

総 説

消化器癌患者における循環細胞外遊離核酸の臨床応用 —液体生検（リキッドバイオプシー）の有用性—

市 川 大 輔

山梨大学医学部外科学講座第一教室

要 旨：近年の分子生物学的解析技術の発展に伴い、癌の包括的な理解が進んできた。これら基礎的検討によって得られた知見と臨床現場をつなぐ鍵として、担癌患者の末梢血液中の遊離核酸が注目されている。これら遊離核酸は、担癌患者では、正常細胞に加えて腫瘍細胞からも壊死やアポトーシスを介して血液中に放出され、一部の核酸については能動的分泌も報告されている。生検や切除標本を用いた通常の組織検査と対比して、血液から組織特性を知る点で、液体生検とも呼ばれ、癌の早期発見、予後・治療効果予測、また、リアルタイムの腫瘍動態の把握など、様々な臨床応用が期待されている。一方で、その殆どが単施設からの報告であり、今後は多施設での大規模な臨床試験なども行われるものと思われる。今後は、精密医療（プレジジョンメディシン）として、液体生検を基にした治療方針の決定が行われる時代が到来することを期待する。

キーワード 消化器癌, 液体生検, 遊離核酸, プレジジョンメディシン

I. はじめに

以前より人体の末梢血液中に遊離した核酸が存在することは知られていた¹⁾。担癌患者にも末梢血液中の細胞外循環遊離 DNA (Circulating cell-free DNA; cfDNA) の存在が報告され²⁾、Sorenson らは、膵臓癌患者の末梢血液中の腫瘍由来 DNA (Circulating tumor DNA; ctDNA) を用いて原発巣と同一の KRAS 遺伝子の異常を検出し、その診断的有用性を報告した³⁾。近年、DNA のみならず mRNA や microRNA など、他の遊離核酸も検出可能であることや、それらを用いた新たな臨床的有用性も報告されている。

癌診療以外への有用性も報告されており、移植による急性拒絶反応や薬剤による臓器障害、

また、心筋梗塞の早期診断などへの応用も報告されている⁴⁾。一方、妊婦母体血液中の胎児由来 cfDNA を用いた臨床応用では、ダウン症などの出生前診断や、理論的には性別の診断等にも応用可能である⁵⁾。

癌診療においては、採血のみで腫瘍内の分子生物学的異常の把握が可能になること、また、刻々と変化する腫瘍進化の過程をリアルタイムに繰り返し解析ができることもあり、液体生検 (Liquid biopsy) として、近年、注目を浴びている。臨床応用としては、1) 腫瘍の早期診断や、2) 予後 (治療効果) 予測、3) 腫瘍動態モニタリング、4) 精密治療 (Precision medicine) の開発、などが期待されている。また、近年の研究において、これら循環血液中の遊離核酸の一部がエクソソーム等の小胞体の中に包み込まれることで、極めて安定した状態で存在することも確認され⁶⁾、新たな治療への展開なども期待されている。本総説では、血液中に循環する

cfDNA について、特に消化器癌患者への応用に焦点を絞り、現状と今後の臨床的有用性について概説する。

II. 検出可能な様々な異常

1. 循環 DNA

1) 定量性

担癌患者における cfDNA 量が健常者に比較して有意に高値であることは以前から報告されていた⁷⁾。Housekeeping 遺伝子を検索対象として、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で解析する極めて簡単な手法であるが、我々の検討でも、胃癌ならびに食道患者の cfDNA が健常者に比較して有意に高値であった。これら cfDNA は、主に壊死やアポトーシスを介して細胞外に遊離放出されると考えられているが、アポトーシスでは 180 ~ 190 bp 程度の断片化が起こるとされていることから、100 bp 前後と 250 bp 前後の長短 2 つの長さの DNA 断片を検出することで、その比 (DNA integrity) を測定することで、壊死を主とする ctDNA 断片のみの多寡の判定も理論的には可能である。我々の検討では、病期の進んだ胃癌患者で DNA integrity が高い傾向を認めたものの、他の臨床病理学的因子では顕著な差は認めず、臨床的有用性は限定的であった^{8,9)}。近年でも、更に精密となった解析手法による cfDNA 定量が試みられており、Fang らは胃癌患者を対象に *cyclophilin A* 遺伝子を対象に検索し、担癌患者で有意に高値であることと共に、高値であることが予後不良因子であることも報告している¹⁰⁾。

2) ウィルス関連

以前より肝炎ウィルスの検出は実臨床でも行われてきた分野であり、その他の癌関連ウィルスの検出が様々な形で試みられている。包括的ゲノム解析で、胃癌が 4 つのサブタイプに分類可能であることが報告され、その一つが EB ウィルスに関連するものであった¹¹⁾。全体の 10% 前後を占めるとされており、近年増加の一途をたどる上部胃癌に多く、新たな治療対象と

して知られている PD-L1/2 発現との相関も報告されており大変興味深い。様々な病期の胃癌患者 153 名の末梢血液ならびに癌組織を用いて EB ウィルス特異的 DNA 配列を用いた検出を試みたところ、原発癌組織内では 13.7%、血漿中では 9.2% の患者で EB ウィルスが陽性と判定された。血漿解析で陽性と判定された症例における術前・術後の比較検討では、胃切除後に EB ウィルス DNA の陰性化が確認され、腫瘍動態を反映する結果であった。術後フォローアップ期間中の検討では、術後に一旦陰性化した EB ウィルス DNA が術後 2 年目に再陽転化し、後の画像診断で胸膜播種再発が確認された症例を経験した。本症例では、胸水サンプル中にも同様に EB ウィルス DNA が検出され、胃癌のこれらサブグループにおける有用性が示唆された¹²⁾。

3) ゲノム変異

現在、実用性の面から最も注目されているのがゲノム変異の検出である。

i) 早期診断

Cohen らは、221 名の Stage I・II 期の膵臓癌患者ならびに 182 名の健常者の末梢血を用いて、PCR 法による *KRAS* コドン 12 と 16 の解析結果を報告している。その結果、30% の患者で ctDNA の異常検出が可能であり、CA19-9 測定 (100 U/dl を絶対的な異常と定義) や幾つかの蛋白マーカーとの併用で約 2/3 の患者が診断可能であった。注目すべきは、末梢血液のみのスクリーニングで 20 mm 以下の比較的早期の膵臓癌患者でも約半分程度は検出可能であるということであり、実際のスクリーニング等での検証が待たれるところである¹³⁾。膵臓癌の早期発見に関しては、Berger らも前癌病変の一つとして知られる膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の患者における液体生検の有用性を報告している。IPMN の組織で異常が報告されている *GNAS* 遺伝子コドン 201 変異を対象に cfDNA を用いた解析を行い、約 7 割の患者で異常を指摘し得た。一方、*KRAS* については、膵臓癌患者では検出されるものの、IPMN 患者で

は検出されず、フォローアップ中の浸潤性膵臓癌への癌化のスクリーニングとしても有用である可能性が示唆されている¹⁴⁾。

次世代シーケンサーを用いた僅かな変異フラグメントの検出では、検出された異常が真の変異かシーケンスの読み取りエラーによるものかの判別が重要となる。Phallenらは、Targeted error correcting sequencing (TEC-Seq) というシーケンスエラーを出来る限り抑える手法を用いた担癌患者のcfDNA解析を報告している。大腸癌患者の解析では、他の癌腫に比較して mutant allele の頻度が高く、Stage IVでは殆どの症例で腫瘍特異的の遺伝子変異が検出され、mutant allele 頻度は殆どが1%以上であった¹⁵⁾。しかしながら Stage の早期の症例についてはスクリーニング法としての限界の報告もあり、今後は様々な蛋白バイオマーカー等と組み合わせた統合解析が必要と思われる¹⁶⁾。

ii) 術後フォローアップ

次世代シーケンサーによって原発巣の遺伝子異常が認識できれば、理論的に術後フォローアップへの応用が可能である。Hamakawaらは、原発巣の解析で *p53* 遺伝子異常を認めた外科手術症例において、術前 cfDNA 中に *p53* 遺伝子変異を検索し、経過中のそれら ctDNA 定量値と臨床所見との間に相関を認めたと報告している¹⁷⁾。Ueda らも 53 遺伝子を搭載した cancer panel を用いた解析で、食道癌患者 13 例中 11 例で少なくとも 1 つ以上の原発巣と同一の遺伝子変異が cfDNA でも認められ、*p53* 遺伝子を含む 4 つの遺伝子変異の組み合わせで、sensitivity 78.9%, specificity が 100% であったと報告している¹⁸⁾。大腸癌患者でも cfDNA を用いた術後フォローアップに関する有用性が報告されている。Sholer らは、*KRAS* や *BRAF* 遺伝子のホットスポットに加えて、次世代シーケンサーを用いた原発巣の解析から患者毎に特異的な平均 4.2 のテラーメードバイオマーカー解析を行ったところ、全再発症例において、画像検査による再発診断に先立って液体生検での異常が検出された。肉眼的根治切除が行われ

た症例では、術後に ctDNA が一旦は陰性化するが、再発症例の約 6 割の症例において術後 3 か月以内に陽転化していた。また、術後 3 か月以内の陽転化が、局所進行癌や Stage IV 症例でも有意な予後因子であったと報告している¹⁹⁾。

4) リアレンジメント検出 (メタペア解析)

次世代シーケンサーによって得られた DNA 断片の両端の配列情報の網羅的解析から断片内のリアレンジメントを検索する手法であり、Leary らの報告によると、大腸癌や乳癌では検索された全ての腫瘍内で多数のリアレンジメントが発見された。理論的には、これらリアレンジメントの break point を含む PCR primer を設定することで、微量なサンプルでの個々の腫瘍特異的 product の検出が可能である²⁰⁾。我々も、これらメタペア解析が臨床的に有用であった症例を経験した。患者は 27 歳女性で、検診で指摘された胃腫瘍に対する加療を目的として紹介となった。内視鏡的にはカルチノイド腫瘍などの粘膜下腫瘍が疑われる病変であったが、組織検査では滑膜肉腫との診断であった (図 1A)。転移病変の可能性が高いと判断し、全身の検索を行ったが他の病変は指摘できず、患者との相談のうえ腹腔鏡下胃局所切除を施行した。滑膜肉腫は染色体転座 t(X;18)(p11;q11) を有し、各々の染色体に由来する SYT 遺伝子と SSX 遺伝子が融合したキメラ遺伝子の存在が確認されている。そこで本症例の切除組織を用いて転座の break point を同定し、この break point を挟む形でプライマーを設計し、組織におけるキメラ遺伝子の存在を確認した (図 1B)。また、これらプライマーとプローブを用いた cfDNA 解析で、cfDNA にも同様のキメラ遺伝子断片を確認した。同キメラ遺伝子断片は、対照として行った健常者の解析では認めず、術直後の cfDNA でも認めなかった (図 1C)。本症例の術後フォローアップ中も同キメラ遺伝子断片は検出されず、本疾患が極めて稀ながらも胃原発の滑膜肉腫であり、局所切除によって根治し得た症例である可能性が示唆された²¹⁾。

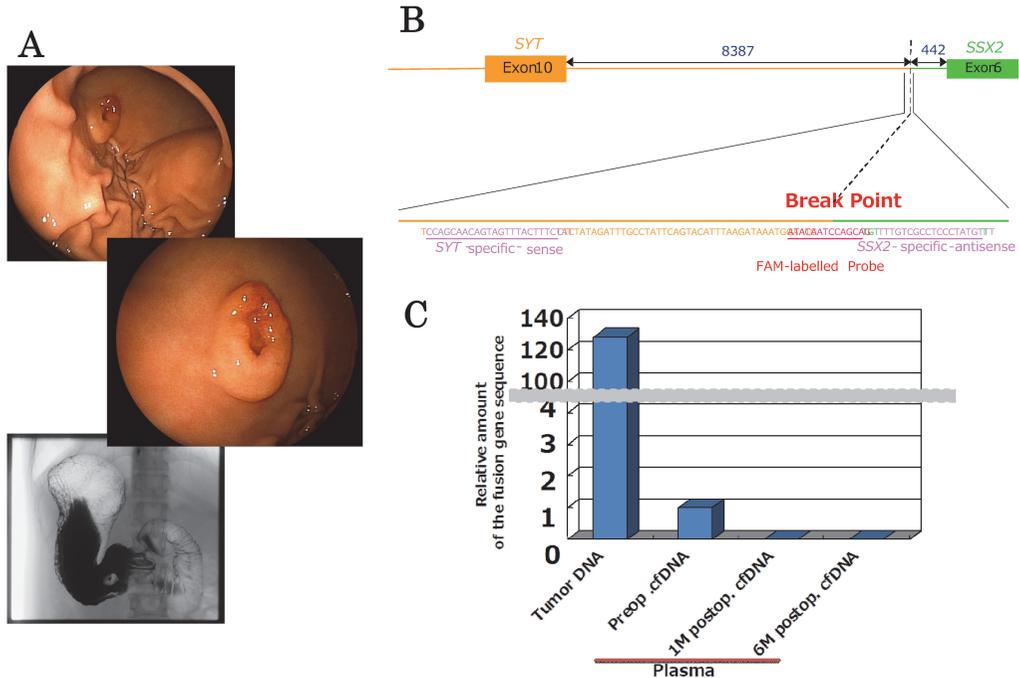


図1. 液体生検によるメタペア解析
 A: 胃角部大弯側に中心潰瘍を伴う隆起性病変
 B: 転座部位を挟んでプライマーを設計し、転座点をまたいでプローブを作製
 C: 特異的プライマーとプローブを用いてリアレンジメント DNA 断片を cfDNA でも検出

5) エピゲノム異常

腫瘍特異的メチル化 DNA の検出も試みられている。Liらは、BEAMingの技術を用いて、大腸癌患者の *Vimentin* 遺伝子の微量のメチル化 DNA 断片の定量的検出を試み、比較的早期の症例でも ROC 解析で高い AUC を報告している²²⁾。単一遺伝子の解析では限界があることから、大腸癌における5つの特異的バイオマーカーを設定し、適切なカットオフ値を設定したところ約3/4の患者が陽性であったと報告も認める。これらエピゲノム異常はゲノム異常に比較して cfDNA に占める割合も高いことが多く、臨床経過を反映する安定したバイオマーカーになり得ると考察されている²³⁾。

2. 循環 RNA

1) mRNA

mRNA は血漿中に存在する RNase によって容易に分解されるため、検出自体が困難とされていた。しかしながら、Miuraらは、肝細胞癌患者の血液中の mRNA を抽出して、*human telomerase reverse transcriptase(hTERT)*mRNA や *alpha-fetoprotein(AFP)*mRNA の検出に成功し、その診断的有用性を報告している²⁴⁾。我々も胃癌患者の末梢血液を用いて、*hTERT*mRNA など幾つかの mRNA の検出を試みたところ、頻度としては低いながらも実際に検出可能であった。ただ、サンプリングや保存方法などに影響を受けやすいため、その定量性等も含めた臨床応用には更なる検討が必要である²⁵⁾。

2) microRNA (miR)

miR については、細胞の壊死やアポトーシ

スを介する血中への遊離の他に、エクソソーム (exosome) に内包された状態で細胞外へ能動的に分泌され²⁶⁾、蛋白との複合体形成などによっても安定した状態で血液中にも存在していることが報告されている^{27,28)}。これら細胞外 miR は、他の癌細胞や支持細胞、また免疫細胞などにも取り込まれ、受け側細胞でも機能を有する可能性が示唆されており、近年、診断のみならず治療への応用も含めて注目を浴びている²⁹⁾。

我々は、胃癌や食道癌組織サンプルの解析で発現異常が報告されている miR について、担癌患者の末梢血液を用いた解析を行った³⁰⁻³²⁾。胃癌患者では、癌組織において高発現している miR-21 や miR-106b などが血漿中でも健常者に比較して有意に高値であり、それらが術直後に陰性化することも確認し、腫瘍動態を反映するバイオマーカーになる可能性が示唆された³⁰⁾。一方、癌細胞中の miR プロファイリングと細胞外遊離 miR のプロファイリングに違いがあることも報告されているため、血漿中の発現に重きを置いた探索アプローチも行った。胃癌患者を対象に、術前の血漿と根治切除後の血漿を用いた miR microarray 解析を行うことで、胃癌患者に特異的な血漿中 miR を抽出し、多数例の胃癌患者の解析から胃癌患者に特異的な miR-451, miR-486 を同定した³³⁾。しかしながら、これら血漿中 miR が再発時の血漿サンプルで必ずしも高値を示さないことも確認され、今後の実臨床への応用には更なる検討が必要と思われた。現在、様々な癌種で同様の解析が行われ、疾患特異的 miR の有用性が報告されているが、本邦では、NEDO 研究開発プロジェクトとして、13 種のがんや認知症を対象に「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発」が行われており、近々、数万人規模の解析結果が公表される予定である³⁴⁾。

Ⅲ. 精密医療 (Precision medicine) への応用

液体生検による血液中の遊離核酸を用いて、

特定の治療薬に対する感受性を予測する試みが行われている。現時点では、ctDNA を用いた解析が中心であるが、今後は他の核酸を用いたバイオマーカー開発も待たれるところである。

1. 胃癌に対する HER2 感受性診断

HER2 陽性胃癌に対する抗 HER2 療法が保険承認され、胃癌に対する薬物療法を開始する前に生検や切除標本を用いた HER2 発現 (*HER2* 遺伝子増幅) の評価が必須である。しかしながら、同一腫瘍内での不均一性や、原発巣と転移巣との不均一性 (空間的 Heterogeneity) が、抗 HER2 療法の効果予測を困難にしている。また、再発時の治療では、原発巣切除時の組織標本を用いた評価が行われることが多く、癌細胞の分子生物学的経時変化 (時間的 Heterogeneity) は考慮されていない。これらの背景をもとに、我々は、cfDNA 断片を用いた液体生検による低侵襲かつ高感度なりアルタイム HER2 遺伝子増幅解析法を開発した。担癌患者における cfDNA 量の増加や染色体異数性を克服する目的で、胃癌で増幅を認めない対照遺伝子を設定し、*HER2* 遺伝子と対照遺伝子との比で増幅レベルを評価した。これら cfDNA 断片を用いた *HER2* 増幅解析が、組織における HER2 評価と相関を示すことを確認した後、抗 HER2 療法の治療効果との対比を行ったところ、同じ HER2 陽性胃癌の中でも、血漿 HER2 高値群の治療効果が低値群に比較して有意に良好であり、同解析手法が抗 HER2 療法の効果予測バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された³⁵⁾。また、Droplet digital PCR 法を用いることで、更に安定かつ高感度・高精度の測定が可能となり、再発例の解析では、手術標本では HER2 陰性胃癌と判定された症例の中に、少なからず HER2 の陽転化が疑われる症例が存在することも判明した。治療経過中に複数回の採血が可能であった症例では、病態の進行と共に血漿 HER2 比も上昇することが確認でき、抗 HER2 療法の適応となる可能性が示唆された³⁶⁾。今後は、再

発癌自体の HER2 発現の検証ならびに液体生検結果をもとにした治療の有用性を検討し、一方で、検査の実用化を目的とした技術開発を進めていく必要がある。

2. 大腸癌に対する EGFR 抗体療法

大腸癌治療ガイドラインでは、切除不能進行再発大腸癌に対する化学療法アルゴリズムの一次治療として多剤併用抗癌剤治療への抗 EGFR 抗体療法が推奨されている。しかしながら、EGFR の下流シグナルである RAS 遺伝子変異が抗 EGFR 抗体療法の負の効果予測因子となることが多数報告され、実臨床では抗 EGFR 抗体療法は RAS 野生型のみへの適応とされている³⁷⁾。しかしながら、野生型 RAS 症例においても、治療中に耐性を示すことがあり、様々な他の耐性メカニズムの存在や、RAS 変異株の出現、EGFR 遺伝子変異の獲得などが、獲得耐性機序として注目されている。Bottegowda らは、治療効果を認めた後に耐性を示した症例において、KRAS, NRAS, EGFR, PIK3CA 遺伝子のホットスポットについて cfDNA を用いた解析を行い、殆どの症例で耐性の原因となり得る遺伝子変異を検出したと報告している³⁸⁾。また、Sirabegna らは、抗 EGFR 抗体療法中の獲得耐性を示した大腸癌患者の治療経過中の cfDNA の解析で、治療耐性時に cfDNA 中に検出された KRAS 遺伝子変異が、他の治療法に変更後は速やかに低下し、抗 EGFR 抗体療法の再開で再上昇を認める現象を報告している³⁹⁾。抗 EGFR 抗体療法のリチャレンジの有用性を示唆する所見であり、今後の更なる検討を待ちたい。

3. その他

化学療法の感受性の効果判定や予測などに対する試みも始まっている。末梢血液中の ctDNA を検出し、治療早期の増減と治療効果の相関も報告され、治療開始後早期の効果判定への有用性が示唆されている⁴⁰⁾。我々も、術前化学療法を施行した食道扁平上皮癌症例の組織学的

に著効を示した症例と治療効果を認めなかった症例の術前血漿中 miR を用いた microarray 解析を施行し、治療効果の耐性と相関を示す miR-23 を同定した⁴¹⁾。しかしながら、その機序については不明な点が多く、更に正確な治療効果の予測バイオマーカーの開発に期待したい。

IV. 今後の展望

近年の解析技術の革新的な進歩により、微量サンプルを用いた解析が可能となった。一方で、極めて大量の情報処理も可能となり、癌組織の詳細かつ包括的な理解も進んでいる。今後は、癌の発生部位に基づく画一的な治療体系ではなく、個々の症例毎の分子生物学的特性に応じた治療を、その刻々と変化する腫瘍進化も考慮した上で治療戦略を立てる必要性が出てくるものと思われる。これらの時代背景の中、液体生検は、その低侵襲性から繰り返し施行可能であり、リアルタイムに腫瘍動態を把握し得る理想的な解析手法である。しかしながら、実臨床への応用を考えると、未だ多くの解決すべき問題点が存在する。解析前の標準化は必須であり、利用するのは血漿か血清か、また、最適なサンプル保存方法や核酸の抽出方法など、今後の多施設での大規模研究に期待したい。近い将来、液体生検の結果を基にした 1) 分子標的治療における患者選択や獲得耐性モニタリング、2) 化学療法の感受性予測や早期効果判定、などが行われる時代が到来するであろう。また、更に感度の高い解析手法の確立や腫瘍由来核酸の特異的検出によって、根治性判定や再発早期診断も可能になると思われる。一方で、近年、担癌患者の血球細胞への腫瘍からの情報伝達なども報告されており、更に進んだ俯瞰的な担癌状態の理解が進むことを期待したい。

文 献

- 1) Mandel P, Metais P: Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc

- Biol Fil, 142: 241–243, 1948.
- 2) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 37: 646–650, 1977.
 - 3) Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, *et al.*: Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 3: 67–71, 1994.
 - 4) Antonatos D, Patsilinos S, Spanodimos S, Korkonikitas P, Tsigas D: Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci*, 1075: 278–281, 2006.
 - 5) Lo YM, Chiu RW: Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annu Rev Genomics Human Genet*, 13: 285–306, 2012.
 - 6) Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T: Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*, 126: 1163–1172, 2016.
 - 7) Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, *et al.*: Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem*, 52: 1062–1069, 2006.
 - 8) Tomita H, Ichikawa D, Ikoma D, Sai S, Tani N, *et al.*: Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal cancer. *Anticancer Res*, 27: 2737–2741, 2007.
 - 9) Sai S, Ichikawa D, Tomita H, Ikoma D, Tani N, *et al.*: Quantification of plasma cell-free DNA in patients with gastric cancer. *Anticancer Res*, 27: 2747–2751, 2007.
 - 10) Fang WL, Lan YT, Huang KH, Liu CA, Hung YP, *et al.*: Clinical significance of circulating plasma DNA in gastric cancer. *Int J Cancer*, 138: 2974–2983, 2016.
 - 11) Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513: 202–209, 2014.
 - 12) Shoda K, Ichikawa D, Fujita Y, Masuda K, Hiramoto H, *et al.*: Clinical utility of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in patients with gastric cancer. *Oncotarget*, 8: 28796–28804, 2017.
 - 13) Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, *et al.*: Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114: 10202–10207, 2017.
 - 14) Berger AW, Schwerdel D, Costa IG, Hackert T, Strobel O, *et al.*: Detection of hot-spot mutations in circulating cell-free DNA from patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology*, 151: 267–270, 2017.
 - 15) Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, *et al.*: Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*, 9 pii: eaan2415, 2017.
 - 16) Cohen JD, Yuxuan LL, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, *et al.*: Detection of localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*, 359: 926–930, 2018.
 - 17) Hamakawa T, Kukita Y, Kurokawa Y, Miyazaki Y, Takahashi T, *et al.*: Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA. *Br J Cancer*, 112: 352–356, 2015.
 - 18) Ueda M, Iguchi T, Masuda T, Nakahara Y, Hirata H, *et al.*: Somatic mutations in plasma cell-free DNA are diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma recurrence. *Oncotarget*, 7: 62280–62291, 2016.
 - 19) Schøler LV, Reinert T, Ørntoft MW, Kassentoft CG, Árnadóttir SS, *et al.*: Clinical implications of monitoring circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 23: 5437–5445, 2017.
 - 20) Leary RJ, Kinde I, Diehl F, Schmidt K, Clouser C, *et al.*: Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Sci Transl Med*, 2: 20ra14, 2010.
 - 21) Ogino S, Konishi H, Ichikawa D, Hamada J, Shoda K, *et al.*: Detection of fusion gene in cell-free DNA of a gastric synovial sarcoma. *World J Gastroenterol*, 24: 949–956, 2018.
 - 22) Li M, Chen WD, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, *et al.*: Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol*, 27: 858–863, 2009.
 - 23) Barault L, Amatu A, Siravegna G, Ponzetti A, Moran S, *et al.*: Discovery of methylated circulating DNA biomarkers for comprehensive non-invasive monitoring of treatment response in metastatic colorectal cancer. *Gut*, pii: gutjnl-2016-313372, 2017.
 - 24) Miura N, Maeda Y, Kanbe T, Yazama H, Takeda Y, *et al.*: Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11: 3205–3209, 2005.
 - 25) Tani N, Ichikawa D, Ikoma D, Tomita H, Sai S, *et al.*: Circulating cell-free mRNA in plasma as a tumor marker for patients with primary and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res*, 27: 1207–1212, 2007.
 - 26) Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T: Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker

- for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101: 2087–2092, 2009.
- 27) Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, *et al.*: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 10513–10518, 2008.
- 28) Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, *et al.*: Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 5003–5008, 2011.
- 29) Ichikawa D, Komatsu S, Konishi H, Otsuji E: Circulating microRNA in digestive tract cancers. *Gastroenterology*, 142: 1074–1078, 2012.
- 30) Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, *et al.*: Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*, 102: 1174–1179, 2010.
- 31) Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Morimura R, *et al.*: Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 105: 104–111, 2011.
- 32) Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, *et al.*: Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 105: 1733–1740, 2011.
- 33) Konishi H, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Tsujiura M, *et al.*: Detection of gastric cancer-associated microRNAs on microRNA microarray comparing pre- and post-operative plasma. *Br J Cancer*, 106: 740–747, 2012.
- 34) 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構ホームページ: http://www.nedo.go.jp/activities/ZZJP_100082.html
- 35) Shoda K, Masuda K, Ichikawa D, Arita T, Miyakami Y, *et al.*: HER2 amplification detected in the circulating DNA of patients with gastric cancer: a retrospective pilot study. *Gastric Cancer*, 18: 698–710, 2015.
- 36) Shoda K, Ichikawa D, Fujita Y, Masuda K, Hiramoto H, *et al.*: Monitoring the HER2 copy number status in circulating tumor DNA by droplet digital PCR in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*, 20: 126–135, 2017.
- 37) 大腸癌研究会: 大腸癌治療ガイドライン医師用2016年版.
- 38) Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, *et al.*: Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, 6: 224ra24, 2014.
- 39) Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, *et al.*: Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*, 21: 795–801, 2015.
- 40) Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, *et al.*: Early Evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL Study). *Clin Cancer Res*, 23: 5416–5425, 2017.
- 41) Komatsu S, Ichikawa D, Kawaguchi T, Takeshita H, Miyamae M, *et al.*: Plasma microRNA profiles: identification of miR-23a as a novel biomarker for chemoresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7: 62034–62048, 2016.