

2.1.8 バイオマーカー・リキッドバイオプシー

(1) 研究開発領域の定義

バイオマーカーとは、集団の中から病気の可能性のある人を発見する、疾患を特定する、病気の進行度・ステージを把握する、治療中や治療後の経過を観察する、予後を予測する、最適な治療を決定する、などの目的に応じた様々な診断を下すために客観的に測定・評価される指標である。がん領域では、診断、治療選択のために腫瘍組織検体を用いた体細胞変異等の遺伝子検査が臨床で用いられている。

より侵襲性の低い方法として、血液、尿、胸腹水などの液性検体に含まれる腫瘍由来核酸等を用いたリキッドバイオプシーが注目されている。近年、RNA、タンパク質、代謝物、エクソソームなど様々な物質がリキッドバイオプシーにおけるバイオマーカーになる可能性が検討されており、がん以外の領域の診断検査にも利用することが試みられている。

これらの研究開発を進展させることにより、疾患メカニズムの解析および、診断計測機器・治療技術を高度化し、精密医療（個別化医療）の進展に資する。

(2) キーワード

精密医療、個別化医療、患者層別化、疾患オミクス、CTC (Circulating Tumor Cells)、cfDNA (cell free DNA)、ctDNA (circulating tumor DNA)、miRNA (microRNA)、エクソソーム、次世代シーケンサー

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

個々人に最適で効率的な医療を実践する上で、バイオマーカーの開発は不可欠である。近年の技術進歩によって、疾患由来の微量な物質（群）の変動を詳細に、あるいは網羅的に捉えることが可能となり、一部がゲノム医療ではリキッドバイオプシー診断薬（LBx）の臨床応用が始まっている。

バイオマーカーは、薬力学的バイオマーカー、効果予測（有効性-奏功）バイオマーカー、予後予測バイオマーカーに大別されるが、サロゲートバイオマーカー、モニタリングバイオマーカー、層別化バイオマーカー、安全性・毒性バイオマーカーなども存在する。

効果予測（有効性-奏功）バイオマーカーは、医薬品の臨床試験における代替エンドポイントになり得るものである。代替エンドポイントは、さらに後の時点での患者の特定の臨床アウトカムを予測するものであり、製造販売承認の意思決定の基本となるデータとして利用可能である。代替エンドポイントは、最も重要（primary）な臨床的ベネフィットを測定するものではなく、代わりに疫学的、治療学的、病理学的またはその他の科学的根拠に基づいた臨床ベネフィットを予測する。疾患等に関連する効果予測バイオマーカーを利用して医薬品の投与患者を特定する場合、当該医薬品使用の前提として、体外診断用医薬品を使用することになる。このような治療の選択などに用いられることにより個別化医療に資する体外診断薬が「コンパニオン診断薬」として臨床応用されている。

がん領域では、組織生検が1世紀以上にわたり診断のゴールドスタンダードとして不動の位置を確立している。しかし、侵襲性が高い組織生検を繰り返し実施することは困難であり、病変部位が明確でない超早期段階で検出したり、疾患の状態や経過を経時的にモニターしたりするためには、繰り返し採取が可能な低侵襲性検体が必要である。

2.1

俯瞰区分と研究開発領域 健康・医療

多くの腫瘍は後天的に獲得される体細胞変異が集積して起こる多段階発がんにより生じるが、一つの強いがん遺伝子であるドライバー遺伝子により発症する場合もある。特に後者はキナーゼ阻害薬等の分子標的薬の良い標的となり、ドライバー遺伝子に対する分子標的薬の開発が進められ、固形がんでは非小細胞肺癌を中心に複数のコンパニオン診断薬と分子標的薬が同時に承認されている。さらに、日本においても2019年6月に複数の遺伝子変化を同時に検査できる遺伝子パネル検査（網羅的ゲノムプロファイリング検査）が保険収載され、遺伝子パネル検査を用いた精密化医療の実装が進められている。がん治療薬の開発には、バイオマーカーの開発を同時並行に進めることが必要であるとされ、同時開発、同時承認がコンセプトとなってきた。

しかし、遺伝子パネル検査で標的遺伝子の変化が見つかり治療薬が提示されたものの、実際の投与に到らない割合は高く、国内外の報告では80-90%にのぼる。その原因としては、当該治療薬の承認適応外のがん種である場合や、未承認であってもそれを使用することができる治験、臨床試験が実施されていない場合、さらに対応する分子標的薬が承認されていない場合等が挙げられる。現在のゲノム医療に関する診療ガイドライン¹⁾において、日本では「標準治療のない若しくはその見込みの患者」で、「薬物療法の対象となる患者」にのみ遺伝子パネル検査を用いることができ、標準治療が存在する多くのがん患者では、真の個別化医療を実現するために必要な、治療開始前に治療法を見出すための遺伝子パネル検査の受検は叶わない。標準的治療が無くなった時点で、更なる治療を検討する目的で遺伝子パネル検査の受検を希望しても、厳しい基準をクリアした腫瘍組織検体を準備するために、侵襲性の高い再生検の必要が生じ、断念する例が多いことが報告されている²⁾。したがって、低侵襲であり、繰り返しの採血が可能な血漿検体を用いたリキッドバイオプシーを用いた検査に期待が寄せられている。

米国NCIはリキッドバイオプシーを「血液試料に対して行われる検査で、血中のがん細胞またはがん細胞由来 DNA 断片を調べるもの」と定義しているが、世界で初めてリキッドバイオプシーを診断用途で実用化したのは母体血を用いた出生前遺伝学的検査（Non-invasive prenatal testing (NIPT)）である。がん以外の領域においても、高精度で低侵襲な検査へのニーズは高い。

がん診断やNIPTには、疾患に関わるゲノム情報が利用されている。ゲノミクスをはじめとする近年のオミクス技術の発展は、分子情報の網羅的取得と統計的解析によって、患者を特定の疾患に罹患しやすい、もしくはリスクの高い集団に層別化することにより、精密医療や予防・先制的医療の可能性を開いた。遺伝だけでなく、生活環境やライフスタイルにおける個々人の違いを考慮した医療を提供するためには、ゲノム情報の他に、プロテオーム、メタボローム等のフェノーム情報も網羅的に解析し統合することが重要であり、今後の更なる研究開発が望まれる。また疾患オミクスの発展によって、新たな疾患メカニズムが解明されることも期待されている。

【研究開発の動向】

バイオマーカーとは、FDAの定義では「正常の生物学的過程、発病過程、治療介入による薬理学的反応における客観的に測定・評価可能な指標として測定される特性」、NIHの定義では、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療処置に対する薬理学的反応の指標として用いられるものである」とされる。

NGSが2000年半ばに米国で登場し、ゲノミクスの分野が飛躍的に発展した。質量分析器やバイオインフォマティクスの高度化はオミクスをさらに発展させ、ゲノムのみならずプロテオーム、メタボローム等様々な階層で疾患に関連するオミクスデータが蓄積されてきた。これらの情報を統合して検討することにより、遺伝的影響のみならず環境的影響についても評価することが可能となってきた。環境因子への応答を記憶する遺伝子

素因としてエピジェネティクスが注目され、栄養素や代謝産物によるエピゲノムの修飾は生活習慣病の新たな分子基盤として今後の展開が期待されている。近年では、多くの新規バイオマーカー探索にオミクス技術が用いられている。また、個々人のオミクス情報を取得することにより、治療介入後の反応や予後予測が可能となり、精密医療・個別化医療が実践可能な段階となった。さらに、網羅的データの統計的解析から得られたいくつかの特徴的バイオマーカーを組み合わせることによって、疾患リスクの高い人を効果的に選別し、早期診断よりもさらに早い段階で介入する先制医療・予防医療が実現に向かっている。

このように莫大なデータを網羅的・体系的に扱い解析するためには、システムズバイオロジーやバイオインフォマティクスとともに、得られた情報を整理・蓄積・公開するためのデータベースの開発が重要となる。複数の専門家が協力する体制を構築することも必要で、欧米を中心に体制作りが急速に行われている。米国では官民パートナーシップとしてThe Biomarkers Consortiumが2006年に組織され、成果を上げている。また、ゲノム医療計画としてGenomic Medicine Programが2007年から開始され、複数拠点においてゲノムコホート研究を進めている。既存のゲノムコホートを有機的に連携させ、ネットワークを形成している。英国ではPrecision medicineが国策として推進されており、ゲノム医療を実践・導入するためにNational Health SystemがGenomics Englandを設立し、2013年から癌や希少疾患を対象に10万人規模でゲノム情報の解析研究が行われた。次の目標を500万人に拡大し、まずは2023～2024年までにNHS 50万ゲノム（疾患ゲノム）とUK Biobank 50万ゲノム（健常人）を対象として継続している。このGenomics Englandでは、全ゲノム情報の解析から統合ゲノム情報の集積までをひとつのセンターで実施しており、拠点として整備されている。日本では、2012年より国立循環器病研究センターが循環器の領域に特化したバイオバンクを国内で初めて発足させ、様々な医療情報や生体試料を利用して多面的な研究が行われるようになってきている。また、東日本大震災の被災地の地域医療再建と健康支援に取り組みながら、医療情報とゲノム情報を統合させたバイオバンクを構築するために、東北メディカル・メガバンク計画が実践され、人材育成、産官学連携の促進を目指している。さらに、2013年には、国立がん研究センター東病院をはじめ全国の約200以上の病院と約15社の製薬会社による“SCRUM-Japan”という日本初の産学連携プロジェクトが発足した。進行がんを中心に、希少頻度の遺伝子異常を持つ患者を発見し、がん細胞の遺伝子変異の分析結果をバイオマーカーとして最適な効果が期待できる薬物を投与することを目的としている。患者14,500人を目標に登録が進められており、がんゲノム疫学データの構築、臨床・ゲノムデータの共有化を目指している。中国においてはゲノム解析の分野においてその実践が急速に発展している。特に世界最大規模のゲノム研究所を擁する中国企業 BGI社の成長が著しく、米国のシーケンサー大手 Illumina社を凌ぐ勢いであり、さらに次々世代シーケンサーの開発を進めることが公表されている。また国家重点研究計画 Precision Medicine 重点プロジェクトが2018年1月に公表され、10万人の中国人のゲノムとマルチ・オミクス参照データベース・分析システムを構築することが目的とされている。

以上のように、遺伝子、分子、細胞レベルのビッグデータ分析と疾病要因遺伝子情報をはじめとしたリファレンスデータベースに基づいた診断を実施し、特定の集団ごとに特殊化された治療法や予防法を行う医療は、今後さらに普及してゆくと予想される。

このような動きの中で世界規模のがんゲノム情報が蓄積されていることと、極微量なサンプルから正確な解析を行う技術が発展してきたことを背景として、新規の診断法として近年注目され、世界中で熾烈な開発競争が行われているのがリキッドバイオプシーである。がん領域ではTumor circulomeのうちリキッドバイオプシーが対象とする主なバイオマーカーは、Circulating tumor cells (CTC)、Circulating tumor DNA (ctDNA)、micro-RNA (miRNA)、エクソソーム（細胞外小胞）、Cell free DNA (cfDNA)、tumor-

educated platelets (TEP)、タンパク質である。CTC、ctDNA ベースの検査が既に臨床現場で使用され始めているが、高感度のアッセイ法が必要であり、さらに、検査の成否はサンプルの質・量に大きく依存するため、前処理標準化、血液等検体の品質保証も重要となる。以下に代表的なバイオマーカーの動向を概観する。

・ CTC

CTC は、腫瘍組織から遊離し血中へ浸潤したがん細胞であり、がん転移の形成過程に深く関与すると考えられている。Ashworthが1869年にCTCの存在を証明したが³⁾、その価値は1990年代まで見過ごされていた⁴⁾。CTCは血液から精製することができ、その物理化学的特性の違いによって正常な血中細胞と分離することができる⁵⁾ものの、患者血液の 1×10^6 個の血球成分中に1個程度しか存在しないため、同定し単離することは難しい。解析するためには、血液中からCTCを効率的に回収する技術が必要であり、CTCを選択的に捕捉するための新しいアプローチが次々に試みられている。米国Veridex社（現、Menarini-Silicon Biosystems 社）が開発した CellSearch® システムは、現在、転移性の乳がん、前立腺がん、大腸がん領域でFDAの承認を受けた唯一の検出系である。また、EUから製造販売承認されている 独 GILUPI 社の CellCollector® は血管内に医療用ワイヤーを静置することで、CellSearch®と同様の原理ながら高感度化に成功している（ただし、侵襲性が高まっている）。しかし、これらは抗epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) 抗体を使った免疫磁気的方法であり、EpCAMを発現していない CTC は捉えることができない。CTCには上皮間葉転換によって上皮系マーカーの発現が低い幹細胞様の性質も示すものが存在し、それらががんの浸潤、転移と関連すると考えられている。そのため、EpCAMに因らない検出法の検討も行われている。マイクロ流体およびチップ技術に基づく CTC チップ、マイクロホール検出器、およびCTC-iChip（慣性集束強化マイクロ流体CTC捕捉プラットフォーム）を含むマイクロ流体デバイスが開発されている。CTCはまた、ろ過、マイクロフルイディクス、超遠心、デンストメトリー（MagDense）、誘電泳動（DEPArray™：誘電泳動技術を使ったセルソーター）を介して、そのサイズ、密度、および誘電特性に基づいて正常な血液細胞から分離できることが報告されているが、物理学的特性だけでCTCを採取することは難しく、生物学的手法と組み合わせた検討が進んでいる^{6), 7)}。臨床的に信頼性の高い検出法の開発を目指して、今後も競争が続くものと思われる。

CTC の臨床的意義については多くの報告がなされている。例えば、肺がんにおける予後予測因子や進展度のマーカー^{8), 9)}、乳がんの再発リスクの層別化マーカー¹⁰⁾ としての可能性などが報告されている。一方、乳がんにおける化学療法後の治療効果判定の意義を検証した試験においての結果は、CT 画像より好成績であったという報告¹¹⁾ に対して、後にCTC カウントに基づいて治療を変更しても無増悪生存期間および全生存期間の改善は認められなかったとするネガティブな結果も報告されており（SWOG S0500 試験）¹²⁾、臨床的価値についても引き続き慎重な検討が必要である。CTC 診断のメリットは、直接がん細胞を見ることでタンパク質や遺伝子発現などの単細胞プロファイリングもできる点である。CTC カウント数をベースとした報告が多いが、今後は他のバイオマーカーと組み合わせた利用が広がることが考えられる。例えば、HER2 陰性乳がんにおいて、CTC 陽性かつCTCにおける HER2 陽性患者に対する標準療法と標準療法+抗HER2療法の有効性を比較するランダム化試験（DETECT III試験）が行われ、抗HER2療法によって生存期間が延長することが2020年のSABCSにて報告された。今後、一細胞解析技術を用いたCTC プロファイリングをベースに、さらに高精度の診断法が開発されることも期待される。

2.1

・ cfDNA, ctDNA

細胞死などによって細胞から遊離したDNAが、血液中に存在する (cell-free DNA (cfDNA))。ctDNAは、がん患者血液中に含まれている腫瘍細胞由来のDNA断片である。血漿ctDNAは60年以上前に認識されている¹³⁾。1977年、Leonらは、ラジオイムノアッセイを用いてリンパ腫、肺、卵巣、子宮および子宮頸部の腫瘍を有する患者の血液中でcfDNAの濃度が増加することを報告した¹⁴⁾。がん関連遺伝子の変異が検出できることが示唆され、2010年頃のNGSの登場により一気に研究が進んだ。2018年には米国のTCGA (The Cancer Genome Atlas) からPan Cancer Atlasが公開されるなど、各国の大型がんゲノムプロジェクトから次々に成果が公開されており、この分野の追い風となっている。

ctDNAが腫瘍組織から血中に放出されるメカニズムは分泌、壊死、アポトーシスによると考えられており、血中に低濃度しか存在しない。したがって、高感度な検出方法が必要であるが、近年のデジタルPCR (dPCR) の実用化に伴ってアッセイの最小検出感度は飛躍的に向上し、臨床応用への展開が加速された。dPCRは定量性に優れているが、ターゲットした特定の変異にしか適用できず、遺伝子内に多様な変異が観察される場合に使えないという弱点もある。近年、より広いターゲットの遺伝子パネルを探索対象として、NGSを用いて検出する高感度技術も開発されている。

ctDNAは、がん診断における重要なバイオマーカーと考えられ、がんの各段階でctDNAの定性的および定量的変化を検出することにより、早期発見、治療法選択、病態進行や術後残存病変のモニタリング、薬剤効果判定、再発のための診断ツールとなりうる。近年、臨床応用が進んでおり、各社が次々とキットを開発している。例えば、治療法選択のために非小細胞性肺がんの遺伝子変異を検出するスイスRoche社Cobas® EGFR変異検出キットv2.0は、CDxとして2016年にFDAから承認されており、日本でも保険適応となっている。他にも、PCRをベースとしたCDxとして大腸がんを対象とした独Sysmex Inostics社OncoBEAM™ RAS CRC kit、米Biocartis社Idylla™ KRAS、NRAS+BRAF ctDNAなどがすでに発売されている。さらに、ホルモン受容体陽性HER2陰性乳がん患者を対象としたPI3K阻害薬Buparlisibの有効性を検討したランダム化試験 (BELLE-2試験) において、組織検体ではPIK3CAの変異が検出されず、ctDNAでのみ変異陽性であった患者においてBuparlisibを含む治療で無増悪生存期間が延長する傾向が示された¹⁵⁾。異なるPI3K阻害薬Alpelisibで有効性が示されたことから、2019年にCDxとしてTherascreen® PIK3CA RGQ PCR KitがFDAで承認された。

がんゲノムプロファイリング検査を目的としたNGSベースのリキッドバイオプシーは、2020年8月にGuardant Health社のGuardant360® CDx、Foundation Medicine社のFoundationOne® Liquid CDxがFDAから承認を得た。Guardant360® CDxについて、血液試料はBio-RAD社のdPCRであるQX200™との比較を222検体、腫瘍組織と血液検体との比較は非小細胞肺癌患者の臨床情報を使って543検体、実際の臨床検体として10,593検体を解析し、腫瘍組織由来のDNAの解析と同様の遺伝子変異検査結果が得られることが報告されている¹⁶⁾。

NGSをベースとするアッセイは、キャプチャー法とアンプリコン法を使うものに大別され、相対的にキャプチャー法は網羅性が高いが検出感度に劣り、アンプリコン法は検出感度が高いが測定遺伝子数が低い¹⁷⁾。一般的には低アレル頻度 (5%未満) サンプルの検出は難しいとされ、従来のNGSによる変異検出の最小感度は5%程度であるが、検出感度を向上させるため、分子バーコード法やエラーを除去するバイオインフォマティクス手法などを併用したSafe-SeqS (Safe-Sequencing System)、TAm-Seq (Tagged-Amplicon deep Sequencing)、CAPP-Seq (Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing) 法が開発されている^{18), 19)}。

2.1

俯瞰区分と研究開発領域
健康・医療

早期ステージでのモニタリング用途として注目すべきものに、米 Natera 社の Signatera™ ctDNA 技術がある。この技術は、患者の腫瘍サンプルを Whole-exome sequencing し、存在が確認された 16 個以下の突然変異 “tumor signatures” に焦点を当てているという点で個別化されており、高い感度と特異性で ctDNA 検出とモニタリングが可能になる。2017 年に Nature 誌に発表された研究では、最初の 100 人の TRACERx (Tracking Non-Small-Cell Lung Cancer Evolution Through Therapy (Rx) : NSCLC の進行に対して治療を通じて追跡する (Rx)) 研究参加者の ctDNA をプロファイリングする腫瘍特異的系統発生アプローチのためにこの技術が用いられた²⁰⁾。また、乳がん患者 49 名の原発巣から各患者で個別化した 16 遺伝子の変異を選択して構築したパネルを用い、半年ごとの採血で ctDNA は臨床/画像診断よりも早く再発を検出 (16/18 感度 89%) で、31 名の非再発患者群では 1 名も ctDNA は検出されなかった (特異度 100%) ことが報告されている²¹⁾。2020 年に始動した国立がん研究センターなどが進める大腸がんの微小残存病変 (MRD) を対象に再発リスク評価を検証する CIRCULATE-Japan プロジェクトにおいても、Signatera™ アッセイが用いられる。

また、インディアナ大学の研究者らは、ctDNA と CTC の両方を測定する複合的な方法により、ネオアジュバント化学療法後のトリプルネガティブ乳癌の女性における残存病変を検出し、病変の再発を予測することができることを報告した。リキッドバイオプシーによる微小残存病変 (minimal residual disease (MRD)) 検出に関する従来の研究では ctDNA に焦点を当てているが、著者らは、ctDNA の兆候を示さない一部の患者でも CTC を検出できるという証拠があるため、この第 2 の分析物を追加することで MRD シグナルを拾う能力を高めることができるとしている²²⁾。

日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会合同の「次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドライン」では、ctDNA 解析における留意点として、検体の取り扱いや分析的・臨床的妥当性の評価方法などが統一されていない、ctDNA 量が少なく検出できないことや原発・転移腫瘍の局在部位や遺伝子変化の種類で感度が低下する可能性がある、クローン性造血に関連する遺伝子変化と ctDNA を厳密に区別する方法が確立されていないことが挙げられている。

・ miRNA、エクソソーム

エクソソームは細胞外小胞 (extracellular vesicles (EVs)) の亜分類で、ほぼ全ての細胞が分泌する直径 50 ~ 150 nm 程度の脂質二重膜で囲まれた細胞外微粒子である。2007 年スウェーデン Göteborg 大学の Lötvall らによって、エクソソーム内に分泌細胞由来の mRNA や miRNA が存在し、それらが他の細胞に受け渡されることで細胞間の情報交換が行われている可能性が示された²³⁾。この報告をきっかけに、エクソソームは新たな細胞間情報伝達機構として注目され、新規機能解析やエクソソームを標的とした、または応用した研究開発が世界中で活発に行われている。疾患部位に由来するエクソソームや血中 miRNA を検出してがんの診断に応用する研究が進んでいる。Exosome Diagnostics 社の尿由来エクソソーム RNA を解析する ExoDx™ Prostate が FDA から画期的医療機器/デバイス指定を受け開発中である。しかし、疾患特異性についての評価はいまだ不十分である。血中 miRNA 診断の技術的課題としては、回収方法が標準化されておらず測定方法によって定量性が一定でないという点が挙げられる。現在、エクソソームを簡単・迅速に定量分析できる方法として、ExoScreen、ExoTEST™、mNMR (micro nuclear magnetic resonance)、nPLEX (nano-plasmonic exosome)、FACS などが開発されている。例えば、ExoScreen 法では、ビーズ付抗体試薬を用いており、エクソソームの精製・濃縮が不要で、超遠心機を用いず 1.5 時間程度で解析が可能である¹⁰⁾。96 ウェルプレートを使用するためスループットが良いことも特徴である。さらに、エクソソ-

ムの技術プラットフォームとしては、光ディスクとナノビーズの技術を融合させて体液中の抗原特異的なエクソソームをひとつずつ検出し、デジタルカウントできるJVC ケンウッド社 ExoCounterや尿中の細胞外小胞捕捉デバイスである酸化亜鉛ナノワイヤ、エクソソーム特異的タンパク質分析システムである米Exosome Diagnostics社の Shahky™ などが挙げられる。日本では、2014年度から国立がん研究センターが NEDO の支援の下、東レ社、東芝社など9機関と共同で体液中miRNA 測定技術基盤開発事業を実施し、血液中エクソソームのmiRNA を解析してすい臓がん、乳がんなど13種類のがん患者と健常者を2時間以内に高精度で網羅的に識別できることを確認している。今後、社会実装に向けた検討が進むと期待される。

・ Tumor-educated blood platelets (TPEs)

新たなバイオマーカーとしてTPEsを用いた遺伝子発現解析が報告されている。血小板のRNAは分化・成熟・循環の過程で周囲の環境と相互作用し、このRNAを解析することでがん患者と健常者を識別できることが報告されている³³⁾。検体は、血小板リッチ血漿であるが、その分離には手間がかかる。テルモ社が血小板リッチ血漿分離装置を米国において医療品として販売しているが、日本では承認されていない。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

・ がん領域

ctDNAの血中半減期は数時間であるため、根治を目指した治療後に検出されるctDNAは微小残存病変(MRD)の存在を意味すると考えられる。MRDは、バイオマーカーとしての使用が可能であるとされ、患者の治療反応性を反映し、将来の再発リスクを評価するための予後ツール、臨床試験における対象患者の選択や特定の治療群への割付けに利用することもできる。例えば、急性リンパ性白血病(ALL)における患者の年齢、白血病細胞の起源(BまたはT細胞性)、もしくは遺伝子異常に基づくサブタイプ分類とは独立した最も重要な予後因子の1つであることが明らかにされてきた。MRDを評価項目として、2018年にFDAはblinatumomab (Blinicyto®)を初回または2回目の完全寛解中でMRDが0.1%以上のB細胞前駆型ALL患者に対してMRD奏効率(感度0.01%の検査で1サイクル後にMRDが検出されなければ、MRD奏効と判定)に基づき迅速承認した。また、3つの臨床試験のレトロスペクティブ解析に基づき、ALLまたは多発性骨髄腫患者でのMRDの検出およびモニタリングを適応として、NGSアッセイが承認された。

免疫療法のバイオマーカーとなる可能性があるMSI (microsatellite instability) やTMB (tumor mutation burden) についてもctDNAで腫瘍組織検体と比較して高い一致率で検出できることが報告されている²⁴⁾。例えば、非小細胞肺癌患者に抗PD-L1抗体であるAtezolizumabとDocetaxelを比較したPOPLAR試験の74例およびOAK試験の224例を対象に、tTMB (tissue TMB) とbTMB (blood TMB) をFoundationOne® CDxで検証した結果、tTMBとbTMBはよく相関することが示されている²⁵⁾。

・ リキッドバイオプシーのがん以外への展開

母体血漿中の胎児由来 cfDNA を検出することによる出生前診断(NIPT)はすでに臨床応用されており、今後もニーズは拡大するものと考えられている。国内では染色体検査による診断が主流であるが、海外では、NIPTを全ゲノム解析で実施することが普及している。リキッドバイオプシーを用いたNGS検査では、CAPP-seq等の網羅的なtargeted sequencingや全ゲノム解析では、クローン化造血の問題がクローズアップされ、それに対する遺伝カウンセリングなどのケアの必要性が議論されている²⁶⁾。FoundationOne® Liquid、

PlasmaSELECT™-R64、MyRisk®、CAPP-seq (Avenio) 等がFDA承認、国内承認申請あるいは研究用として用いられている。

他の分野では、1998年に移植レシピエントの血液中を循環するドナー由来のcfDNA (donor-derived cfDNA (dd-cfDNA)) の存在が、性別不一致の移植レシピエントにおけるY染色体遺伝子のPCR増幅で最初に検出された²⁷⁾。dd-cfDNAを測定することの主な利点は、移植片組織の状態を直接測ることができるため、細胞媒介性あるいは抗体媒介性の拒絶反応を早期段階で検出できるという点にある。このアプローチを使って早期段階で治療介入を行えば、重度の急性拒絶反応の予防にもつながる。dd-cfDNAを検出することで移植レシピエントの腎臓移植拒絶反応を検出する検査として、CareDx社AlloSure®、Natera社Prospera™が使われている²⁸⁾。

神経変性疾患は、特定のタンパク質が凝集・蓄積することで生じるとするプロテオミクスパッチーの概念が広がり、脳内の病態を反映するバイオマーカーとして凝集タンパク質の検出に期待が高まっている。

脳卒中や脳損傷の重傷度や予後予測バイオマーカーとしてcfDNA、miRNAを解析する検討なども報告されているが、有用性についてはまだ一定の結論を得ていない部分がある²⁹⁾。

・プロテオーム解析

個々人が健康管理をする上でゲノム配列は静的で変化に乏しいため、定期的なモニタリングには動的に変動するタンパク質などの動きを指標にしたほうがよい。質量分析技術は飛躍に進歩しているが、定量性や感度、多検体分析の限界から血液プロテオミクス分野では実用向きでなかった。しかし、技術革新によって抗体を使った測定法も感度が大幅に向上し、一度に多数のタンパク質を測定できるようになってきた。今まで積み上げてきたゲノムデータにプロテオミクスデータを組み合わせたプロテオゲノミクス戦略への関心が高まっている。Quanterix社は超高感度デジタルELISAと称するSimoa®を開発し、従来法の1,000倍の高感度化を実現した。血液中に極わずかにしか存在しない認知症の血液バイオマーカーであるリン酸化タウなどの測定も可能になった。Luminex® assayは、感度はSimoaに劣るものの同時に最大500種類程度のタンパク質と1日1,000検体の測定を可能にしている。Olink Proteomics社は、標的タンパク質を、オリゴヌクレオチド修飾した2種類の抗体で認識させ、2種類の抗体が同一タンパク質に結合した場合に2本のオリゴヌクレオチドがハイブリダイズする系で、ハイブリダイズした部分をPCRで増幅、検出することで高感度化を実現した (Proximity Extension Assay : PEA)。原理的には1 mLの血漿や血清があれば100種類以上のアッセイができ、使用する抗体量は極微量であるため1回抗体を入手すれば同じロットの抗体を長期間使用することでロット間バラツキも抑えられる。NGSと組み合わせることで検体処理能力の向上とコスト削減を実現し、現在の血中の1,536タンパク質の解析能力から、4,500タンパク質の解析能力への拡張が計画されている。血中タンパク質を1,000種類以上定量するという点ではSomaLogic社のSomaScanがある。アプタマー技術とアレイ技術を組み合わせて現在約5,000種類のタンパク質に対して1日680検体の測定能力があるとされている。アプタマーは化学合成品であるため抗体より品質管理が容易であると思われる。

・メタボローム解析

生物は代謝により多様な化合物、代謝物を生産しているが、生体内に存在する糖、アミノ酸、有機酸、脂肪酸、ビタミンなどの全代謝物を網羅的に解析するメタボローム解析の分野が、質量分析器等の機器の発達により急速に発展している。トランスクリプトームやプロテオームの情報と合わせることで、目的とする代謝物を産生するために必要な遺伝子の発現制御や酵素活性制御などの重要な情報を得ることができ、それを元に

介入治療に繋げることが可能となる。特に腸内マイクロバイオーマが生み出す代謝産物が全身に影響を及ぼすことから世界的にトピックとなっている。NGSによるメタゲノム解析と質量分析器によるメタボローム解析を組み合わせたオミクス解析による代謝物の網羅的解析が用いられ、腸内マイクロバイオーマが生み出す生理活性を持つ代謝産物が数多く報告されていきている。また、疾患と関連するメタボローム解析から、疾患と連動して増減する代謝物は疾患バイオマーカーとなるため、その同定と応用に関する研究が今後精力的に進められ、さらに患者個々のフェノーム情報とアウトカムデータを組み込む事が必須となるため、研究が大規模化していくことが予測される。

・フェノーム解析

従来のゲノム解析で、複雑な環境が健康状態にどのように作用し、心疾患、癌、糖尿病、アルツハイマー病といった疾患にどのような影響を与えるのかまで明らかにするのは難しい。それを補完する重要な役割をフェノミクス研究が担っていると考えられている。英国ではフェノーム研究の重要性を世界でもいち早く認識し、NIHRとMRCからそれぞれ500万ポンド出資され、インペリアル・カレッジ・ロンドン内にMRC-NIHR National Phenome Centre が2012年に設立された。健常者と患者の大規模な代謝物のフェノタイプピングが行われ、代謝物質の物理化学的研究の探索や、マイクロバイオーマを中心としたprecision medicine への応用の可能性を研究している。International Phenome Centre NetworkはMRC-NIHR National Phenome Centre によって2016年に発足され、英国、米国、中国、カナダ、カナダ、オーストラリア、日本、シンガポール、台湾の地域的・複数機関的ハブを備えた10以上の国際的パートナーが含まれている。遺伝子、環境因子、腸内細菌叢、食物、ライフスタイル間のダイナミックな相互作用を分析することで、癌、糖尿病、認知症など世界的な健康問題の課題に取り組み、ヘルスケアを広げ、疾病を予防・治療することを目的としている。

・医用画像を使ったバイオマーカー探索

質の高い医用画像が大量に取得可能となったことやビッグデータ、AI技術の進展により、医用画像から人間の眼には認識できない特徴に基づくバイオマーカーの探索が試みられている。コンピューター断層撮影(Computed Tomography: CT)や磁気共鳴画像診断装置(Magnetic Resonance Imaging: MRI)、病理切片などの画像所見をAIで解析し、病変の検出や良悪性鑑別を行うAI診断支援機器が開発されている。さらに、画像には遺伝情報にもとづくフェノタイプが描出されていると考えられることから、多数の画像特徴量を抽出、解析して、遺伝子変異やタンパク質発現などとの相関を調べるRadiomics (Radiogenomics、Radioproteomics、など)研究が行われている。低侵襲に得られる医用画像を活用して、疾患の早期発見や遺伝的性質にもとづく最適な治療法を提案するものである。大阪大 福間らは神経膠腫のMRI画像から、悪性度に関連するIDH(isocitrate dehydrogenase)遺伝子変異およびテロメラーゼ逆転写酵素プロモーター(telomerase reverse transcriptase promoter: TERT)遺伝子変異を予測する畳み込みニューラルネットワークモデルを構築した³⁰⁾。同様に非侵襲的に遺伝子変異を解析可能なリキッドバイオプシーとは異なり、医用画像に含まれる病変の解剖学的な位置や空間的広がりに関する情報をもつことが、予測精度の向上など付加価値を生む可能性が考えられる。

医用画像から遺伝子変異を予測する取り組みは、ホールスライドイメージ(whole slide image: WSI)技術を活用したデジタルパソロジーの分野でも行われている。人間の目では認識できない形態学的特徴をAIで認識させ、分子病理学的特徴と関連付ける試みである。2017年にCoudrayらは、肺がん組織のHE染色

画像から組織型と10種類の遺伝子変異の同定を試み、そのうち6種類の遺伝子（STK11、EGFR、FAT1、SETBP1、KRAS、TP53）の変異が予測可能であることを示した³¹⁾。大腸がん組織のHE染色ホールスライドイメージからMSIを解析する深層学習モデルも報告されている³²⁾。2021年にはEU Innovative Medicines Initiative (IMI) が、新しいコンソーシアムによりAI開発を目的とした大規模病理画像リポジトリの構築を目指したプロジェクト「BIGPICTURE」を開始、6年間で7,000万ユーロが投資される。

遺伝子解析は、実施可能な施設に限られ、時間とコストを要することが課題とされる。医用画像の特徴量抽出により遺伝的性質に関するバイオマーカー探索により、簡便で安価に診断、治療選択などが可能なシステム開発が望まれる。

2.1

[注目すべき国内外のプロジェクト]

・ All of Us 計画 (米国)

米国では、より効果的ながん治療法開発のため、NIHが100万人規模のボランティアからなるAll of Us programが進められている。研究コホートを創設し、参加者の遺伝子や生活習慣など各種情報をデータベース化するなど、Precision Medicineを基準とした取り組みが行われ、国策として推進している。この研究コホートの構築やがん遺伝学研究に必要なインフラ整備のために、既存の研究コホート、患者団体、および民間部門との強力なパートナーシップを築いている。運営には医療研究機関、研究者、財団、プライバシーの専門家、医療倫理学者、および企業人材を招集しており、ビッグデータを扱う上で人工知能やディープラーニングのスケールアップの必要性を提言している。この動きは、製薬会社や医療機関以外の周辺産業（IT 関連企業・医療機器メーカー・民間保険会社など）も含め、新たな経済効果をもたらすものと予想される。

・ CARDIoGRAMplusC4D (Coronary ARtery Disease Genome wide Replication and Meta analysis (CARDIoGRAM) plus The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics) consortium

冠動脈疾患のリスク遺伝標的を探るために設立された多施設大規模の冠動脈疾患国際コンソーシアムである。英国、米国、ドイツ、アイルランド、スウェーデン、フィンランド、フランス、イタリア、ギリシャ、レバノン、パキスタン、カナダ、韓国の13カ国で6万人の冠動脈疾患患者と13万人の正常人を対象にゲノムワイド遺伝体メタ分析研究が行われ、ヨーロッパ人とアジア人で冠動脈疾患に影響を及ぼす15個の遺伝標識が初めて報告され、同時に104の遺伝標識が複合的に冠動脈に与える影響力も指摘されている。冠動脈疾患に関する世界最大のゲノム研究である。

・ CIRCULATE-Japan

2019年に厚生労働省から「全ゲノム解析等実行計画」(第1版)が発出され、日本でも、次期ゲノム医療のための研究プロジェクトが始動する。その中で、早期の臨床応用を目指し、リキッドバイオプシーがすすめられる。外科治療が行われる大腸がん患者に対し、リキッドバイオプシーによるがん個別化医療の実現を目指すプロジェクト「CIRCULATE-Japan」が立ち上がった。国内外約150施設の協力を得て、術後微小残存病変を対象にした医師主導国際共同臨床試験である。参画企業はEPSホールディングス社、エスアールエル社、TeDaMa社、ファルコバイオシステムズ社、Natera社である。Natera社は開発中の血液を用いた微小残存腫瘍検出専用の遺伝子ミニパネル検査Signatera™ アッセイを提供する。

・ Immunophenotyping Assessment in a COVID-19 Cohort (IMPACC)

米 NIH は、COVID-19 の確定症例または推定症例で入院した最大 2,000 人の成人の免疫プロファイルを作成することを目的とした臨床試験 (IMPACC) を開始した。IMPACC 研究では、米国内の 10 の医療センターで COVID-19 患者が登録され、研究者は入院中から感染後の 1 年間に渡って、臨床、分子、プロテオミクス、その他の様々なデータを収集している。入院後 28 日間に採取された血液と気管内吸引液中の免疫細胞集団とその活性化状態を調べるため、Fluidigm 社の CyTOF プラットフォームが使用される。また 12 ヶ月間に採取された血液サンプル中の免疫細胞集団とその活性化状態も調べる。本研究では、Olink Potentomics 社の PEA アプローチを用いて、12 ヶ月間の追跡調査期間中、免疫機能の循環タンパク質マーカーを測定する。

(5) 科学技術的課題

リキッドバイオプシーによる早期診断のアプローチは、国内外の企業が承認・申請を目指して進められている。CTC の存在割合は非常にまれであり、早期癌や転移の初期では検出されないことが多く、早期診断やサーベイランスの有用性はまだ限定的である。cfDNA は腫瘍由来と正常組織由来のものが混在するが、腫瘍含有割合 (S/N 比) の算出は、リキッドバイオプシーの分析性能評価に必須である。海外ではサイズセクションやメチル化解析を用いた、S/N 比算出が試みられている。

NGS を用いたリキッドバイオプシーでは、希少なサブクローンの解析は技術的に難しく、特に bTMB についてはカバー領域が不足すると過小評価、複数の腫瘍領域を有する症例ではより大きな突然変異数を示すことが知られている。また SNV と比べ Indel の新抗原としてのパワーが高い³⁴⁾ ため、その補正を可能にする TMB 解析プラットフォームに期待が寄せられる。また、免疫チェックポイント阻害薬治療中の pseudoprogression の判断等にリキッドバイオプシーを用いているが、その実用化にも期待が寄せられる。高感度化のための Safe-SeqS (Safe-sequencing system)、Duplex Sequencing、CAPP-Seq (Cancer personalized profiling by deep sequencing)、NOIR-SS (non-overlapping integrated read sequencing system)、Digital Sequencing 等においては、低頻度アレルの判定にエラー抑制アルゴリズムが用いられるが、その方法については、企業による独自のアルゴリズムが用いられており、ブラックボックスである。NGS を用いたリキッドバイオプシーに関する技術開発は、海外に比べて日本では非常に遅れている。一般的に、NGS によるリキッドバイオプシーでは、copy number variant の検出感度が悪く、その改善が必要である。サンプリングノイズによる低 AF 突然変異の検出には技術的な限界があり、数千コピーしか含まない血漿数 mL の分析では、分析感度が約 1/1000 を超えても高感度のメリットは得られない。したがって、大量の cfDNA を得る血漿分離交換法、cfDNA を結合するインプラントデバイスの開発が海外ではすすめられている。

プロテオミクスにおいて、質量分析は未知のものを見つける点では魅力的であるが、血漿プロテオミクスにおける感度や定量の再現性、スループットなどの課題は未解決のままである。高感度化やスループットを向上させながら抗体もしくはアプタマーを使った技術が主流になるとと思われる。

(6) その他の課題

新しい、バイオマーカー、特にリキッドバイオプシーを用いたバイオマーカーの臨床応用に関しては、薬剤の適用に関わるコンパニオン診断薬の場合には、異なる診断薬が複数存在する場合の標準化が重要な検討課題である。技術的検証をより重視するため欧州 Cancer-ID、欧州液体生検アカデミー (European Liquid Biopsies Academy (ELBA))、欧州液体生検協会 (European Liquid Biopsy Society (ELBS)) のネッ

トワークなどのプロジェクトが開始されている。TMBについては、免疫チェックポイント阻害薬のコンパニオン診断薬としての役割が期待されていることから、TMBの標準化は、リキッドバイオプシーのみならず、組織サンプルを用いる際にも必要であり、米国でもFriends of Cancer Research TMB Harmonization Projectにおいて、フェーズI試験として、診断プラットフォーム間でのTMB定量化のばらつきのin silico評価を行いTMBをハーモナイズさせるためのガイドラインを提唱した³⁵⁾が、bTMBは含まれていない。日本では、標準化に向けたアプローチは進められてこなかった。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	→	- 全ゲノム解析が進められる中で、早期の臨床応用としてリキッドバイオプシーが取り上げられた。 - 疾患オミクスの基盤となるナショナルバイオバンクプロジェクトが進行中である。大学においても臨床研究推進のため、独自のバイオバンク事業を立ち上げる動きがある。 - 社会インフラも含めてデジタル化が遅れているため、ビッグデータの収集が容易ではない。
	応用研究・開発	○	→	- 多数の国内企業によるリキッドバイオプシーを用いた診断薬の承認に向けた開発研究がすすめられている。OncoBEAM™※2 RAS CRC キットが承認された。 - CIRCULATE-Japanが開始された。 - バイオバンクにて収集した臨床情報およびゲノム情報を活用して、創薬ターゲットを探索するためにアカデミアと企業の産学連携による共同研究を行う動きが出てきている。 - 新規診断薬については審査基準が欧米とは大きく異なっていて成功例があまりなく、国内だけでは市場が小さいことは課題。また標準化などは避けて通りたい風潮がある。
米国	基礎研究	◎	↗	- LDTが認められており、アカデミア発の診断薬開発が活発である。 - LBxの全ゲノム解析がすすんでいる。 - NIH、NPO法人、健康保険組合が連携し、78,000人分の遺伝情報と医療情報が全世界の研究者に公開された。 - 相変わらず世界をリードしている大学は多い。
	応用研究・開発	◎	↗	- 臨床応用にむけてのガイドラインの整備、上旬化のためのコンソーシアム等の体制整備が進んだ。 - 産官学連携モデルとしてAccelerating Medicines Partnership (AMP) が2014年から開始され、多因子疾患のゲノム研究により、有望な治療標的を同定して創薬へと繋げることを目的に活動している。 - 大学の基礎研究成果をスタートアップ企業に繋げる活発な投資が続き、新しい技術が絶え間なく登場してきている。 - 大手診断薬会社は発展を続けている。
欧州	基礎研究	○	↗	- CANCER-ID プロジェクト等大きな研究プロジェクトが開始されている。網羅的メチル化解析が進んでいる。 - バイオバンク活動が盛んでUK Biobankなど規模が大きいものもある。Biobankを起点にした研究活動も多い。

2.1

	応用研究・開発	○	↗	・ リキッドバイオプシに関するコンソーシアムなどが結成され、臨床応用を見据えたアプローチが戦略的にすすんでいる。 ・ 北欧などでは伝統的にタンパク質系の応用開発に強みがある。 ・ プレジジョンメディシンの実現を将来の Health research において最も革新的な領域の1つと位置づけている。 ・ UK 政府は3億ポンドを投じて、総計10万人におよぶがん患者あるいは希少疾患患者の全ゲノム配列情報を取得し、国民保険サービス (National Health Service) において将来的にゲノム情報を使用する予定である。
中国	基礎研究	◎	↗	・ 新型コロナに関する研究発表においても米国と共に世界をリードしていてゲノム解析関連では今や中国から目を離せない。 ・ 法律でゲノム試料の国外持ち出しを禁止し、疾患ゲノム解析研究を進めている。
	応用研究・開発	◎	→	・ 国内企業のバイオベンチャーにより、内製化をすすめている。TMB 測定用のミニパネルの開発がすすめられている。 ・ 米中争いによってIT関連企業だけでなくBGI社も影響を受ける可能性が出てきている。
韓国	基礎研究	○	→	・ 新型コロナ騒動で韓国はPCR検査も社会インフラのデジタル化も日本よりはるかに進んでいることが明白となった。ビッグデータ収集と活用の一環としてSamsung社などIT企業からの資金流入もあり、基礎研究も活発に行われている。 ・ バイオバンクプロジェクトを全国的に展開しており、約60万人分の試料を収集している。
	応用研究・開発	△	→	・ Nuribio社のctDNA遺伝子解析キットPROMER™などリキッドバイオプシーの診断薬開発が盛ん。 ・ 新型コロナ不況と米中の争いによる景気低迷の影響が大きい。 ・ 2014年から開始された8年間にわたる省庁横断的なプログラムの分野として、プレジジョンメディシンのための診断法、治療法の開発が挙げられている。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDSの調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

参考・引用文献

- 1) Sunami, K. et al., "Clinical practice guidance for next-generation sequencing in cancer diagnosis and treatment (Edition 1.0)", *Cancer Sci* 109 (2018) : 2980-2985. DOI : 10.1111/cas.13730.
- 2) Kawamura, T. et al., "Rebiopsy for patients with non-small-cell lung cancer after epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor failure", *Cancer Sci* 107 (2016) : 1001-1005. DOI : 10.1111/cas.12963.
- 3) Ashworth, TR. et al., "A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen

in the blood after death” *Aust Med J.* 14 : (1869) : 146–7.

- 4) Heitzer E. et al., “Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies”, *Genome Medicine* 5 (2013) : 73-83. DOI : 10.1186/gm477.
- 5) Alix-Panabières, Catherine., and Pantel, Klaus., “Challenges in circulating tumour cell research”, *Nat Rev Cancer* 14 (2013) : 623-31. DOI : 10.1038/nrc3820.
- 6) Wu J. et al., “Tumor circulome in the liquid biopsies for cancer diagnosis and prognosis”, *Theranostics*. 10, no. 10 (2020) : 4544-4556. DOI : 10.7150/thno.40532.
- 7) 野村雅俊他「大腸がん」『perspective』4巻3号 (2019) : 63, https://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0089_0403 (2021年2月4日アクセス) .
- 8) Tanaka, Fumihiko et al., “Circulating Tumor Cell as a Diagnostic Marker in Primary Lung Cancer”, *Clin Cancer Res.* 15, no. 22 (2009) : 6980-6. DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-09-1095.
- 9) Naito, Tateaki. et al., “Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells in Patients with Small Cell Lung Cancer.” *J. Thorac Oncol.* 7, no. 3 : 512-9 (2012) . DOI : 10.1097/JTO.0b013e31823f125d.
- 10) Joseph Sparano, et al., "Association of Circulating Tumor Cells With Late Recurrence of Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer", *JAMA Oncol.* 4, no.12 (2018) : 1700-1706. DOI : 10.1001/jamaoncol.2018.2574.
- 11) GT Budd, et al., "Circulating Tumor Cells versus Imaging—Predicting Overall Survival in Metastatic Breast Cancer." *Clinical Cancer Research* 12, no. 21 (2006) : 6403-6409. DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-05-1769.
- 12) Smerage, Jeffrey, B. et al., “Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer : SWOG S0500”, *J. Clin Oncol.* 32, no. 31 (2014) : 3483-9. DOI 10.1200/JCO.2014.56.2561.
- 13) Mandel, Paul. and Metais, P. “Les acides nucleiques du plasma sanguine chez l’homme”, *CR Acad Sci Paris* 142, no. 3-4 (1948) : 241–3.
- 14) Leon SA et al., “Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy.” *Cancer Res.* 37 (1977) : 646–50.
- 15) Baselga J, Im SA, Iwata H, et al., “Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2) : a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial”, *Lancet Oncol.* 18, no. 7 (2017) : 904-16.
- 16) Odegaard J.I. et al., *Clin Cancer Res.* 24, no. 15 (2018) : 3539-3549. DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-17-3831.
- 17) Clark TA, Chung JH, Kennedy M, et al., “Analytical Validation of a Hybrid CaptureBased Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Genomic Profiling of Cell-Free Circulating Tumor DNA.”, *J Mol Diagn* 20, no. 5, 2018 : 686-702. DOI : 10.1016/j.jmoldx.2018.05.004.
- 18) Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, et al., “Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing”, *Proc Natl Acad Sci USA.* 108, no. 23 (2011) : 9530-5., *PLoS*

2.1

- One*. 13, no. 3 (2018) : e0194630. doi : 10.1371/journal.pone.0194630. eCollection 2018.
- 19) Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, et al. “Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA.”, *Nat Biotechnol*. 34, no. 5 (2016) : 547-55. DOI : 10.1038/nbt.3520.
- 20) Abbosh, Christopher. et al., “Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution”, *Nature* 545, no. 7655 (2017) : 446-451. DOI : 10.1038/nature22364.
- 21) Raoul Charles Coombes et al., “Personalized Detection of Circulating Tumor DNA Antedates Breast Cancer Metastatic Recurrence”, *Clin Cancer Res.*, 25, no. 14 (2019) : 4255-4263. DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-18-3663.
- 22) *JAMA Oncol*. Published online July 9 (2020) . DOI : 10.1001/jamaoncol. 2020. 2295
- 23) Valadi, Hadi. et al., “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells”, *Nat Cell Biol*. 9, no. 6 (2007) : 654-9. DOI : 10.1038/ncb1596.
- 24) Willis J, et al., “Validation of Microsatellite Instability Detection Using a Comprehensive Plasma-Based Genotyping Panel”, *Clin Cancer Res*. 25, no. 23 (2019) : 7035-7045. DOI : 10.1158/1078-0432.CCR-19-1324.
- 25) Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, et al. “Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab”, *Nat Med*. 24, 9 (2018) : 1441-8. DOI : 10.1038/s41591-018-0134-3.
- 26) Lau, T.K. et al., “Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA : review of 1982 consecutive cases in a single center”, *Ultrasound Obstet Gynecol* 43, no. 4 (2014) : 254-264.
- 27) Lo, Dennis, Y. M. et al., “Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver transplant recipients”, *Lancet* 351, no. 9112 (1998) : 1329-30, Doi: 10.1016/s0140-6736 (05) 79055-3
- 28) *Kidney360* October 2020, 1 (10) 1118-1123; DOI : 10.34067/KID.0003512020.
- 29) Crigna, A.T., Samec, M., Koklesova, L. et al. “Cell-free nucleic acid patterns in disease prediction and monitoring—hype or hope?”. *EPMA J*. 11, 603–627 (2020) . DOI : 10.1007/s13167-020-00226-x.
- 30) Fukuma, R., Yanagisawa, T., Kinoshita, M. et al. Prediction of IDH and TERT promoter mutations in low-grade glioma from magnetic resonance images using a convolutional neural network. *Sci Rep* 9, 20311 (2019) . DOI : 10.1038/s41598-019-56767-3.
- 31) Coudray, N., Ocampo, P.S., Sakellaropoulos, T. et al. Classification and mutation prediction from non-small cell lung cancer histopathology images using deep learning. *Nat Med* 24, 1559–1567 (2018) . DOI : 10.1038/s41591-018-0177-5.
- 32) Yamashita R. et al., “Deep learning model for the prediction of microsatellite instability in colorectal cancer : a diagnostic study”, *Lancet Oncol*. 22, no. 1 (2021) : 132-141. DOI : 10.1016/S1470-2045 (20) 30535-0.
- 33) Best, M.G. et al., “RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer,

2.1

俯瞰区分と研究開発領域
健康・医療

Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics”, *Cancer Cell* 28 (2015) : 666-676. DOI : 10.1016/j.ccell.2015.09.018.

34) Fenizia, F. et al., “Measuring tumor mutation burden in non-small cell lung cancer : tissue versus liquid biopsy”, *Transl Lung Cancer Res* 7 (2018) : 668-677. DOI : 10.21037/tlcr.2018.09.23.

35) Merino, D.M. et al., “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, (2020) : e000147. DOI : 10.1136/jitc-2019-000147

2.1