

★シリーズ 最新のがん

リキッドバイオプシーの臨床実装

坂井 和子 西尾 和人

近畿大学医学部ゲノム生物学教室

Clinical implementation of liquid biopsy

Kazuko Sakai and Kazuto Nishio

Department of Genome Biology, Faculty of Medicine, Kindai University

抄 録

リキッドバイオプシーは血液検体などの液性検体を用いて検査する手法を称し、液性検体中に微量存在するがん由来の細胞や核酸を検査に供することで、低侵襲性かつ全身の状態を反映するなど、腫瘍組織検体を用いる検査とは異なる特徴を持った臨床的有用性が示されている。リキッドバイオプシーによる遺伝子検査は、検体採取に対する身体への負担が少ない検査であることから繰り返しの検査が可能であり、治療法の選択のみならず治療経過中のモニタリングにも有用であると考えられる。リキッドバイオプシーにおいて議論すべき点は、用いる検体種と検出手法である。血液検体から採取可能な検体種として、循環腫瘍細胞、エクソソーム、セルフリー RNA、セルフリー DNA が考えられる。いずれの検体種にも一長一短があるが、セルフリー DNA を用いたがん由来の遺伝子変異検査は体外診断薬としてすでに実用化されている。検出手法における課題として、液性検体中に微量にしか存在しない腫瘍由来の分子を検出するため、検出系の高感度化が求められてきた。加えて、腫瘍組織の大規模なゲノム解析が公表され、分子標的治療薬の感受性、耐性に関連する分子の報告が増えるにつれ、多数の遺伝子変異を同時に検出するマルチプレックス化が求められている。次世代シーケンズ解析技術の進歩によりこれらの課題は解決しつつあり、臨床応用として薬物療法の有効性の評価や耐性獲得あるいは再発リスクの早期予測に用いる臨床研究が進められている。

Key words: 循環腫瘍細胞, セルフリー DNA, エクソソーム, デジタル PCR, 次世代シーケンサー

はじめに

リキッドバイオプシーとは造語であり、主には、血液検体、胸水、腹水、尿、唾液、涙液等の液性検体を用いた検査を指す。がん研究分野においては、解析対象の中心は腫瘍細胞それ自身か腫瘍組織由来の核酸であり、循環腫瘍細胞、エクソソーム、セルフリー RNA、セルフリー DNA が考えられる。リキッドバイオプシーは侵襲性の高い生検 (バイオプシー) に比べて低侵襲であることから繰り返しのサンプル採取が可能であり、診断、治療効果予測、治療経過

中のモニタリング、抗がん薬等の POC (原理の証明) 等の臨床応用に用いられると考えられている。

1) 循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell, CTC)

循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell, CTC) は腫瘍組織由来のがん細胞であり、原発腫瘍や転移巣から脈管内に侵入するか受動的に血流中に放出されたものと考えられる。CTC の存在は、オーストラリアの内科医 Thomas Ashworth により1869年に最初に報告されたが、CTC の臨床的な意義は1990年代まで理解されていなかった。CTC は単細胞または細胞

クラスターとして、がん患者末梢血から単離でき、CTC 数はがん患者で、血液 10 mL 中に数細胞と非常に少なく、腫瘍の種類により異なっている。CTC を単離するためには、CTC の大きさおよびその他の生物物理学的特徴に基づいた複数の技術が用いられており、細胞膜上に発現するマーカーにより識別する手法、細胞の大きさやクラスター形成により分別する手法などがある。表面マーカーによる CTC 分取には、一般的に上皮細胞接着分子 (EpcAM), サイトケラチン (CK), CD45 が用いられ、EpcAM (+), CK (+), CD45 (-) によるソーティングにより CTC を単離する¹。がん種により表面マーカーは多様であり、CTC を非悪性上皮細胞と明確に区別するマーカーはまだ取り揃えられていない。細胞のサイズに基づく選択法では、CTC は正常な血液細胞よりも大きいということを利用している²。同アプローチを腫瘍特異的なマーカーに対する抗体カクテルによるキャプチャーする方法と併用することで、CTC 補足の効率を上げることができると考えられる。CTC 捕捉法として、Khoo らは、マイクロ流路プラットフォームに連結した微細加工を施した円錐型マイクロウェル内で培養した CTC を用いた方法を報告した³。彼らは、CTC クラスター形成能と抗がん薬の薬剤濃度の逆相関することを示し、CTC クラスターの多寡による薬剤感受性が予測できるという原理を推察している。CTC クラスターを濃縮せずに実施可能であるため、臨床現場に迅速なフィードバックが可能になると期待される。

CTC の利点として、生細胞として分取できることがあげられる。CTC を *ex vivo* で単離することにより、CTC からの初代継代培養株を樹立する試みや⁴、免疫不全マウスで CTC を増やすアプローチとして、転移性乳癌患者から得られた CTC を用いた腫瘍移植モデルが報告されている⁵。Hdgkinson らは、治療抵抗性を獲得した小細胞肺癌患者から得た CTC が免疫不全マウスで腫瘍を形成し、これらの CTC 由来腫瘍移植 (CTC derived explants, CDXs) モデルにおいて化学療法に対する感受性がドナー患者の治療反応性を反映することを示した⁶。CTC は DNA, RNA, タンパク質等の細胞成分を利用可能である。CTC から抽出した RNA を用いた遺伝子発現解析による腫瘍のプロファイリングも行われている⁷。このように、CTC 解析はその細胞数に制限があるものの、腫瘍組織と同様の解析が可能ない検体種である。

2) エクソソーム (Exosome)

細胞は、脂質二重膜に囲まれた微細小胞を細胞外に分泌することが知られている。放出された細胞外

小胞 (Extracellular vesicles, EV) は、2つのグループに分類することができる。一つは、細胞膜からの出芽により直接放出される微細小胞、二つ目は多胞体 (multivesicular body, MVB) が形質膜と融合する際にエクソサイトーシスにより浸出するエクソソームである。エクソソームは1987年に ohnstone らによって命名されたものであり⁸、いくつかの細胞タイプから細胞外空間および様々な体液中に放出される、大きさが 40–100 nm の EV である。エクソソームを放出する細胞として、血液細胞、血管内皮細胞、免疫細胞、血小板および、平滑筋細胞が知られている。エクソソームは、一般的には体液から密度勾配遠心分離法により分離される。あるいは、超遠心分離による分離、透過型顕微鏡による視覚化、あるいは CD63, CD9, CD81 などの膜貫通型タンパク質であるテトラスパニン系マーカーの存在に基づく選択も可能である⁹。エクソソームは細胞間の分子情報の交換に重要な役割を果たしているが、エクソソームにはタンパク質だけでなく、DNA, mRNA および miRNA などの広範囲にわたる核酸が含まれていることから、細胞の機能を変化させる可能性が示唆されている¹⁰。エクソソーム等の EV は、その含有物を考えると、がんバイオマーカーとしての利用が考えられる。さらに、エクソソームに内包される miRNA は脈管形成を刺激したり転移を促進させたりできることから、がんの進展に関与していると考えられている。体液からエクソソームを収集することにより、単離した mRNA を用いた遺伝子解析が可能になり、突然変異、スプライシングバリエント、融合遺伝子の検出、および遺伝子プロファイリングが可能である。

3) 血中循環 RNA (cell-free RNA)

1996年に、血中を循環する腫瘍関連 mRNA が悪性黒色腫患者の血液中から検出されたことが最初に報告され¹¹、その直後に、miRNA および長鎖のノンコーディング RNA (long noncoding RNA, lncRNA) が、がん患者の血中で特定された。miRNA は、エクソソーム、アポトーシス小体、タンパク質-miRNA 複合体、血小板で運搬され、由来する元の腫瘍の特徴を有すると考えられる。mRNA の血中プロファイルのマーカーとして、がん患者の血中には腫瘍プロファイルの特徴づける血小板 (tumor educated platelets, TEP) が含まれ、TEP mRNA は腫瘍のプロファイルを反映すると報告されている¹²。

4) セルフリー DNA (cell-free DNA, cfDNA) と循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)

cfDNA と ctDNA は共に血中に存在する核酸 (DNA) であるが、健常人においても cfDNA は存在するので、特にがん患者における腫瘍組織由来の循環血液中の核酸を特に ctDNA と呼ぶ。実際にはがん患者の血漿から核酸を抽出した場合、完全には正常組織由来の cfDNA を取り除けないことから、両者を明確に分けることができない。すなわち、腫瘍組織由来 DNA と正常組織由来の DNA の割合は不明であることが多い。一般に、健常人の cfDNA 濃度は血液 1 mL あたり 1-10 ng/ml で存在するとされる。一方、がん患者から得られる cfDNA 量は、健常人の cfDNA 量に比べて著しく多量であることから¹³、大部分は腫瘍由来であろうと考えられている。がん以外にも急性外傷、脳梗塞、移植、感染症により cfDNA 量は増加する。健常人における cfDNA の由来は、大半が造血細胞からであることが知られており、激しい運動により cfDNA は増加する。このような cfDNA や ctDNA の特徴を把握するによって、より正確な cfDNA を用いた遺伝子等の検査を実施することができると考えられる。

cfDNA は断片化した短い DNA として存在する。これはゲノム DNA が血中等に含まれるヌクレアーゼによる切断を受けるためと考えられている。正確な cfDNA の長さをシーケンスにより計測すると、最大ピークは166塩基対となる¹⁴。これは、ヌクレオソームに巻き付いた DNA (147塩基) とヒストン H1 に結合したリンカー DNA の和に相当する。尿にも cfDNA が存在することが知られている。不思議なことに、尿中に存在する cfDNA は血中と比べて断片化パターンが異なる。これは尿中でヌクレアーゼが高濃度に存在するからだと考えられている。がん患者由来の cfDNA は健常人の cfDNA に比べて若干短い。腫瘍移植マウスモデルでの cfDNA は134~144塩基対がピークの長さであると報告されている¹⁵。がん以外にも胎児の cfDNA や移植患者の非造血器由来の cfDNA も短いことが知られているが、何故、若干短いのかの原因は不明である。

cfDNA の消失のメカニズムは、ヌクレアーゼによる分解の他に腎により尿中へ排泄されるためと考えられる。また、肝臓や脾臓に取り込まれマクロファージにより分解される。一方、細胞膜や細胞外小胞、血中タンパク質に結合した cfDNA は安定化する。cfDNA の血中半減期は16分~2.5時間と報告されている。このように半減期が短いことから、腫瘍組織由来の ctDNA は腫瘍組織からアポトーシス、壊死

あるいは分泌作用により大量に継続的に血中に排出され、ctDNA は腫瘍のリアルタイム「スナップショット」であると考えられる。

5) デジタル PCR 技術の登場

cfDNA は血中に微量にしか存在しないことから、従来の遺伝子解析技術の高感度化が求められていた。デジタル PCR 技術の登場は、cfDNA の分子プロファイル解析の研究を活発化させる要因の一つとなった。デジタル PCR は、DNA 分子を多数のウェルに分配し、個々のウェル内で PCR を行うことにより、標準曲線不要かつ絶対定量可能な測定手法として開発された¹⁶。ウェルの数が多いほど、各ウェルに分配された DNA の中から、遺伝子異常を示すウェルを検出する確率が高くなり、検出感度は向上する (図 1)。我々が用いている QX200 Droplet Digital PCR システム (Bio-Rad) ではサンプルを20,000個のナノリットルサイズのドロップレットに分割する。ターゲット遺伝子を含むウェルは PCR 増幅によって陽性ウェルとして、ターゲット遺伝子を含まないウェルは陰性ウェルとしてカウントする。デジタル信号の 1/0 と同じく陽性ウェル (陽性比率) をカウントするので、リファレンスもしくはスタンダードサンプルとの比較を必要とせず、直接的な絶対定量を行うことができる。他のデジタル PCR システムとして、BEAMing 法 (シスメックス)、RainDrop Digital PCR システム (RainDance Technologies)、BioMark™ Digital Array (フリューダ イム)、QuantStudio™ 3D デジタル PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック) がある。RainDrop Digital PCR システムでは、1 サンプルあたり1,000万個の液滴を生成できる点が他を圧倒する。デジタル PCR は、末梢血中の微量な DNA からの遺伝子異常変異の検出が可能であり、QX200 Droplet Digital PCR システムを用いた *EGFR* 遺伝子変異の検出感度は、0.03%に達する。

6) がん患者のリキッドバイオプシーの臨床応用例—肺癌

多くのがんは、各種の刺激、環境などにより遺伝子変異 (体細胞変異) 等の遺伝子の変化が蓄積することにより発生する。それらの遺伝子変化を標的とする治療薬を分子標的薬といい、特定の分子標的薬と 1 対 1 の関係になる特定の遺伝子変化に対する検査薬をコンパニオン診断薬という。例えば、*EGFR* 遺伝子変異を有する非小細胞肺癌に対しては、ゲフィチニブやエルロチニブなどの *EGFR* 特異的なチロシンキナーゼ阻害薬が使用される。*EGFR* チロシ

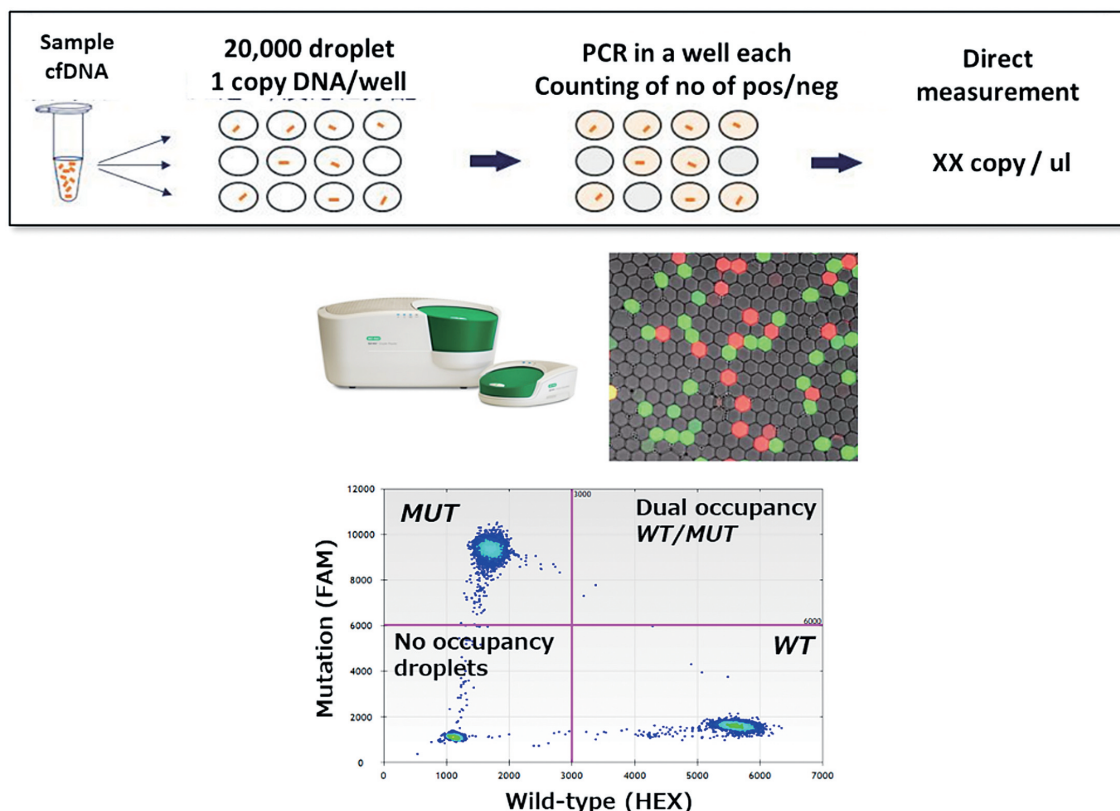


図1 デジタル PCR の測定原理

DNA と反応溶液を数千～数万のドロップレット中に区分け，その中で蛍光プローブを用い PCR 反応を実施することで，陽性，陰性のドロップレット数を定量することにより絶対定量化する。

ンキナーゼ阻害薬に適応する *EGFR* 遺伝子の変異型は，活性型変異であり感受性変異と呼ばれ，アレル特異的 PCR やリアルタイム PCR 法による検査が体外診断薬として承認され，使用されている。これらの *EGFR* チロシンキナーゼ阻害薬に対して *EGFR* 遺伝子変異陽性肺癌は高頻度に著明な腫瘍縮小効果を発揮し，病状は改善するが，その後，腫瘍は再度増大するような獲得耐性を生じることが知られている。その耐性機序は様々知られているが，最も高頻度に起こりうる耐性機序は *EGFR* 遺伝子の790番目の threonine が methionine に変化した *EGFR* T790M という二次的な点突然変異である¹⁷。近年，*EGFR* T790M 陽性非小細胞肺癌に対して，第3世代の *EGFR* 阻害薬オシメルチニブのセカンドラインでの使用が承認された。したがって，本薬の適応を獲得するには，*EGFR* 感受性変異を確認後，*EGFR* 阻害薬を使用し，その後に増大した際に再度，腫瘍を採取し，*EGFR* T790M の遺伝子変異検査を行う必要が生じた。一般的に，治療後の腫瘍の再生検は侵襲的であり，困難なことが多い。静岡県がんセンターのデータでは，何等かの理由で再検査が困難な例は30-40%に上る¹⁸。検査ができなければ，オシメルチニブの

治療のチャンスが失われることから，侵襲性の低い血漿検査 (ctDNA 検査) の必要性が生じ，2016年に我が国において *EGFR* 遺伝子変異検査が保険償還され，実臨床で使用されている。さらには本年，初回治療前の血漿検査も承認され，肺癌に対しては本格的にリキッドバイオプシーが実臨床で使用されるようになった。

一方で，血漿検査の臨床応用において，様々な問題点が残っている。技術的には，ctDNA の内，腫瘍由来の ctDNA の含有割合が未知であり，偽陰性の問題が解決されていない点である。同課題については，我々は腫瘍由来 DNA の含有率を見積る方法を研究している。また，通常 10 ml 程度の末梢血より得られる ctDNA 量は少量であり，各検査に供することができる試料は限られることも懸念点である。臨床的には，ctDNA が腫瘍組織のサロゲートとなり得るかについての情報は重要である。我々のデジタル PCR を用いた検討では，*EGFR* 阻害薬に耐性となった時点での血漿中において，*EGFR* 遺伝子変異検出率は *EGFR* 活性型変異の場合46.2%であった。活性型変異を有する検体の内 *EGFR* T790M 変異陽性例は56.7%であり，*EGFR* T790M の発現率として

妥当な値であった。しかし、診断時の腫瘍組織と耐性時の血漿中の *EGFR* 変異の一致率は活性型変異の場合でも78.9%、感度は75.8%、特異度87.5%であった¹⁹。さらに、再生検腫瘍検体と同時期に採取した血漿の間での比較においても、*EGFR* T790M の一致率は83.3%であり、90%には届かなかった²⁰。腫瘍検体と血漿中の検出結果の不一致については、血液中へ漏出する腫瘍由来 ctDNA が微量であることと腫瘍組織の不均一性が要因であると考えられる。

原発巣組織と cfDNA の遺伝子変異結果が一致しない患者の病態については、肺癌の手術切除症例において、NGS 解析を実施し、臨床病理学的情報との関連性から、TNM 分類の内 T 因子（腫瘍量）が重要であるとの知見を得ており¹⁹、早期診断における ctDNA を用いた分子プロファイルについてのさらなる知見の集積が望まれている。また、血漿中 cfDNA を用いて *EGFR* T790M 遺伝子変異が確認された *EGFR*-TKI 既治療非小細胞肺癌患者に対するオシメルチニブの効果を知る前向き臨床試験は報告されておらず、デジタル PCR および cobas[®] *EGFR* Mutation Test v2（ロシュ・ダイアグノスティックス）による末梢血中における *EGFR* T790M 陽性患者を対象とした第3世代 *EGFR* チロシンキナーゼ阻害剤の前向

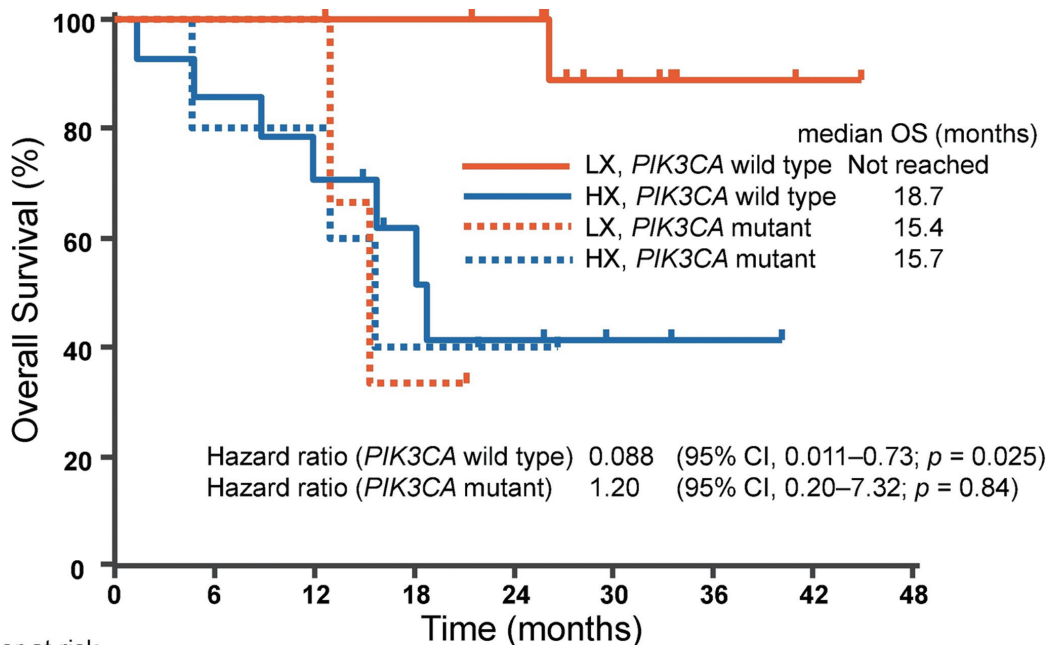
き医師主導臨床試験を実施し、血漿検査が治療選択に有用であることを示した²¹。

7) がん患者のリキッドバイオプシーの臨床応用例—乳癌・大腸癌

リキッドバイオプシー研究は乳癌や大腸癌領域でも盛んであり、様々なアプローチが行われてきた。近年は、デジタル PCR、次世代シーケンス (next generation sequencing, NGS) 技術の登場により、簡便に解析できることから、臨床試験におけるモニタリングや血液検体による効果予測などが行われている。

自験例では、HER2 陽性転移性乳癌患者を対象としたトラスツズマブ+カペシタビンとラパチニブ+カペシタビンと比較する第二相臨床試験において、治療前の ctDNA による解析から、血漿中の *PIK3CA* 変異が全体の23%で検出され、同変異の有無により、ラパチニブ+カペシタビン群の治療効果 (PFS 及び OS) が予測できる可能性を示した (図2) (WJOG6110B/ELTOP 試験)²²。

大腸癌においては、ctDNA を用いた分子プロファイルの臨床的有用性が報告された²³。大腸癌においては抗 *EGFR* 抗体が用いられるが、*RAS* 遺伝子等



Number at risk

	0	6	12	18	24	30	36	42	48
LX, wild type	13	13	13	12	11	6	2	1	0
HX, wild type	14	12	9	6	4	2	1	0	0
LX, mutant	3	3	3	1	0	0	0	0	0
HX, mutant	5	4	4	2	1	0	0	0	0

図2 HER2 陽性転移性乳癌患者を対象としたトラスツズマブ+カペシタビンとラパチニブ+カペシタビンと比較する第二相臨床試験における血漿バイオマーカー研究

LX, ラパチニブ+カペシタビン; HX, トラスツズマブ+カペシタビン

の変異を有する大腸癌においては、その効果が発揮されにくい。大腸癌患者の抗 EGFR 抗体による治療経過中に、癌胎児性抗原 (CEA) や画像の変化といった臨床的な増悪を認める数か月前から、血中に微量の *KRAS* 変異が検出されるようになることが報告され、リキッドバイオプシーの臨床的有用性が示された。我々は、oxaliplatin および bevacizumab (BV) を含む初回化学療法不応の *KRAS* 野性型進行・再発結腸・直腸癌に対する FOLFIRI+panitumumab 併用療法 vs FOLFIRI+BV 併用療法のランダム化第 II 相試験 (WJOG6210G) における ctDNA を用いた解析で、治療前の ctDNA の解析により FOLFIRI+panitumumab 群において、*RAS* および *BRAF* 遺伝子変異が検出されない症例において、治療効果が良好であることを示した²⁴。

8) 次世代シーケンサー (NGS) を用いた リキッドバイオプシー研究

肺癌においては、遺伝子検査と薬のペアが複数存在し、腫瘍組織を用いた解析が何度も必要となり、検体量および時間の制約から一度に実施するマルチ遺伝子パネル検査の必要性が生じた。次世代シーケンサー技術は、ライブラリと称する DNA 断片の

塩基配列を並列的に一度に解析する技術である。同技術は、全ゲノム解析、エクソーム解析、エピジェネティックな解析を実施するエピゲノム解析、RNA の塩基配列決定や網羅的遺伝子発現解析を行う RNAseq 等の応用が可能であるが、がんの臨床現場においては、数百遺伝子を解析するターゲットシーケンスが主流である。既に、複数の遺伝子パネル検査が承認され、わが国でも本格的に NGS によるがんの precision medicine の時代を迎えている。

がんゲノム医療におけるリキッドバイオプシー研究では、がんゲノム医療に質する ctDNA を対象とする NGS 検査が進められている。がん種によっては、ultra-deep sequencing とよばれるリード数を稼ぐ方法により、血漿中での検出を可能とする手法が用いられる²⁵。デジタル PCR に比べて、アンプリコンシーケンス技術は低頻度変異検出感度が低いなどの難点があった。しかし、近年、技術的に分子バーコード法を用いることにより、高感度での遺伝子変異検出が可能となった。また、スタンフォード大学が開発した cancer personalized profiling by deep sequencing (CAPP-seq) は、血漿中遺伝子変異の高感度検出が可能なアッセイのひとつであり、臨床試験等での cfDNA による分子プロファイリングに

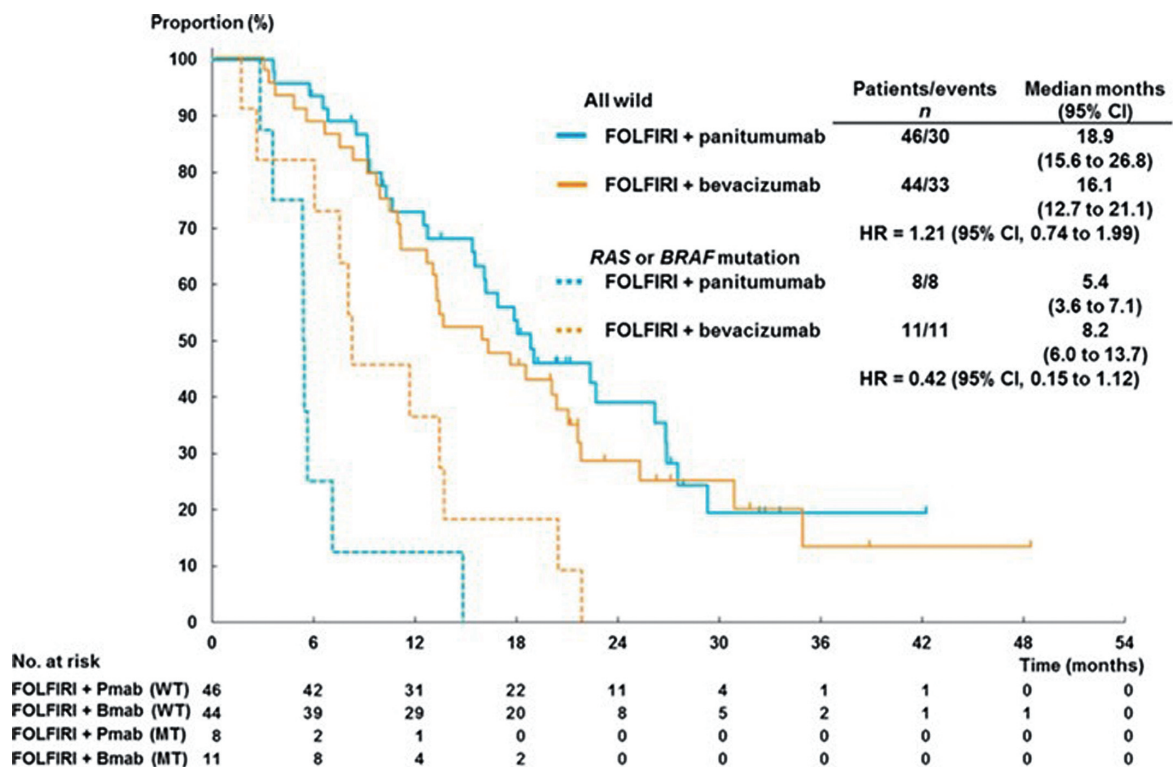


図3. FOLFIRI+Panitumumab 併用療法 vs FOLFIRI+BV 併用療法のランダム化第 II 相試験 (WJOG6210G) における血漿バイオマーカー研究

Pmab, panitumumab; Bmab, bevacizumab; HR, hazard ratio; WT, wild type; MT, mutant type

用いられている²⁶。我々が用いる CAPP-seq 法は分子バーコード法と Capture 法を組み合わせたライブラリ調整を行い、シークエンスエラー抑制のための解析アルゴリズムを有する AVENIO ctDNA Surveillance Panel である。これにより、数百の遺伝子のエクソン領域が一度に解析できる。また、本パネルにより融合遺伝子およびコピー数変動も解析可能であり、たとえば抗 HER2 治療の適応獲得のための遺伝子増幅を検出する蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 等の検査のサロゲートとして ctDNA 検査が可能となる。実際の臨床シークエンスでは 10~30 ng DNA 量が必要であるが、採血管 1 本の採血で可能であり、低侵襲性は保たれている。現在、CAPP-seq を用いた臨床研究を多数実施中であり、各種治療法に対する耐性獲得機序がリアルタイムに解析できることが期待される^{27, 28}。

おわりに

リキッドバイオプシー研究の進展により、液性検体を用いた低侵襲性の検体を用いた臨床試験が進み、その臨床的有用性が示されてきている。ここでは、リキッドバイオプシーによる治療効果予測、モニタリングツールとしての臨床的有用性について自験例を中心に紹介した。現在実施されている、NGS を用いた解析により、治療経過中や治療後の分子プロファイルがリキッドバイオプシーを用いて可能となる。一次、二次治療後、耐性獲得後の分子プロファイルを見ることにより、次世代の治療戦略を考える adaptive treatment paradigm が起こると期待される。

文 献

- Pantel K, Alix-Panabieres C (2010) Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 16: 398-406.
- Lin HK, et al. (2010) Portable filter-based microdevice for detection and characterization of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 16: 5011-5018.
- Khoo BL, et al. (2016) Liquid biopsy and therapeutic response: Circulating tumor cell cultures for evaluation of anticancer treatment. *Sci Adv* 2: e1600274.
- Cayrefourcq L, et al. (2015) Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res* 75: 892-901.
- Bacelli I, et al. (2013) Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 31: 539-544.
- Hodgkinson CL, et al. (2014) Tumorigenicity and genetic profiling of circulating tumor cells in small-cell lung cancer. *Nat Med* 20: 897-903.
- Jan YJ, et al. (2019) A Circulating Tumor Cell-RNA Assay for Assessment of Androgen Receptor Signaling Inhibitor Sensitivity in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Theranostics* 9: 2812-2826.
- Johnstone RM, et al. (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262: 9412-9420.
- Simons M, Raposo G (2009) Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21: 575-581.
- Valadi H, et al. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9: 654-659.
- Stevens GL, Scheer WD, Levine EA (1996) Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 293-296.
- Best MG, et al. (2015) RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* 28: 666-676.
- Mouliere F, et al. (2011) High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 6: e23418.
- Lo YM, et al. (2010) Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2: 61ra91.
- Underhill HR, et al. (2016) Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet* 12: e1006162.
- Baker M (2012) Digital PCR hits its stride. *Nature Methods* 9: 541-544.
- Westover D, et al. (2018) Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Ann Oncol* 29: i10-i19.
- Kawamura T, et al. (2016) Rebiopsy for patients with non-small-cell lung cancer after epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor failure. *Cancer Sci* 107: 1001-1005.
- Takahama T, et al. (2016) Detection of the T790M mutation of EGFR in plasma of advanced non-small cell lung cancer patients with acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors (West Japan oncology group 8014LTR study). *Oncotarget* 7: 58492-58499.
- Ishii H, et al. (2015) Digital PCR analysis of plasma cell-free DNA for non-invasive detection of drug resistance mechanisms in EGFR mutant NSCLC: Correlation with paired tumor samples. *Oncotarget* 6: 30850-30858.
- Takahama T, et al. (2020) Plasma screening for the T790M mutation of EGFR and phase 2 study of osimertinib efficacy in plasma T790M-positive non-small cell lung cancer: West Japan Oncology Group 8815L/LPS study. *Cancer* 126: 1940-1948.
- Takano T, et al. (2018) A randomized phase II trial of trastuzumab plus capecitabine versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic

- breast cancer previously treated with trastuzumab and taxanes: WJOG6110B/ELTOP. *Breast* 40: 67–75.
23. Diaz LA, Jr, et al. (2012) The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486: 537–540.
 24. Shitara K, et al. (2016) Randomized study of FOLFIRI plus either panitumumab or bevacizumab for wild-type KRAS colorectal cancer-WJOG 6210G. *Cancer Sci* 107: 1843–1850.
 25. Sakai K, et al. (2015) Extended RAS and BRAF Mutation Analysis Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 10: e0121891.
 26. Chabon JJ, et al. (2016) Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun* 7: 11815.
 27. Otsubo K, et al. (2019) Genetic Profiling of Non-Small Cell Lung Cancer at Development of Resistance to First- or Second-Generation EGFR-TKIs by CAPP-Seq Analysis of Circulating Tumor DNA. *Oncologist* 24: 1022–1026.
 28. Ishii H, et al. (2020) Determination of Somatic Mutations and Tumor Mutation Burden in Plasma by CAPP-Seq during Afatinib Treatment in NSCLC Patients Resistance to Osimertinib. *Sci Rep* 10: 691.