

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2016～2019
 課題番号：16K10674
 研究課題名(和文)腫瘍特異的遺伝子異常による肺癌再発予測バイオマーカーの開発と補助化学療法の効果

研究課題名(英文) Development of biomarker for predicting lung cancer recurrence and effect of adjuvant chemotherapy using tumor-specific gene abnormality

研究代表者
 橋本 毅久 (Hashimoto, Takehisa)
 新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：30334668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は肺癌手術症例の血清から癌由来DNAの検出を試み、再発予後との関係を調べて再発ハイリスク症例を選別することである。
 methylation-specific PCR(MS-PCR)法を工夫し、検出感度を10の-6乗まで高めた。50例の非小細胞肺癌原発巣でp16遺伝子プロモーター領域のメチル化を検索した。正常肺でもメチル化が検出された7症例を除外した43例中18例でメチル化が検出された。術前血清中からDNAを抽出し同様にMS-PCR法をおこなうと18例中6例(33%)で原発巣と同じメチル化DNAが検出された。しかし術後再発や補助化学療法の効果との有意な相関関係は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 肺癌手術症例の血清から癌由来DNAの検出し再発予後との関係を調べて再発ハイリスク症例を選別することを目的とした。methylation-specific PCR(MS-PCR)法を工夫して検出感度を10の-6乗まで高めた。原発巣でメチル化の検出された症例を対象として術前血清中から同じメチル化DNAの検出を試みたところ33%で同じDNAが検出された。しかし陽性率と術後再発や補助化学療法の効果との有意な相関関係は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to try to detect cancer-derived DNA from the serum of lung cancer surgery cases, investigate the relationship between the results and the prognosis of recurrence, and select high-risk cases of recurrence.
 The methylation-specific PCR (MS-PCR) method was devised and the detection sensitivity was increased to 10⁻⁶. Methylation of the p16 gene promoter region was investigated in 50 non-small cell lung cancer primary tumors. Methylation was detected in 18 of 43 cases, excluding 7 cases in which methylation was detected in normal lung. When DNA was extracted from preoperative serum and MS-PCR was performed in the same manner, the same methylated DNA as in the primary lesion was detected in 6 of 18 cases (33%). However, there was no significant correlation between the positive rate and postoperative recurrence or the effect of adjuvant chemotherapy.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 遺伝子異常 術後再発 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌は外科的に完全切除されたと思われても早期に再発死亡することが多く死亡率が高い。治癒率を上げるには早期発見とともに個々の症例に応じたより有効な治療法の選択が必要である。近年補助化学療法の有効性が報告されてきているが、再発ハイリスク症例を効果的に選別し、補助化学療法を施行すべき症例を選び出す簡便な方法が開発されれば、補助化学療法の不要な人への無用な副作用を回避し、補助化学療法を効果的にこなうことができる。

癌に特異的な遺伝子変異検索の方法として mutant-allele specific amplification 法(MASA 法)が開発されている。MASA 法は原発巣癌細胞での特異的な遺伝子変異を利用して多数の正常細胞のなかに僅かに含まれる癌細胞由来 DNA を PCR 法を利用して特異的に増幅し検出する方法である。我々は以前の研究でこの方法を用いて切除リンパ節での微小転移を検出し、術後再発死亡と非常によく相関することを明らかにした(Hashimoto T, et al. Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small cell lung carcinoma cases. Cancer Research 60: 6472-6478, 2000)。また、ある種のがん抑制遺伝子はそのプロモーター領域のメチル化によって不活化されるが、メチル化を特異的に検出する簡便な methylation-specific PCR(MS-PCR)法も開発されている。以前の研究では MS-PCR 法を利用して血清中から p16 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を検出し、その結果と術後再発予後とが相関することも報告してきた。

(2) 2004 年ボストンのグループによって EGFR 遺伝子変異の有無がチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)に対する感受性に影響をおよぼす可能性が報告された(Science. 2004, N Engl J Med. 2004)。その後の検索で EGFR 遺伝子変異は腺癌、東洋人、非喫煙者、女性に多く、EGFR-TKI に対する感受性と相関することが報告されている。遺伝子変異の検出方法としては当初はシークエンスが必要であったが遺伝子変異の部位に偏りがあることから最近ではより簡便で且つ微量なサンプルからでも検出できる方法が開発されている。我々も real-time PCR 法を用いた簡便な方法を用いて肺腺癌での EGFR 遺伝子変異を検索し、腺癌の細胞亜型によって遺伝子変異頻度が違い、更に p53 遺伝子変異の頻度や種類、K-ras 遺伝子変異の頻度との関係を検討して発表してきた(Cancer Science 2010, 101:1745-53)。一方、患者血清中から EGFR 遺伝子変異が検出されることも報告されている(Clin Cancer Res. 2006)。2007 年には染色体転座によって融合した EML4-ALK が一部の肺癌の原因遺伝子異常として日本人肺癌から発見された(Nature 2007)。更にそれに対する TKI が ALK 融合遺伝子を発現した肺癌細胞に有効であることも報告されている。EML4-ALK 融合遺伝子はその構造から高感度検出法の開発が期待される。

(3) 最近では血液中の微量な癌細胞や変異遺伝子の検出方法として、マイクロチップ技術を用いて循環血液中の癌細胞を検出する方法(Nature 2007, N Engl J Med. 2008)や蛍光標識プローブで変異遺伝子を検出し全 DNA との信号強度の比率から血清中の変異遺伝子を検出する方法(Nature Med 2008)も報告されている。しかしいずれも手技の煩雑さやコストの面から実用的とはいえず、より簡便な方法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

(1) 血液中の腫瘍由来 DNA の存在とその濃度の違いが再発ハイリスク症例の選別に有用か、化学療法の感受性に違いが生じるか？

肺癌組織における各種遺伝子異常の検索、血清中の DNA 量の定量化
完全切除された肺癌症例の原発巣腫瘍組織において MASA 法や MS-PCR 法、ダイレクトシークエンス法、real-time PCR を用いて K-ras 遺伝子変異、p53 遺伝子変異、EGFR 遺伝子変異、EML4-ALK 融合遺伝子、癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化を調べる。術前・術後血清から DNA を抽出して real-time PCR 法を用いて血清中の全 DNA 量を測定する。

血清中からの腫瘍由来変異遺伝子の検出と術後再発との関連を検索
原発巣腫瘍組織においてメチル化や遺伝子変異が認められた症例を対象として MASA 法や MS-PCR 法を用いて血清中から腫瘍由来 DNA の検出をおこなう。腫瘍由来 DNA の検出と再発死亡や化学療法に対する感受性との関連を調べ、再発ハイリスク症例の選別に有用であるのかを検討する。我々が以前におこなった p53 遺伝子変異における MASA 法や p16 遺伝子での MS-PCR 法の検出感度は 10^{-3} ~ 10^{-5} 程度までであったが、real-time PCR 法での EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK 融合遺伝子の検出感度を明らかにし、同様に血清中からの遺伝子変異の検出を試み、再発予後との関連を検討する。またゲフィチニブなどの EGFR-TKI 治療に対する感受性の有無との関連も明らかにする。

(2) 再発ハイリスク症例に対する術後補助化学療法の効果の解析

我々は病理病期 IA であっても術前血清 CEA 値が高値であった症例は予後不良であることを明らかにしてきた。そこで最近はそのような症例に対する UFT による術後補助化学療法の前向き臨

床試験を始めている。一方、EGFR 遺伝子変異のある症例は UFT の効果が乏しい可能性も報告されている (Journal of Clinical Oncology 2007)。従って再発ハイリスク症例での術後補助化学療法の効果を検討することによって、対象とするべき症例や使用するべき薬剤の再検討をおこなうことが出来る可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 完全切除された非小細胞肺癌を対象として原発巣腫瘍組織から DNA を抽出する。p16、death-associated protein kinase (DAP kinase)、glutathion S-transferase P1 (GSTP1)、O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT)、TSLC1、RASSE1A の promoter 領域のメチル化の有無を MS-PCR 法で検索する。p53 遺伝子や K-ras 遺伝子異常も MASA 法や PCR-SSCP 法、ダイレクトシーケンス法を用いて検索。EGFR 遺伝子変異は real-time PCR 法で検索する。

(2) MS-PCR 法および変異特異的プローブによる real-time PCR 法を利用してメチル化 DNA や変異 DNA の検出感度を調べる。陽性対象や陰性対象は以前に予備実験としてシーケンスまでおこなっている症例の腫瘍由来 DNA を使用する。陽性対象の希釈系列を作成し、検出感度を調べる。

(3) EML4-ALK 融合遺伝子の高感度検出法を開発する。すなわちプライマーの設計、real-time PCR 法を用いた定量化、ならびに検出感度の確認をおこなう。

(4) 凍結保存されている患者の術前及び術後の血清から DNA を抽出し、DNA 量を検証。MS-PCR 法および real-time PCR 法を用いて術前・術後血清から遺伝子異常の検出が可能であるかを調べる。再発予後との関係を調べ臨床応用可能であるか否か検討する。更に補助化学療法 (EGFR-TKI や UFT、シスプラチンなど) の効果との関係を調べる。

4. 研究成果

(1) メチル化 DNA の希釈系列を作成し、MS-PCR 法の検出感度・特異度に関して検討と原発巣でのメチル化 DNA の検出を試みた。p16 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を特異的に検出できるプライマーを設計・作成して PCR をおこない検出感度と特異性を調べた。PCR は特異性と感度を高める目的で nested-PCR とし、2nd PCR ではアニーリング温度を高くし、各サイクルを 15 秒程度まで短く、かつサイクル数を 35 サイクルまで多くした (Table 1)。それらの工夫の結果、10 の -6 乗まで希釈した陽性コントロールでもメチル化 DNA を検出することが可能となった (Fig. 1)。

【Protocol for PCR Amplification】

1) PCR mixture (Table 1: PCR primers)

Component	Volume per reaction(μl)	Concentration in Master Mix
10× PCR buffer (with MgCl ₂)	2.5	1×, (1.5 mM MgCl ₂)
2.0mM dNTPs	2.5	0.2 mM
distilled water	16.375	
sense primer (10μM)	1.25	0.5 μM
anti-sense primer (10μM)	1.25	0.5 μM
AmpliTaq Gold™(5U/μl)	0.125	2.5 U/100μl
template DNA (50ng/μl)	1.0	2.0 ng/μl
Total volume	25.0	

2) PCR amplification

GeneAmp 9700 (Applied Biosystems)

Nested PCR

1st PCR

95° C 5'00"
95° C 0'30"
60° C 0'30"
72° C 0'30"
72° C 10'00"
4° C forever

40 cycles

PCR products are diluted 50-fold, and 1μl is subjected to a 2nd PCR

2nd PCR

95° C 5'00"
95° C 0'15"
71° C 0'15"
72° C 10'00"
4° C forever

40 cycles

3) 2% Agarose gel electrophoresis, ethidium bromide staining and UV illumination

Table 1. PCR primers

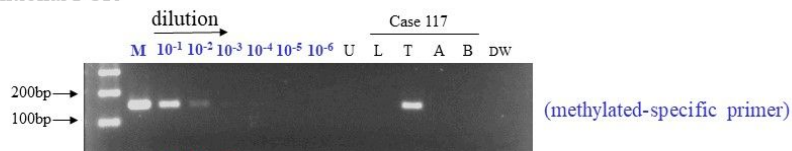
Primer set		Sequence*	Product size
outer primer	sense	5'-GAAGAAAGAGGAGGGGTTGG-3'	280bp
	anti-sense	5'-CTACAACCCTCTACCCACC-3'	
methylated-specific primer	sense	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGCGTG C -3'	150bp
	anti-sense	5'-GACCCCGAACCCGCACC G TAA-3'	
unmethylated-specific primer	sense	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATIGT-3'	151bp
	anti-sense	5'-CAACCCAAACCACAACCATAA-3'	

*blue-colored type: sequence differences between modified and unmodified DNA

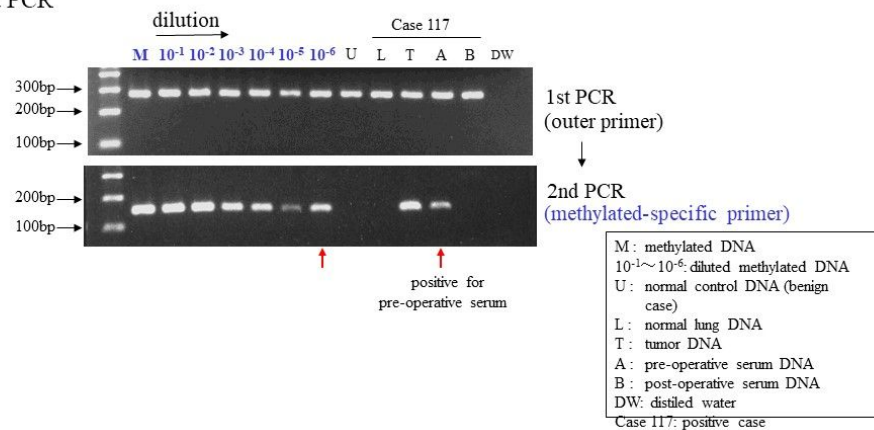
red-colored and underlined type: sequence difference between methylated and unmethylated DNA

Fig. 1 MS-PCR for diluted DNAs

1) Conventional PCR



2) Nested PCR



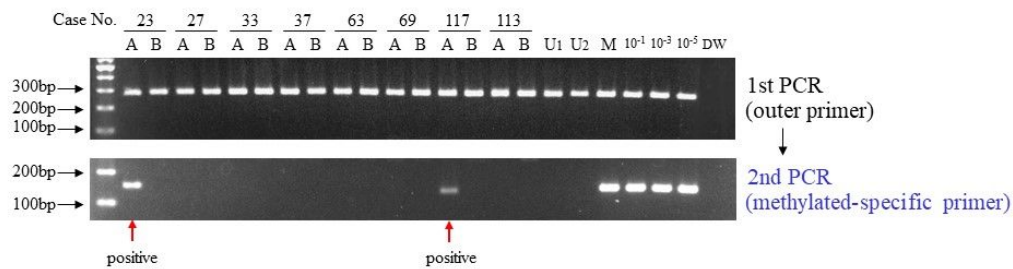
- (2) 原発巣での p16 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の有無の検索をおこなった。50 例の凍結保存された非小細胞肺癌の原発巣から DNA を抽出し、Sodium bisulfite 処理をおこない MS-PCR 法を用いて p16 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の有無を検索した。正常肺でもメチル化が検出された 7 症例を除外すると 43 例中 18 例 (41.9%) にメチル化が検出された。
- (3) そこで原発巣腫瘍組織においてメチル化が認められた 18 例を対象として血清中から DNA を抽出して同様に MS-PCR 法を試みた。18 例中 6 例 (33%) において腫瘍組織と同様のメチル化 DNA が血清から検出された (Fig. 2)。陽性率と術後再発や補助化学療法との効果との関係を

調べたが統計学的な有意差は認めなかった。

- (4) 当初予定されたエフォートが得られず、研究成果としては上記研究方法の(1)、(4)の一部に留まった。

Fig. 2 MS-PCR for serum DNA of clinical cases

Clinical Cases



Clinical samples

A: pre-operative serum DNA
B: post-operative serum DNA

Positive control

M: methylated DNA
10⁻¹~10⁻⁵: diluted methylated DNA

Negative control

U1: normal control DNA 1 (benign case)
U2: normal control DNA 2 (benign case)
DW: distilled water

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	佐藤 征二郎 (Sato Seijiro) (40646931)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	土田 正則 (Tsuchida Masanori) (60293221)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	小池 輝元 (Koike Terumoto) (90635723)	新潟大学・医歯学系・講師 (13101)	