

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20139

研究課題名(和文)腎細胞癌特異的な循環腫瘍DNAの同定と血液バイオマーカーへの臨床応用

研究課題名(英文)Clinical application of circulating-tumor DNA for renal cell carcinoma.

研究代表者

山本 致之(YAMAMOTO, Yoshiyuki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90759557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：現在、腎癌の有用な血液バイオマーカーは存在しない。近年、技術の進歩により多くの癌腫において血中遊離DNAがバイオマーカーとして注目されている。血中遊離DNAは細胞のアポトーシスなどによって産生され、断片長は160～200bpである。本研究の目的は、腎癌における血中遊離DNAの有用性の解明である。我々は、血中遊離DNAの絶対コピー数と断片長に着目した。腎癌における血中遊離DNAの絶対コピー数は診断・予後マーカーとして有用であり、断片長は予後マーカーになりうるということが分かった。

研究成果の概要(英文)：Reliable biomarkers for renal cell carcinoma (RCC) have yet to be found. Recently, circulating cell-free DNA (cfDNA) is getting more attention as an emerging biomarker for several types of cancer. The aim of this study is deciphering the characteristics of cfDNA in RCC patients as novel blood biomarkers. We measured both absolute copy number and fragment size of plasma cfDNA. Our study revealed that the absolute copy number of cfDNA could be the reliable marker for the diagnosis and prognosis of RCC, and that the fragment size of cfDNA might affect the prognosis of RCC patients. Our findings suggest that sequential measurement of these potential biomarkers lead to better understanding of RCC progression.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：腎癌 腎細胞癌 血中遊離DNA バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

腎癌の日本での罹患数・死亡数は、10万人中で18.1人/7.0人であり、近年増加傾向にある。早期腎癌は手術などの局所治療で根治できるが、転移性・再発性腎癌は依然予後不良である。腎癌の診断は、画像検査や組織学的検査でなされるが、CTなどの画像検査は被爆や医療費の問題が、組織学的検査は得られる情報は多いが侵襲性が高く反復して施行できない問題が、それぞれ存在する。また腎癌は典型的な不均一な癌腫であり、一部の組織学的検査では、癌の全容を把握することは困難である。これらの問題を克服する腎癌の血液バイオマーカーが求められている。血液検査は、比較的低侵襲であり、また繰り返し採取可能であり、liquid biopsyともいわれ、癌の診断・モニタリングに有用である。しかし腎癌の確立した血液バイオマーカーは存在しない。近年の技術の進歩により、多くの癌腫において血中遊離DNAが血液バイオマーカーとして注目されている。血中遊離DNAは細胞の壊死、アポトーシス、分泌によって産生され、DNAの断片長は160~200bpである(文献)。血中遊離DNAは、健常者・癌患者共に認め、一般的に癌患者の方がDNA量が多い。多くの癌腫で、血中遊離DNAの診断・予後予測や治療効果予測のバイオマーカーとしての有用性は報告されているが(文献)、腎癌での報告は依然少ない。腎癌における血中遊離DNAの有用性を示し、血液バイオマーカーとして臨床応用を目指すこととした。

2. 研究の目的

腎癌患者における血中遊離DNAの血液バイオマーカーとしての有用性を解明する。

3. 研究の方法

(1) 対象は2015年6月から2017年6月に、当科で診断した未治療の腎癌患者92例及び健常者41例、計133例を対象とした。他の悪性腫瘍を合併している症例は除外した。腎癌患者は全例、生検もしくは手術によって病理組織学的に淡明細胞型腎細胞癌であることを確認した。血中遊離DNAは、血漿からQIAamp circulating nucleic acid kit(QIAGEN社)を用いて抽出した。

(2) 血中遊離DNAの定量は、蛍光定量装置で全DNA量を、ACTBを標的遺伝子とした定量的リアルタイムPCR法で絶対コピー数を、マイクロチップ型自動解析電気泳動装置で断片長を測定した。

(3) 腎癌診断能は、ロジスティック解析とreceiver operating characteristics (ROC) 曲線解析で評価した。また無増悪生存率は、ログランク検定で評価した。

4. 研究成果

(1) 腎癌患者の血中遊離DNAの絶対コピー数は、健常者に比して有意に多く(3803 vs 2242 コピー/ml、 $p < 0.001$)、また臨床病期に従って有意に上昇した(図1)。また、腫瘍径4cm以下の小径腎癌においても、血中遊離DNAの絶対コピー数は健常者に比して有意に多かった(3442 vs 2242 コピー/ml、 $p < 0.001$)。

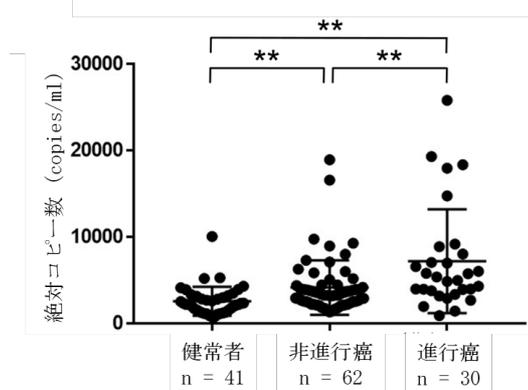


図1 腎癌患者の血中遊離DNAの絶対コピー数は、臨床病期に従って有意に上昇した。 ** $p < 0.01$

(2) 血中遊離DNAの断片長は、マイクロチップ型自動解析電気泳動装置で測定した。腎癌患者の血中遊離DNAの断片長は、健常者に比して短い傾向にあった(170 vs 171 bp、 $p = 0.052$)。また、病理組織学的に高悪性度の腎癌では、血中遊離DNAの断片長が有意に短かった($p < 0.01$)(図2)。

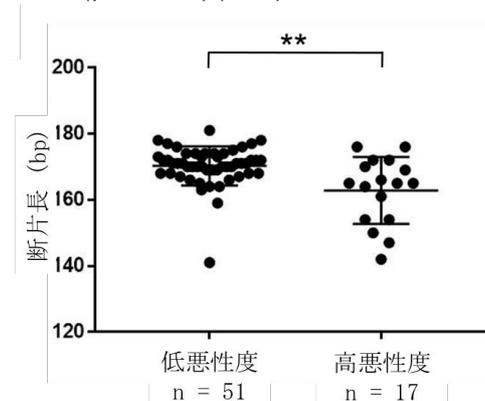


図2 高悪性度(Grade 3以上)の腎癌では、血中遊離DNAの断片長が低悪性度(Grade 2以下)に比して有意に短かった。 ** $p < 0.01$

(3) 腎癌における血中遊離DNAの診断能を評価した。腎癌の予後との関連が報告されている白血球、ヘモグロビン、ナトリウム、アルブミン、CRP、好中球リンパ球比を含めて、ロジスティック解析を行うと、血中遊離DNAの絶対コピー数は独立した腎癌診断予測因子であった(表1)。さらにROC曲線解析による血中遊離DNAの絶対コピー数の腎癌診断能

は、感度 63%、特異度 78%、area under the curve 0.762 であった。腎癌患者の血中遊離 DNA の絶対コピー数は、診断マーカーになりうるということが分かった。

	単変量		多変量	
	P値	オッズ比	95%信頼区間	P値
年齢	<0.001	1.078	1.042 - 1.122	<0.001
性別	0.021	3.642	1.304 - 10.87	0.013
白血球	0.100	-	-	-
ヘモグロビン	0.167	-	-	-
ナトリウム	0.003	-	-	-
アルブミン	0.030	-	-	-
CRP	<0.001	-	-	-
好中球リンパ球比	0.005	-	-	-
血中遊離DNAの濃度	0.988	-	-	-
血中遊離DNAの絶対コピー数	<0.001	1.535	1.117 - 2.257	0.005
血中遊離DNAの断片長	0.009	-	-	-

表1 ロジスティック解析による腎癌診断予測因子の評価

(4) 最後に腎癌における血中遊離 DNA と予後の関係を調べた。血中遊離 DNA の絶対コピー数が高値群ならびに断片長が短い群 (166 bp 以下) では、有意に癌特異的生存率が不良であった(図 3A、B)。血中遊離 DNA の絶対コピー数と断片長は、予後マーカーになりうるということが示唆された。

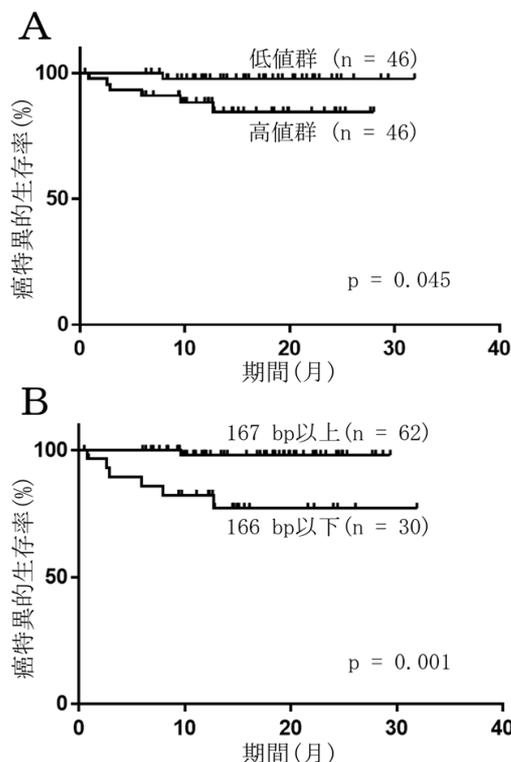


図3 腎癌患者の血中遊離 DNA と予後 (A 絶対コピー数、B 断片長)

(5) 以上より腎癌における血中遊離 DNA の絶対コピー数は診断・予後マーカーに、また断片長は予後マーカーになりうるということが

分かった。本研究を踏まえて、今後多施設・多症例で腎癌における血中遊離 DNA の絶対コピー数と断片長の臨床的有用性の検証も予定している。現在、腎癌の有用な血液バイオマーカーは存在せず、血中遊離 DNA の絶対コピー数と断片長の臨床応用が期待され、患者への負担、医療費の削減を含めた社会への貢献の意義は大きいと考えている。

<引用文献>

Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2011. 11:426-437
DOI : 10.1038/nrc3066
Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*. 2015. 61:112-123
DOI : 10.1373/clinchem.2014.222679

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1件)

Yoshiyuki Yamamoto, Motohide Uemura, Norio Nonomura 他(17人、1番目). Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 査読有. 2018. 9:20467-20475
DOI : doi.org/10.18632/oncotarget.24943

[学会発表](計6件)

Yoshiyuki Yamamoto. The clinical utility of absolute copy number and fragment size of plasma circulating cell-free DNA as novel biomarkers in renal cell carcinoma patients. *American Urological Association* 2018. 2018
Yoshiyuki Yamamoto. Increased concentration and shortness of circulating cell-free DNA could be a diagnostic and prognostic marker, respectively in clear cell renal cell carcinoma. 第106回日本泌尿器科学会総会. 2018
山本 致之、淡明細胞型腎細胞癌における血中遊離 DNA の絶対コピー数と断片長のバイオマーカーとしての有用性、第27回泌尿器科分子・細胞研究会、2018
Yoshiyuki Yamamoto. Analysis of circulating cell free DNA in clear cell renal cell carcinoma patients. 第76回日本癌学会学術総会. 2017

山本 致之、淡明細胞型腎細胞癌における血中遊離 DNA の同定ならびに血液バイオマーカーへの臨床応用、第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017

山本 致之、淡明細胞型腎細胞癌における血中遊離 DNA の同定と血液バイオマーカーへの臨床応用、第 1 回 Liquid Biopsy 研究会、2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 致之 (YAMAMOTO, Yoshiyuki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90759557

(2) 研究協力者

植村 元秀 (UEMURA, Motohide)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：40631015

野々村 祝夫 (NONOMURA, Norio)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30263263