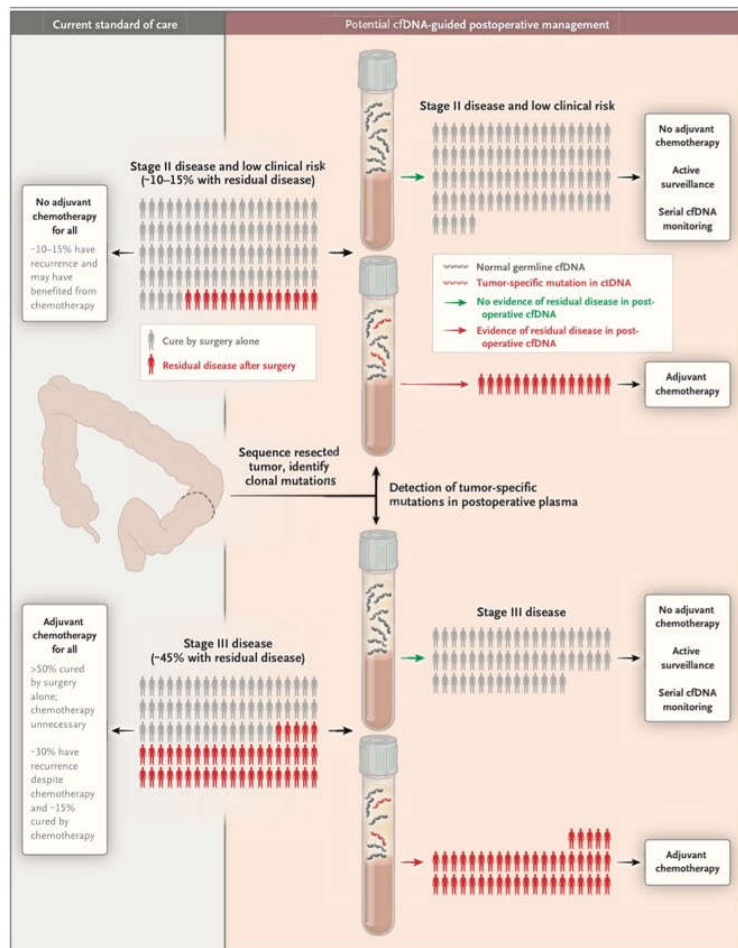
- 近い将来、早期診断（Screening）がリキッドバイオプシーで最大の市場になる可能性が高い
- 早期がん患者の血液検体を用いた validation と前向きを検証試験を進める必要がある

● Monitoring ● Prognosis ● Theranostics ● Screening

Source: JP Morgan

<https://medtech.pharmaintelligence.informa.com/MT103794/Liquid-Biopsy-In-Oncology-An-Increasingly-Crowded-Landscape>

# 再発予測の有用性検証

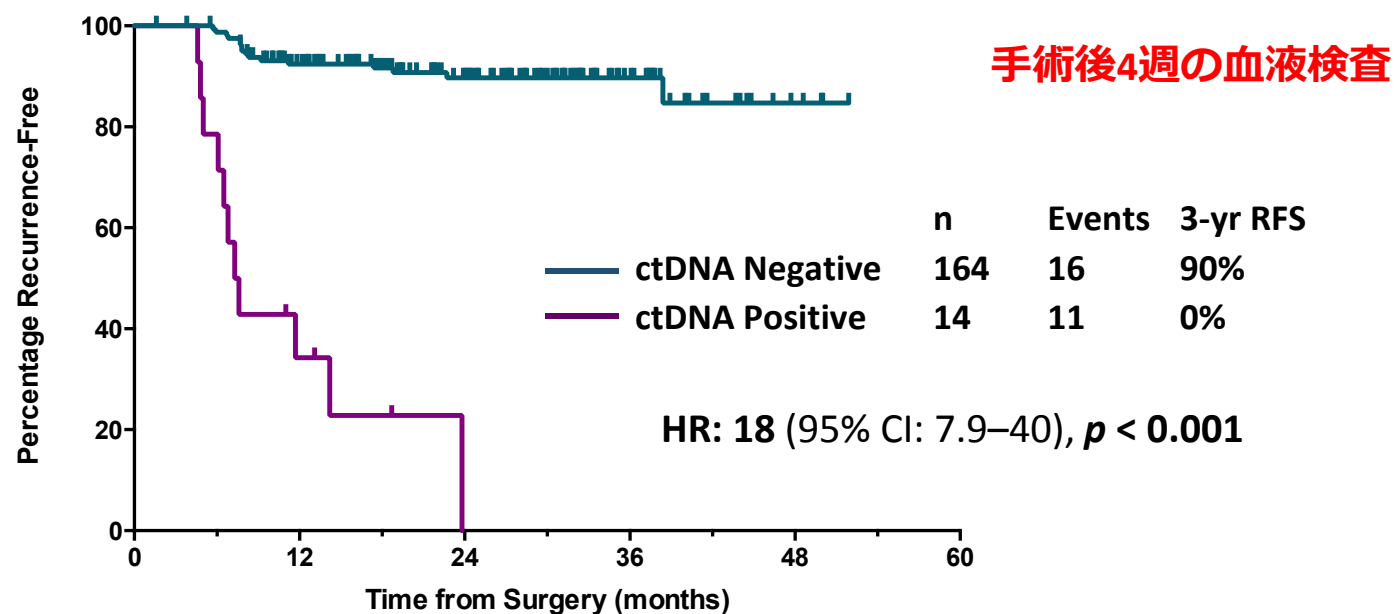


術後ctDNA陰性→経過観察のみ

術後ctDNA陽性→術後補助化学療法

# Stage II大腸がん (Safe-SeqS法)

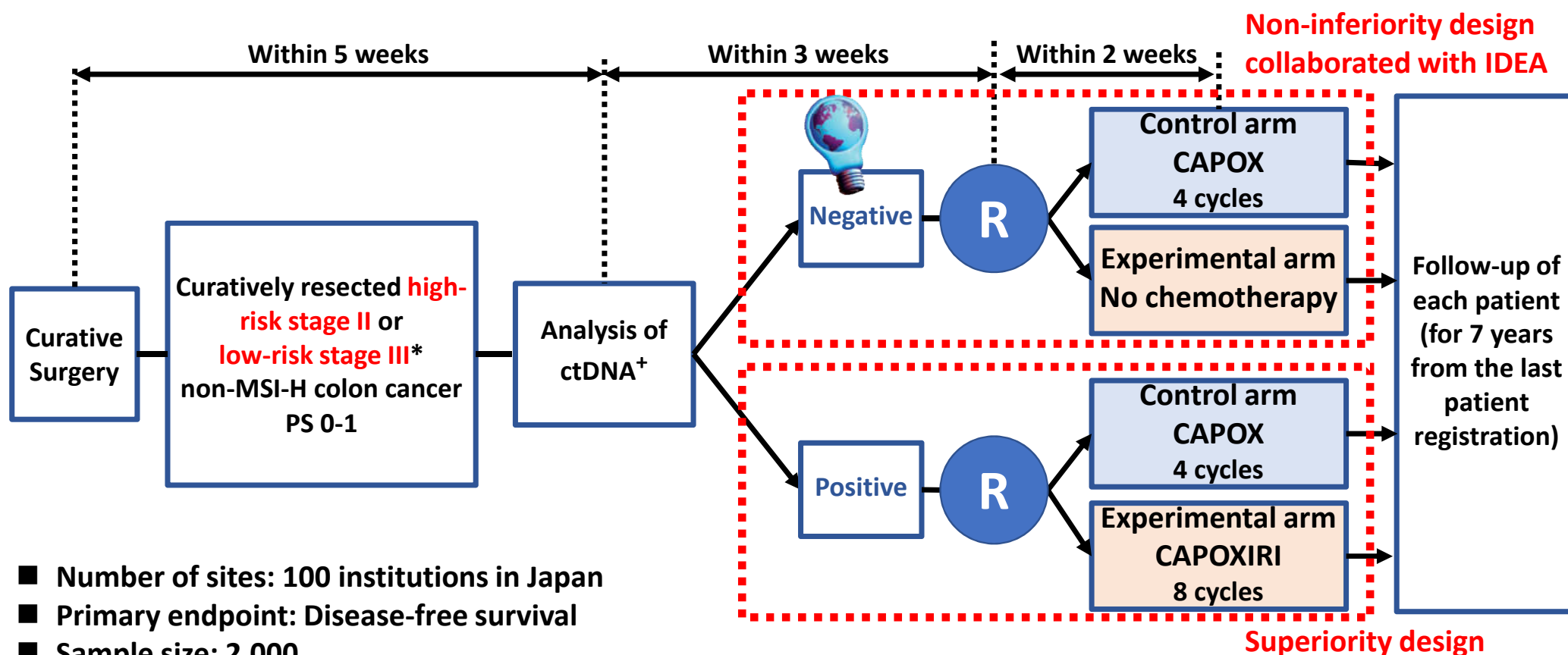
## Recurrence-Free Survival (Patients *not* treated with chemotherapy)



術後経過観察例178例での検討: ctDNA陽性群は全例再発

# 再発予測の有用性検証の一例

## 計画中の臨床試験



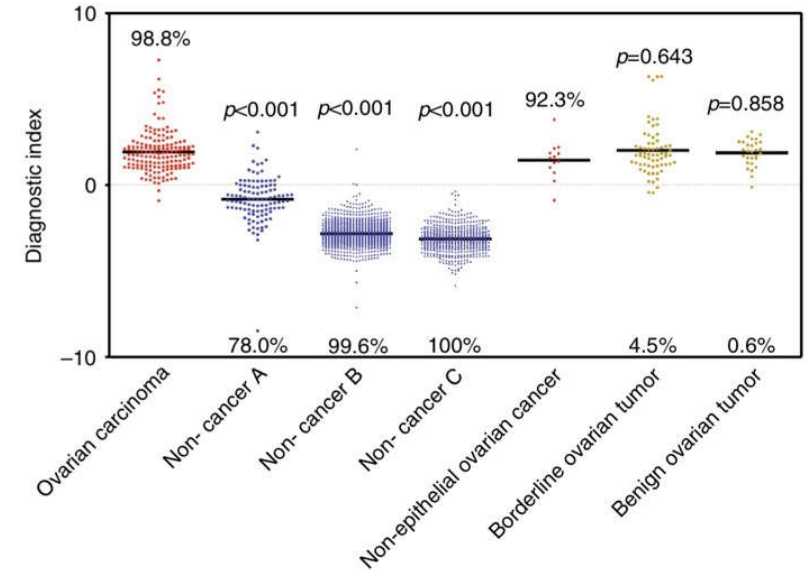
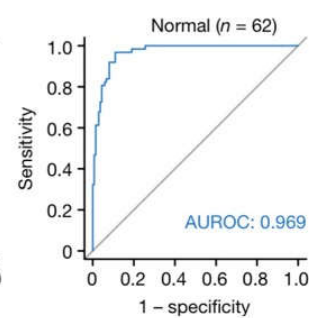
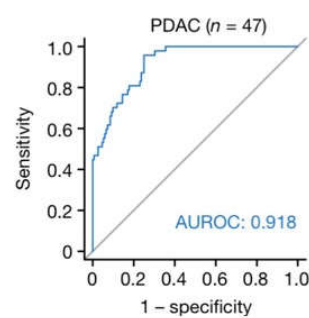
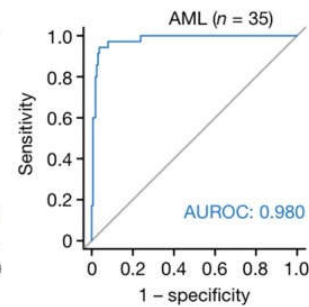
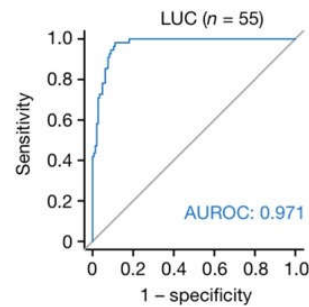
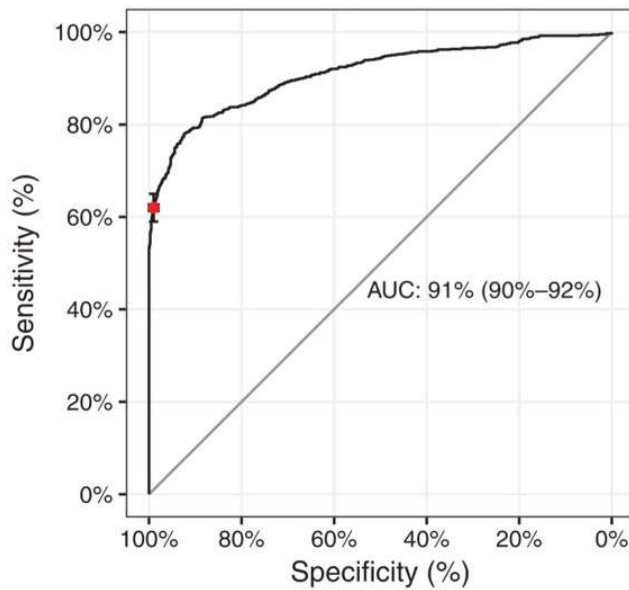
- Number of sites: 100 institutions in Japan
- Primary endpoint: Disease-free survival
- Sample size: 2,000
- Funds: the JFMC Funds

# リキッドバイオプシーによる早期発見

## ctDNA + タンパク<sup>1</sup>

## DNAメチル化<sup>2</sup>

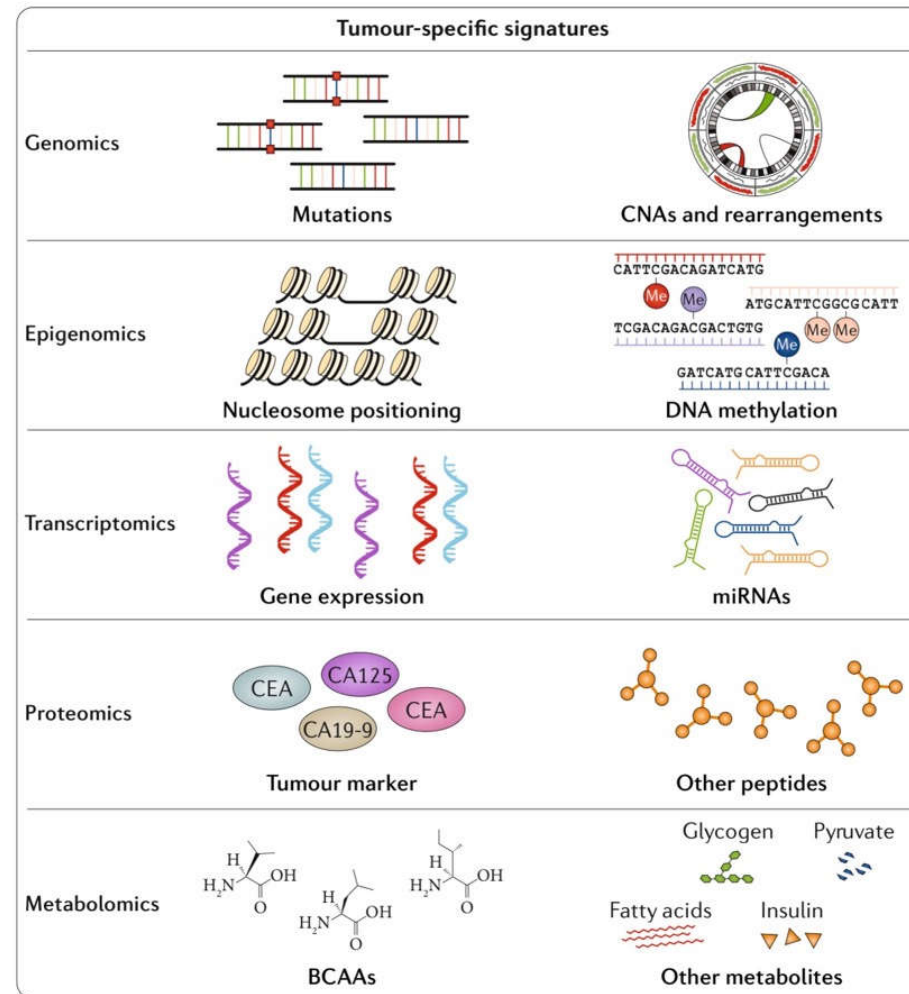
## エクソソーム<sup>3</sup>



1. Cohen JD, et al. Science. 2018.; 2. Shen SY, et al. Nature. 2018.; 3. Yokoi A, et al. Nature Commun. 2018.



# Various Liquid Biopsy Analytes



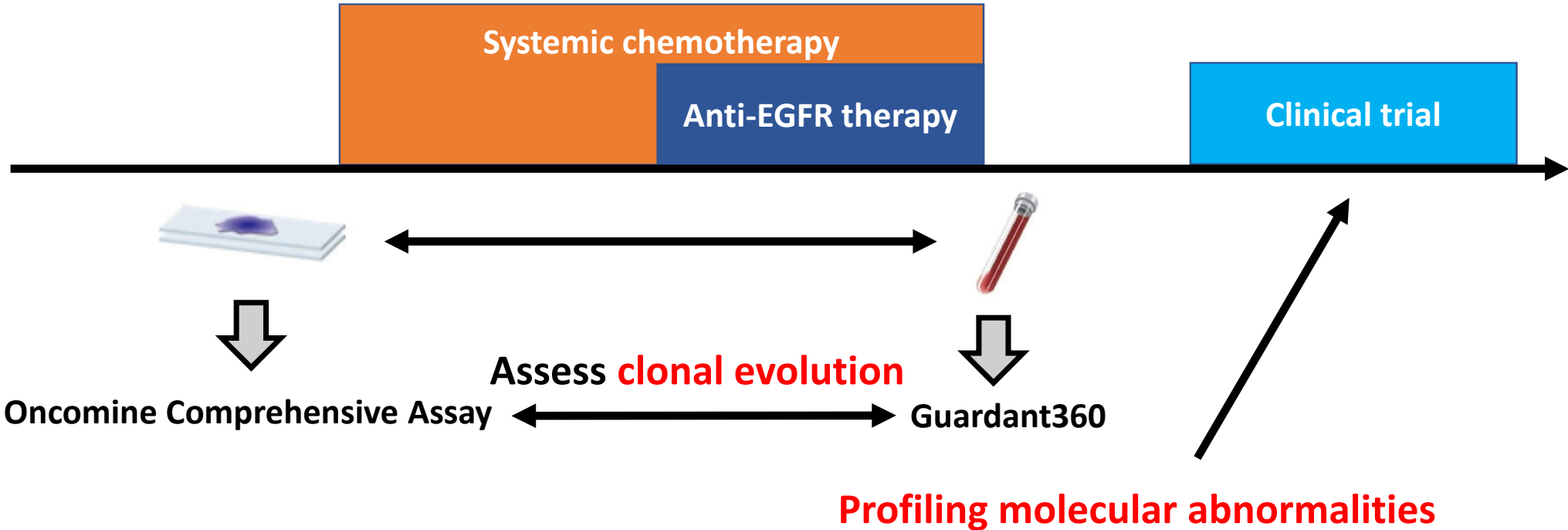
*Thank You For Your Kind Attention!!*



# BACK UP

# GOZILA Overview

CRC refractory to anti-EGFR cohort



**RAS WT refractory to anti-EGFR Tx, N = 70**

**ctDNA-positive variants**

**Tissue-positive variants**

