

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07154

研究課題名(和文) 血漿遊離DNAを用いた小細胞肺癌の新たな低侵襲的診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel less-invasive diagnostic method using plasma cell-free DNA in small-cell lung cancer

研究代表者

梅村 茂樹 (Umemura, Shigeki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：80623967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：小細胞肺癌症例の血漿から遊離DNAを抽出し、遺伝子解析を実施したところ、60%で血漿からの遺伝子変異の検出に成功した。遺伝子解析成功例は、LDH高値かつ予後不良であり、腫瘍進行が急速であると考えられた。本研究において、腫瘍進行が急速な小細胞肺癌に対する、血漿を用いた低侵襲的な遺伝子解析の有用性が示唆された。また小細胞肺癌と非がんコントロールの血漿代謝産物プロファイルと比較したところ、小細胞肺癌血漿で、cis-aconitic acidとisocitric acidの値が有意に高かったため、小細胞肺癌において、血漿代謝産物が低侵襲で有効なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急速に進行し予後不良な小細胞肺癌では、病変の一部を採取して詳しく調べる検査が困難なケースがある。このような症例に対して、血漿を用いた低侵襲的な遺伝子解析の有用性が示唆されたため、社会的意義は大きいと考えられる。一方、代謝産物を指標としたバイオマーカー開発は、今後の発展性が期待される領域であるが、実施例がほとんどないのが現状である。その中で、本研究にて、小細胞肺癌において血漿代謝産物が有効なバイオマーカーとなる可能性が示唆されたため、他がん腫への応用や今後のバイオマーカー開発の進展に貢献できる可能性があり、学術的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We extracted cell-free DNA from plasma samples of small-cell lung cancer (SCLC) patients and performed targeted capture sequencing. In 60% of plasma samples, we could successfully identify genetic mutations detected by tumor biopsy samples. Overall survival was poorer and serum LDH level was higher for SCLC patients whose plasma samples were successful for genetic analysis, suggesting aggressive features for these patients. In this study, we could suggest the efficacy of less-invasive genetic analysis method using plasma samples in rapid growing SCLC. In addition, we compared the plasma levels of metabolites between SCLC patients and patients with no malignancies. Plasma levels of cis-aconitic acid and isocitric acid were significantly higher in SCLC patients, suggesting plasma metabolites could be a minimally-invasive and effective biomarkers in SCLC.

研究分野：肺癌

キーワード：小細胞肺癌 低侵襲 遺伝子解析 遊離DNA 代謝解析 メタボローム解析 バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 小細胞肺癌の治療成績の現状と低侵襲な診断法のニーズ

小細胞肺癌は、増殖が速く早期にリンパ節や他臓器に転移しやすい悪性度が高い腫瘍である。化学療法や放射線治療の感受性は比較的良好であるが、いったん治療で奏効が得られても、大部分の患者で再発・増悪が認められる。予後に関して、限局型小細胞肺癌では生存期間中央値が20-28ヵ月、進展型小細胞肺癌では9-13ヵ月程度であると報告されており、長期生存が得られることは稀である (Takeda et al. J Clin Oncol 2002, Noda et al. New Engl J Med 2002)。

小細胞肺癌の予後の改善には、従来の作用機序とは異なる新たな治療法の開発が極めて重要である。これまで様々な分子標的治療薬の臨床試験が行われたが、既存の殺細胞性抗癌剤を上回る新規薬剤は見つかっておらず、予後の改善がほとんど得られていないのが現状である (Umemura et al. Jpn J Clin Oncol 2015)。申請者らは、小細胞肺癌切除例で全エクソン解析を行い、更に小細胞肺癌進行例においても標的遺伝子解析を実施し、日本人小細胞肺癌遺伝子変異の全体像を把握した。これら網羅的な遺伝子解析により、TP53、RB1、MYC ファミリーなど既報の遺伝子に加え、新たに複数の症例で重複して異常が検出される遺伝子群 (= PI3K/AKT/mTOR 経路) を抽出した。

週~月単位で急速に進行する小細胞肺癌では、迅速に治療を開始する必要があり、時間をかけて、病変の一部を採取して詳しく調べる検査 (生検) を行うことが困難なケースが多い。血漿遊離 DNA (cfDNA) を用い、これら小細胞肺癌に特徴的な標的遺伝子群を低侵襲に診断できる方法が確立されれば、より早期な診断により、迅速な治療開始に結び付けられることが期待できる。また分子標的治療の対象となる被験者を効率的にスクリーニングでき、より多くの被験者に新規分子標的治療薬の使用機会を提供できることが期待できる。

一方、生命の基本原則 (セントラルドグマ) では、代謝産物はゲノム DNA よりも表現型に近いところに位置している。申請者らは、先行研究にて小細胞肺癌には臨床像や病理像を反映した代謝特性が存在することを見出した。小細胞肺癌に特徴的な代謝産物を血漿から検出することができれば、低侵襲で有用なバイオマーカーとなり得る。また、ゲノム DNA よりも表現型に近いことから、より生物学的根拠に基づいたバイオマーカーとなり得ることが期待される。

(2) 本研究に関連する国内・国外の研究動向

非小細胞肺癌や大腸癌においては、次世代シーケンサーを用いて血漿 cfDNA を用いて標的遺伝子解析を行い、cfDNA から EGFR 遺伝子変異、KRAS 遺伝子変異等、治療標的となる遺伝子変異を高感度で検出した報告が散見される (Couraud S et al. Clin Cancer Res. 2014, Mohan S et al. PLoS genet. 2015)。しかし小細胞肺癌においては、血漿 cfDNA を用いた標的遺伝子解析の有効性を示した報告は、乏しいのが現状である。小細胞肺癌血漿を用いた代謝解析・メタボローム解析の有効性に関しては、未だ報告されていないのが現状である。

2. 研究の目的

急速に進行し予後不良な小細胞肺癌を対象とし、血漿 cfDNA を用いた標的遺伝子解析を実施し、低侵襲な診断法を確立することを目的とする。また血漿検体を用いて代謝解析・メタボローム解析を実施し、低侵襲な診断法や有効なバイオマーカーを確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象症例の抽出及びデータベースの作成

国立がん研究センター東病院、肺癌データベース (肺癌全体 約 17000 例) の中から、遺伝子変異プロファイルが分かっている、十分な量の新鮮凍結血漿が保存されている小細胞肺癌症例を抽出する。これら候補症例において、年齢、性別、喫煙指数、病期、腫瘍マーカー、化学 (放射線) 治療レジメン、治療効果、再発の有無、生命予後などの臨床情報を抽出し、データベースを作成する。

(2) ゲノム DNA の抽出

cfDNA を用いた標的遺伝子解析を実施する症例において、新鮮凍結血漿からの cfDNA 抽出に最適な DNA 抽出キットを用いて、cfDNA を抽出する。DNA は 1 µg の抽出を目標とする。

(3) cfDNA を用いた標的遺伝子のエクソン解析

血漿 cfDNA より、前述の小細胞肺癌の網羅的解析にて候補遺伝子と考えられた遺伝子群で作成したカスタムパネルを用いたターゲットシーケンスを行い、その頻度と変異部位を確認する。ターゲットシーケンスを行う候補遺伝子 (標的遺伝子) の内訳は、以下のとおりである。

TP53、RB1、MYC ファミリー等、小細胞肺癌に高頻度に異常が報告されている遺伝子群

PI3K/AKT/mTOR 経路、受容体チロシンキナーゼ等、分子標的治療の対象となり得る遺伝子群

小細胞肺癌の網羅的解析で新たに見つかった、小細胞肺癌で比較的高頻度に異常が認められる遺伝子群

(4) 血漿 cfDNA を用いた標的遺伝子解析の忍容性検証

標的遺伝子解析により得られた血漿 cfDNA 遺伝子変異プロファイルと、対応する腫瘍検体の遺伝子変異プロファイルを比較し、cfDNA からの遺伝子変異検出感度を検出する。血漿を用いた標的遺伝子解析成功に関連した臨床因子を同定し、予後との関連を検証する。

- (5) 小細胞肺癌の遺伝子変異プロファイルを治療前および増悪時で比較することにより、再増悪の予測因子や、化学（放射線）治療耐性のメカニズムに関連した遺伝子変異群を抽出する。
- (6) 国立がん研究センター東病院に新鮮凍結血漿が保存されている血漿検体（小細胞肺癌および非がんコントロール）を用いて、代謝解析・メタボローム解析を実施する。メタボローム解析の結果得られた代謝産物の絶対定量値と、同時に採取し測定した血清の生化学検査値を比較することにより、血漿検体を用いたメタボローム解析の忍容性を検証する。
- (7) 小細胞肺癌の血漿と、非がんコントロールの血漿の代謝産物プロファイルを比較し、小細胞肺癌に特徴的な血漿代謝産物を同定する。さらに、血漿代謝産物の絶対定量値と予後との相関を検証し、血漿検体を用いた低侵襲で有効なバイオマーカーを同定する。

4. 研究成果

(1) 小細胞肺癌血漿遊離 DNA の標的遺伝子解析

小細胞肺癌における血漿遊離 DNA を用いた標的遺伝子解析の忍容性検証

国立がん研究センター東病院、肺癌データベース（肺癌全体 約 17000 例）の中から、遺伝子変異プロファイルが分かっている、新鮮凍結血漿が保存されている小細胞肺癌症例を抽出した。この小細胞肺癌症例のうち、10 例の血漿からゲノム DNA（血漿遊離 DNA）を抽出し、244 個の候補遺伝子による標的遺伝子解析を実施した。標的遺伝子解析を実施したところ、腫瘍組織から検出されていた 37 個の体細胞遺伝子変異候補のうち、24 個（65%）は、血漿からの検出が可能であった。

血漿を用いた標的遺伝子解析成功に関連する因子の同定

で血漿遊離 DNA から標的遺伝子解析を実施した小細胞肺癌症例のうち、腫瘍組織から検出された変異の 60%以上を血漿遊離 DNA から検出できた症例は、全体の 60%であった。これらを標的遺伝子解析成功例と定義したところ、血清 LDH 高値（ ≥ 300 U/L）（ $p=0.048$, Fisher 直接確率検定）、血清 proGRP 高値（ ≥ 1000 pg/ml）（ $p=0.048$, Fisher 直接確率検定）が、血漿からの標的遺伝子解析成功例に関連した因子と考えられた。遺伝子解析成功例は、血中の腫瘍循環細胞や腫瘍由来の cfDNA が多く、腫瘍進行が急速であることが示唆された。

小細胞肺癌における血漿を用いた標的遺伝子解析成功と予後の関連

で血漿遊離 DNA を用いた標的遺伝子解析を実施した小細胞肺癌症例のうち、腫瘍組織から検出された変異の 60%以上を血漿遊離 DNA から検出できた症例を遺伝子解析成功例、腫瘍組織から検出された変異の 60%以上を血漿遊離 DNA から検出できなかった症例を遺伝子解析困難例と定義した。遺伝子解析成功例と困難例の予後を比較したところ、遺伝子解析困難例（生存期間中央値：384 日）と比較して、遺伝子解析成功例（生存期間中央値：66 日）の予後が有意に不良であった（ $p=0.022$, log-rank test）（図 1）。急速に進行し予後不良な小細胞肺癌では、時間をかけた生検による診断が困難で、低侵襲で迅速な診断が求められることから、このような症例に対して、血漿 cfDNA を用いた標的遺伝子解析が有用である可能性が示唆された。

全生存期間：遺伝子解析成功例 vs. 困難例

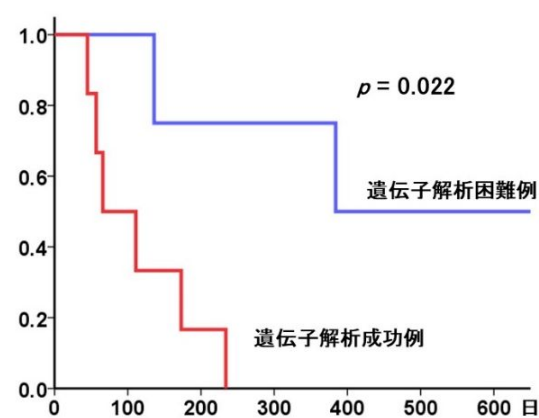


図 1

(2) 小細胞肺癌血漿の代謝解析・メタボローム解析

血漿を用いた代謝解析・メタボローム解析の忍容性検証

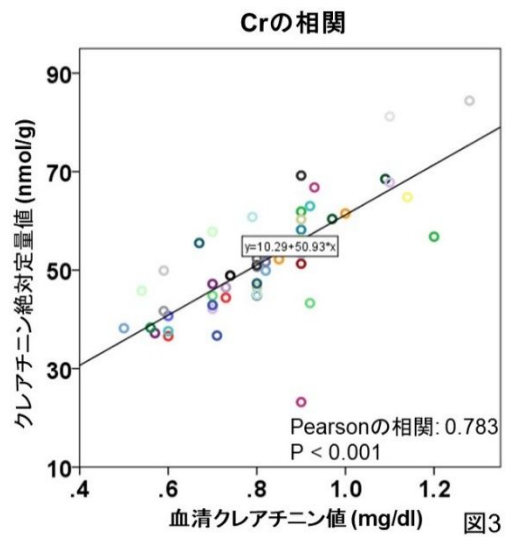
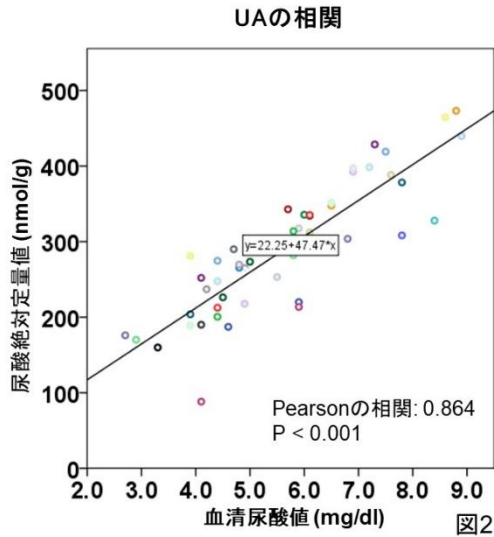
国立がん研究センター東病院に新鮮凍結血漿が保存されている 61 例の血漿検体（小細胞肺癌：46 例、非がんコントロール：15 例）を用いて、代謝解析・メタボローム解析を実施した。尿酸値（UA）とクレアチニン値（Cr）に関して、血漿メタボローム解析で得られた代謝産物の絶対定量値と、同時に採取し測定した血清の生化学検査値を比較したところ、UA 値（Pearson の相関：0.864, $p<0.001$ ）（図 2）、Cr 値（Pearson の相関：0.783, $p<0.001$ ）（図 3）の両者において、代謝産物の絶対定量値と血清の生化学検査値の間に強い相関が認められたため、血漿を用いた代謝解析・メタボローム解析の忍容性を確認できた。

血漿の代謝解析・メタボローム解析を用いた小細胞肺癌のバイオマーカー同定

で代謝解析・メタボローム解析を実施した 61 例において、小細胞肺癌の血漿と、非がんコントロールの血漿の代謝産物プロファイルを比較したところ、非がんコントロールと比較して、小細胞肺癌血漿検体で cis-Aconitic acid（ $p=0.01$, T 検定）isocitric acid（ $p<0.01$, T 検定）の定量値が有意に高かったため、これらが小細胞肺癌に特徴的な血漿代謝産物である可能性が示唆された。その他にも、小細胞肺癌に特徴的でバイオマーカーとなり得る血漿代謝産物の候補を複数同定した。

血漿代謝産物の絶対定量値と予後との相関

で血漿代謝解析・メタボローム解析を実施した小細胞肺癌症例の中で、42例で予後に関する情報が得られた。この42例の中で、血漿 cis-Aconitic acid の定量値が高い症例は、定量値の低い症例と比較して、有意に予後不良であった ($p = 0.028$, log-rank test) (図4)。また血漿 isocitric acid の定量値が高い症例も、定量値の低い症例と比較して、有意に予後不良であった ($p = 0.011$, log-rank test) (図5)。これらの結果から、血漿代謝産物が、小細胞肺癌の有効な予後予測バイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。血漿代謝解析・メタボローム解析は、1ml 程度の少量の血漿で解析が可能のため、低侵襲なバイオマーカーとしての有用性が特に高いと考えられた。



全生存期間: cis-Aconitic acid 高値 vs. 低値

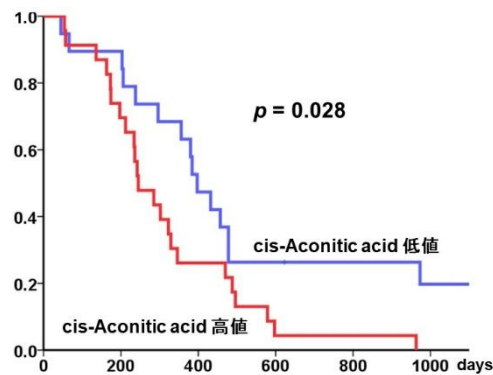


図4

全生存期間: Isocitric acid 高値 vs. 低値

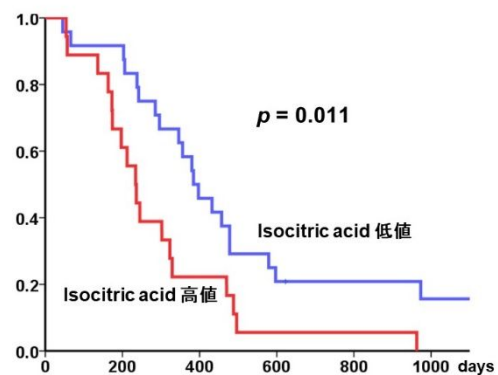


図5

(3) 小細胞肺癌の治療前後の組織検体を用いた遺伝子解析

化学放射線治療を施行した小細胞肺癌3例において、化学放射線治療前後の腫瘍組織検体(治療前3検体、治療後3検体、計6検体)を用いて全エクソン解析を施行し、治療前後の遺伝子変異プロファイルと比較した。この3例(6検体)において、治療前と治療後の検体の両方で検出された遺伝子変異は、256個であった。小細胞肺癌に特徴とされる RB1 の遺伝子変異は、3例中2例(67%)に認め、いずれも治療前後に共通して認められたため、小細胞肺癌の診断や、治療効果の経時的なモニタリングに有効であると考えられた。一方、治療前には検出されたが治療後には検出されなかった遺伝子変異は40個、治療前には検出されなかったが治療後に新たに検出された遺伝子変異は348個であった。これらは、小細胞肺癌の化学(放射線)治療の耐性機序の解明に有用な可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideki Makinoshima, Shigeki Umemura, Ayako Suzuki, Hiroki Nakanishi, Ami Maruyama, Hibiki Udagawa, Sachiyo Mimaki, Shingo Matsumoto, Seiji Niho, Genichiro Ishii, Masahiro Tsuboi, Atsushi Ochiai, Hiroyasu Esumi, Takehiko Sasaki, Koichi Goto, Katsuya Tsuchihara	4. 巻 78
2. 論文標題 Metabolic Determinants of Sensitivity to Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Inhibitor in Small-Cell Lung Carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2179 ~ 2190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-17-2109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoki Furuya, Shigeki Umemura, Hibiki Udagawa, Tadasuke Shimokawaji, Takashi Seto, Haruko Daga, Kosuke Tsuruno, Masato Shingyoji, Satoshi Hara, Haruyasu murakami, Hiroshi Yokouchi, Shingo Matsumoto, Koichi Goto
2. 発表標題 Impact of large-scale nationwide genomic screening project for small cell lung cancer (LC-SCRUM-Japan)
3. 学会等名 2019 ASCO annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeki Umemura, Hideki Makinoshima, Genichiro Ishii, Takehiko Sasaki, Hiroyasu Esumi, Koichi Goto, and Katsuya Tsuchihara
2. 発表標題 Metabolic biomarkers predict the sensitivity to phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibitor in small-cell lung carcinoma
3. 学会等名 AACR annual meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukari Ogawa, Shigeki Umemura, Haruyasu Murakami, Masato Shingyoji, Nobuaki Kobayashi, Tadasuke Shimokawaji, Haruko Daga, Takashi Seto, Norio Okamoto, Hiromi Aono, Yutaka Fujiwara, Satoshi Hara, Nobuhiro Kanaji, Shingo Matsumoto, Hibiki Udagawa, Kiyotaka Yoh, Koichi Goto
2. 発表標題 Large-scale nationwide genomic screening system for small cell lung cancer in Japan (LC-SCRUM-Japan)
3. 学会等名 2018 ASCO annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----