

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15751

研究課題名(和文) 口腔がんの効率的な末梢循環腫瘍細胞採取法とゲノム解析法の創出

研究課題名(英文) Establishment of practical methods for next generation sequence from circulating tumor cells and circulating cell free DNA of oral cancer

研究代表者

本田 一文 (Honda, Kazufumi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・ユニット長

研究者番号：10260936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：末梢循環腫瘍細胞(CTCs)と腫瘍から血流に放出された循環細胞遊離DNA(ctDNA)から遺伝子変異を確認する効率の良い解析手法の確立に挑戦した。揚力と遠心力によりがん細胞を分離する原理でCTCsを分離した。CTCsの微量DNAは増幅を行った後、患者血液中のctDNAとともに次世代シーケンス(NGS)を行う手法を確立した。頭頸部がん、胃がん、食道がん、大腸がんを含む計37例の末梢血からCTCsを分離した。末梢血1mL中のCTCsの個数は8-77個/mLであり、全例からCTCsを分離できた。増幅されたDNAからNGSを行い、CTCsからのがん遺伝子、がん抑制遺伝子変異プロファイル抽出に成功した。

研究成果の概要(英文)：To select the optimal therapeutic strategy for individual patients with cancer, clarification of the biological behavior of the tumor using minimal invasive methods is necessary. Circulating tumor cells (CTCs) and circulating cell-free DNA (ctDNA) released into the bloodstream from the primary tumor and metastases reflect the current tumor status. To establish a noninvasive method for identifying mutation status in tumor cells, we tried to develop methods for next-generation sequencing (NGS) from CTCs and ctDNA. CTCs were isolated using a cascading spiral system with patient blood (Hou et al, Scientific Rep. 2013) while ctDNA and DNA extracted from CTCs were analyzed by NGS (Ion PGM; LifeTechnology). Thirty-four patients with gastric, colorectal, esophageal, or head and neck cancers were enrolled in this study. A total of 8-77 CTCs/ml were retrieved from whole blood. Mutation profiles were successfully identified from CTCs and ctDNA obtained from each patient by NGS.

研究分野：外科系歯学

キーワード：末梢循環腫瘍細胞 口腔がん バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

口腔がんはヒト個性にとって最も重要な顎顔面部に発症するため、最小限な侵襲で最大の効果を発揮する個別化医療の開発が求められている。個別化医療を遂行するためには、がんの個性を的確にとらえ、最適治療を予測するコンパニオン診断法が必要となる。個々のがん細胞は自分自身の生存をかけて時々刻々と進化する。最適治療の選択には、経時的・空間的に変化するがん細胞の個性を正確かつ非侵襲的にとらえる技術の創出が切に求められている。

最近では、血液中に循環する CTCs や循環細胞フリーDNA (circulating cell free DNA, cfDNA) の存在が知られている。CTCs や cfDNA は採血という最小限な侵襲で採取できるため、頻回検査で患者の負担を強いることがない。CTCs や cfDNA を用いたコンパニオン診断法や早期診断法の開発が世界的に着目されているが、口腔がんの分野ではいまだ確立されていない。

CTCs からゲノム解析が可能になれば、病態との相関解析からリキッドバイオプシーによる非侵襲的個別化診断法が確立できるはずである。

上記背景から、「口腔がんにおける効率的なリキッドバイオプシーを創出し、個別化医療の選択に有用な非侵襲的コンパニオン診断法を開発する」ことを着想した。

2. 研究の目的

【研究目的】

口腔がんの個別化医療の確立を目的に口腔がんのリキッドバイオプシーによる病態診断法を創出する。

【研究目標】

口腔がんの効率的な末梢循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells, CTCs) の採集法を開発する。

CTC を用いたゲノム解析を始めとしたオミクス解析技術を開発する。

3. 研究の方法

がんは自分自身の生存をかけて、がん細胞自身を時々刻々変化させる。治療介入による圧力は、がん細胞の遺伝子変異を蓄積させ、環境に耐えるがん細胞への進化を促す。継続的に変化するがん細胞の進化・個性を的確に捉え適時・最適治療を選択することは、個別化医療に欠かせない戦略である。継続的な変化を鋭敏にとらえ、頻回な検査にも対応可能な非侵襲的検査法が開発が求められている。末梢を循環する CTCs や cfDNA は採血により採取可能で、がん細胞が持つ瞬間の個性を反映すると考えられるため、リキッドバイオプシー診断の有力候補として着目されている。末梢血から CTC を捕捉する方法としては上皮表面マーカーを用いて集めて、リンパ球等

から分離する方法が注目されている。しかしながら抗体による捕捉法は、CTCs が上皮マーカーを発現していることが前提となるため、血行性転移の第一段階である上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) を起こした場合は、上皮マーカーによる CTCs のセレクションがそもそも不可能となる。

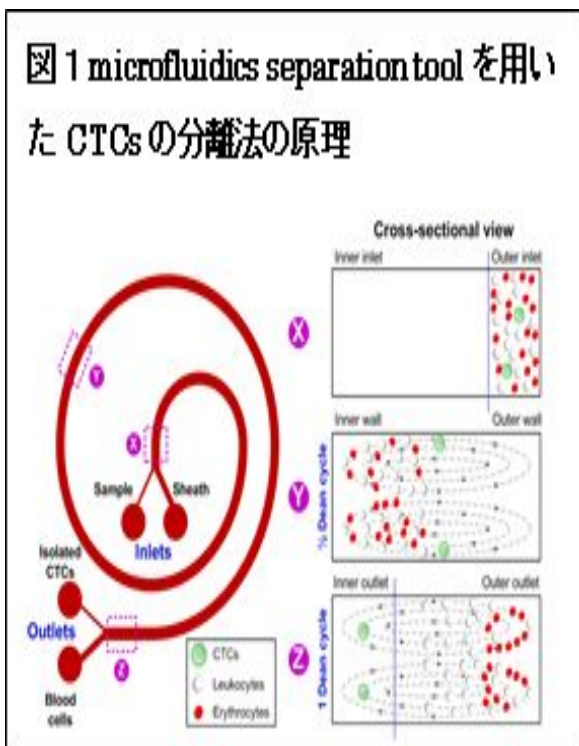
NUS (シンガポール国立大学) は、本問題を解決するため上皮表面マーカーを利用せず細胞径により CTCs を血球から分離する微小流路 (microfluidic separation tool) を用いた分離法を開発に成功した (Hou, H W et al, Scientific Reports 2013) (CTChip-spiral) (図 1)。国がん創薬は、NUS と 2013 年から共同研究を開始し、NUS が開発した CTChip-spiral のプロトタイプを利用して、大腸がん、胃がん、食道がん患者で分子標的治療が行われている患者から継続的に CTCs を採取している。本研究では、上皮系表面マーカーを利用せず microfluidics separation tool を用いて口腔がん CTC を効率よく捕捉する方法を確立し、採取された CTCs から次世代シーケンスによるゲノム変異解析を行うための技術開発に挑戦した。

【技術開発項目】

microfluidic separation tool を用いた口腔がんからの CTCs 捕捉法の最適化

CTCs が含まれた微量検体から次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析法を確立

次世代シーケンサーによる解析結果から CTCs の変異を抽出するアルゴリズムを確立



4 . 研究成果

1) Microfluidics separation tool を用いて、食道がん (8 例) 胃がん (1 例) 大腸がん (11 例) 頭頸部がん (11 例) 患者末梢血液から CTCs を分離した。1ml の患者末梢血から分離された CTCs の数は、8-77 個 (CTCs/ml) であった。

2) CTCs から微量採取された DNA を whole genome amplification (WGA) を行い増幅し、次世代シーケンス技術 (next generation sequence, NGS) により解析する方法を最適化した。

3) NGS を用いてがんで遺伝子変異が頻度高く観察される遺伝子群のパネルシーケンスを行った。

4) NGS によって得られたデータから変異を抽出するためのアルゴリズムを最適化した。

5) CTCs からのがん種毎の遺伝子変異プロファイルを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

【英語論文】

1: Miura N, Kamita M, Kakuya T, Fujiwara Y, Tsuta K, Shiraiishi H, Takeshita F, Ochiya T, Shoji H, Huang W, Ohe Y, Yamada T, **Honda K**. Efficacy of adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer assessed by metastatic potential associated with ACTN4. *Oncotarget*. 2016 Apr 21. doi: 10.18632/oncotarget.8890. (査読有)

2: Murakami N, Matsumoto F, Yoshimoto S, Ito Y, **Mori T**, Ueno T, Tsuchida K, Kashihara T, Kobayashi K, Harada K, Kitaguchi M, Sekii S, Umezawa R, Takahashi K, Inaba K, Igaki H, Itami J. Patterns of recurrence after selective postoperative radiation therapy for patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2016 Mar 7;16(1):192. doi:10.1186/s12885-016-2229-x. (査読あり)

3: Ohtomo-Oda R, Komatsu S, **Mori T**, Sekine S, Hirajima S, Yoshimoto S, Kanai Y, Otsuji E, Ikeda E, Tsuda H. SMYD2 overexpression is associated with tumor cell proliferation and a worse outcome in human papillomavirus-unrelated nonmultiple head and neck carcinomas. *Hum Pathol*. 2016 Mar;49:145-55. doi: (査読有)

4: **Honda K**, Kobayashi M, Okusaka T, Rinaudo JA, Huang Y, Marsh T, Sasajima Y, Nakamori S, Sanada M, Shimahara M, Ueno T, Tsuchida A, Sata N, Ioka T, Yasunami Y, Kosuge T, Miura N, Kamita M, Sakamoto T, Shouji H, Jung G, Srivastava S, Yamada T. Plasma biomarker for detection of early stage pancreatic cancer and risk factors for pancreatic malignancy using antibodies for apolipoprotein-All isoforms. *Sci. Rep*. 2015 Nov 9;5:15921.

5. **Honda K**. The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer. *Cell Biosci*. 2015 Aug 18;5:41. (査読有)

【学会発表】(計 3 件)

【招待講演(筆頭のみ)】

1: **Kazufumi Honda**, Plasma biomarker for detecting early-stage pancreatic cancer and risk factors for pancreatic malignancy using antibodies for apolipoprotein-All isoforms. Japan US Cancer Research Workshop. March 2016. Tokyo.

2. 本田一文、日本プロテオーム学会 2015 年会 「新技術を支える質のよい臨床サンプルの収集を目指して」 熊本 2015 年 7 年

【学会】

1: Tomohiko Kakizaki, Hirokazu Shoji, Koh Furuta, Ken Kato, Seiichi Yoshimoto, Fumihiko Matsumoto, Taisuke Mori, Tomohiro Sakuma, Satoshi Fukuda, Tesshi Yamada, Chwee Teck Lim, and **Kazufumi Honda**. Next generation sequencing of circulating tumor cells and circulating free DNA of solid cancer patients. 名古屋市 (第 74 回日本癌学会総会) 2016 年 10 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

本田 一文 (HONDA Kazufumi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10260936

(2)研究分担者

森 泰昌 (MORI Taisuke)

研究者番号：00296708

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

吉本 世一 (YOSHIMOTO Seichi)

研究者番号：00462242

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・科長

(3)連携研究者

なし。