

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04327

研究課題名（和文）進行泌尿器癌における血中ゲノムマーカーの縦断的解析に基づくプレシジョン医療の実現

研究課題名（英文）Genomic analysis of circulating cell-free DNA to achieve precision medicine for advanced urological cancers

研究代表者

山崎 俊成（Yamasaki, Toshinari）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00607749

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンサーとデジタルPCRを用いて、去勢抵抗性前立腺癌（CRPC）由来の血中遊離DNA（cfDNA）のアンドロゲン受容体遺伝子（AR）のコピー数および変異を同定する解析手法を確立した。同様の手法を用いて、腎細胞癌由来cfDNA中のVHL遺伝子変異を同定する解析手法を確立した。CRPC由来cfDNAにおけるAR異常が新規AR経路阻害剤であるアピラテロンの効果予測因子になりうることを確認し、一部の症例ではcfDNAを経時的に採取し、病勢に応じてARの状態が変化することも確認した。腎癌cfDNA中の変異型VHLの割合が腫瘍量の変化とともに経時的に変動する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では治療中の進行前立腺癌・腎癌患者から血中遊離DNA（cfDNA）を採取し、次世代シーケンサーとデジタルPCRといった手法を用いて、cfDNAにおける遺伝子異常を解析する方法を確立した。また、経時的にcfDNAを採取することで、治療経過に応じてcfDNAに認められる遺伝子異常やアレル頻度が変化することを明らかにした。また、特定の薬剤の治療効果とcfDNA中の遺伝子異常に関連があることを見出した。これらの研究成果は、進行泌尿器癌における薬剤感受性や病勢を予測するシステムを構築し、各病態に最も適した治療を選択する“プレシジョン医療”の実現に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：There is a need to develop noninvasive biomarkers to guide treatment. We established a highly sensitive method for analyzing androgen receptor gene (AR) copy numbers and mutations in plasma circulating cell-free DNA (cfDNA) from castration-resistant prostate cancer (CRPC) patients using next-generation sequencer and digital PCR. We also established a method to detect VHL gene mutations in cfDNA from renal cell carcinoma (RCC) patients. AR aberrations in pretreatment cfDNA from CRPC patients were associated with poor response to abiraterone, a novel anti-androgen receptor agent. We also found that the mutation rate of VHL in cfDNA from RCC patients could depend on the tumor volume. cfDNA may become a useful predictive biomarker for precision medicine in patients with advanced urological cancers.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：前立腺癌 腎細胞癌 cfDNA 薬剤感受性 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

近年、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)や腎細胞癌において分子機構に基づく多くの薬剤が使用可能となっている。CRPCの多くはアンドロゲン受容体(AR)の増幅や変異、スプライスバリエーションの出現や、癌細胞によるアンドロゲン合成により、AR経路に依存していることが判明し、同経路をより強力に阻害するエンザルタミドやアピラテロンが開発された。転移性腎細胞癌ではエベロリムスやテムシロリムスといったmTOR阻害剤、スニチニブやアキシチニブなどの血管新生阻害剤による分子標的治療が行なわれ、さらに2016年にはPD1阻害剤ニボルマブが使用可能になった。しかし、治療選択肢は飛躍的に増加したものの、適切な患者に適切な薬剤を投与することは極めて困難になっており、遺伝子情報に基づいて薬剤の感受性を予測できるゲノムマーカーの開発が強く求められる。一方、一般臨床において組織検体の経時的採取はしばしば困難であることから、我々は血中遊離DNA(cfDNA)に着目した。

我々は、AR遺伝子(AR)変異(T878A)を有する前立腺癌細胞株であるLNCaPのDNAを、健常者由来DNAを用いて段階希釈を行い、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスによりAR変異の同定を行った。結果、変異アレル頻度1.0%となるまで希釈を行っても変異の同定が可能であることを確認した(図1)。また、digital PCRを用いると、LNCaP DNAを0.1%まで希釈しても変異の同定が可能であることを確認した(図2)。さらに、ARが増幅している前立腺癌細胞株VCaPのDNAを、AR増幅のないLNCaP DNAに段階希釈し、digital PCRを用いたコピー数解析を行ったところ、VCaP DNAを1.0%まで希釈してもARの増幅が同定可能であった。

これらの背景から、治療中のCRPCおよび腎細胞癌患者から経時的にcfDNAを採取し、CRPC患者におけるAR変異やコピー数異常を、腎細胞癌患者におけるVHL遺伝子(VHL)変異を、それぞれ解析することで、これらの癌種における薬剤感受性や病勢を予測するシステムを構築し、各病態に最も適した治療を選択する“プレジジョン医療”を実現することを着想した。

## 2. 研究の目的

### (1)CRPC

CRPC患者から経時的に採取したcfDNAを用いて、薬剤感受性に関わるAR異常(変異・増幅)を調べ、エンザルタミド・アピラテロンなどの薬剤の治療効果と照合し、薬剤感受性を予測するシステムを構築する。

### (2)腎細胞癌

腎細胞癌患者から採取したcfDNAを用いてVHL変異を同定し、VHL変異を指標としたcfDNA解析結果が病勢マーカーになりうるか検証する。

## 3. 研究の方法

### (1)CRPC

CRPC症例102例からcfDNAを採取した。うち、41例では経時的にcfDNAの採取を行い、合計147サンプルのcfDNAの解析を行った。

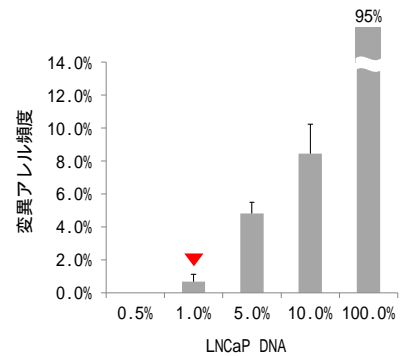


図1 LNCaP DNA段階希釈により同定されたAR T878A変異の変異アレル頻度

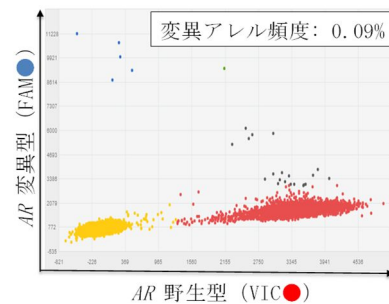


図2 LNCaP DNA 0.1%サンプルのdigital PCR

ARのコピー数解析はdigital PCRを用いて行い、コピー数  $\geq 1.54$  copies/ $\mu$ lを増幅の基準とした。

ARの変異解析では、ARのリガンド結合部位であるexon4 - exon8をマルチプレックスPCRで増幅し、次世代シーケンサーを用いてターゲットシーケンスを行い、バイオインフォマティクス的手法を用いて変異アレル頻度1.0%以上の変異を抽出した。既知の機能的AR変異であるL702H, W742C/L, H875Y, T878Aに関しては、変異アレル頻度が0.5% - 1.0%で検出されればdigital PCRで真の変異であるかどうか確認を行い、確認が取れた場合には変異ありとした。

解析を行った147サンプル中、新規抗アンドロゲン剤であるエンザルタミド・アピラテロン投与直前にcfDNAが採取されたサンプルはそれぞれ24、14サンプル存在した。エンザルタミド耐性に関わるAR異常としては、増幅とF877Lの変異が、アピラテロン耐性に関わるAR異常としては、増幅、L702H、H875Y及びT878A変異が知られている。そこで、cfDNAにおけるこれらのAR異常の有無と、エンザルタミド・アピラテロンの治療効果に関連があるか評価した。

## (2)腎細胞癌

腎細胞癌症例56例からcfDNAを採取した。うち、16例では経時的にcfDNAの採取を行い、合計76サンプルのcfDNA解析を行った。

39症例では腫瘍採取(手術または腫瘍生検による)を行っており、これらの症例では腫瘍DNAの抽出と解析を行った。

ARと同様に、VHLのexon1 - exon3をマルチプレックスPCRで増幅し、次世代シーケンサーを用いてターゲットシーケンスを行い、バイオインフォマティクス的手法を用いて変異アレル頻度1.0%以上の変異を抽出した。変異アレル頻度0.1% - 1.0%の変異に関しては、digital PCRで真の変異と確認が取れるか、または腫瘍DNA中にも存在することが確認された場合に変異ありとした。

## 4. 研究成果

### (1)CRPC

102例の初回採取cfDNAでAR増幅の有無を調べたところ、47例(46.1%)で増幅が認められた(図3)。うち46例は、薬物治療抵抗性獲得時に採取されたcfDNAサンプルであり、薬剤耐性時にはAR増幅が有意に確認された。

102例の初回採取cfDNAでAR変異の同定を行ったところ、25例(24.5%)に合計34個の変異を認めた(図4a)。変異は既知のホットスポット変異であるL702H, W742C/L, H875Y, T878Aに

集中しており、その約半数は変異アレル頻度1.0%未満の低頻度変異であった。同定された変異のうち、変異アレル頻度が3%台と比較的高かったV716Mは、ARタンパクの3D構造解析にてホットスポット変異の近くに存在していることが明らかとなり(図4b)、V716Mが薬剤耐性に関与している可能性が示唆された。

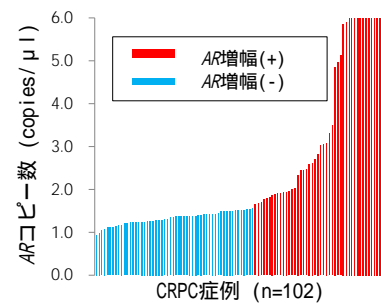


図3 CRPC症例におけるAR増幅の有無

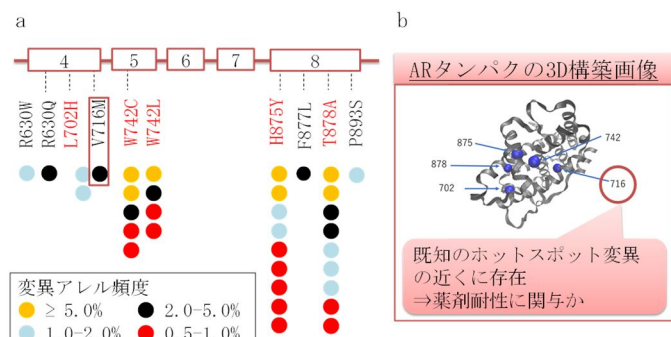


図4 CRPC症例におけるAR変異

新規抗アンドロゲン剤であるエンザルタミド・アピラテロンの治療直前に採取されたcfDNAに

おけるAR異常と、これらの薬剤の治療効果の関連を調べたところ、エンザルタミドの治療効果とAR異常(増幅・F877L変異)の有無に関連は認められなかったが、アピラテロンの治療効果とAR異常(増幅、L702H、H875Y及びT878A変異)の間には関連が認められた(図5)。

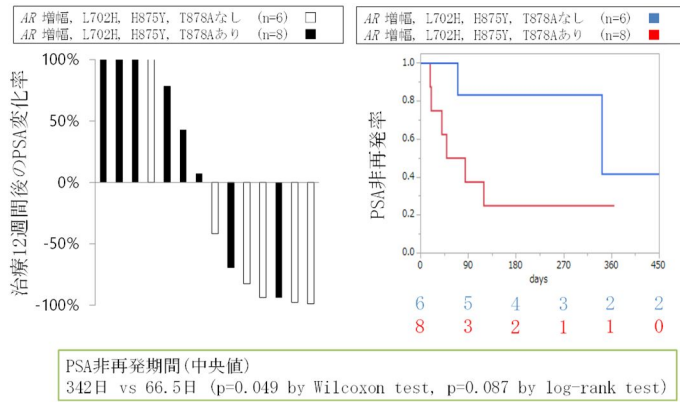


図5 アピラテロン治療前cfDNAにおけるAR異常と治療効果の関連

経時的にcfDNAを採取できた症例の解析では、治療奏効中に採取さ

れたcfDNA中には、元々存在していたAR増幅と変異の消失がほとんどの症例で消失していることが明らかとなった。また、治療耐性時に採取されたcfDNA中には、元々存在していなかったAR異常が新たに出現する場合と、元々存在していたAR異常が消失する場合が混在することを見出した。後者の場合、AR異常以外の別の耐性メカニズムをもったクローンが増殖している可能性が示唆された。

以上の結果より、CRPC患者由来cfDNAのAR解析は、有用で侵襲性の低いバイオマーカーとなり得ると考えられた。

## (2)腎細胞癌

56例の初回採取cfDNAでVHL変異の同定を行ったところ、12例(21.4%)に合計13個の変異を認められた(図6)。うち9個は変異アレル頻度1.0%未満の低頻度変異であった。

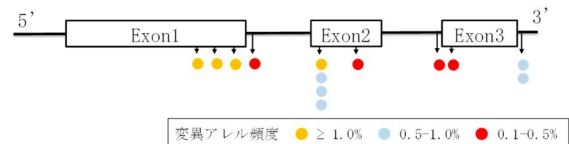


図6 腎細胞癌症例におけるVHL変異

また、Stage IVの腎細胞癌に対する分子標的薬治療中に、経時的にcfDNA採取が行えた

症例が存在した。その症例では、VHL変異の変異アレル頻度が原発巣の腫瘍縮小に伴って減少し(図7)、cfDNAにおけるVHL変異のアレル頻度が腫瘍量と関連して変動する可能性が示唆された。

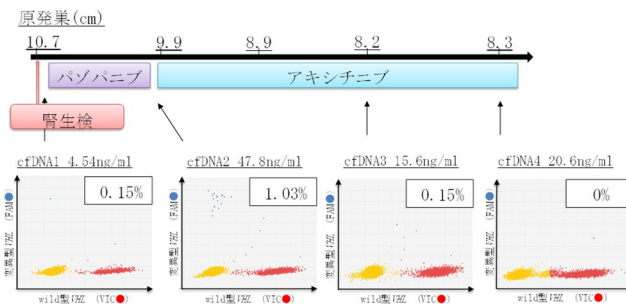


図7 StageIV腎細胞癌の原発巣腫瘍径の変化とcfDNAにおけるVHL変異アレル頻度の推移

一方で、腫瘍DNAが採取できた39例で腫瘍DNAとcfDNAのVHL

変異を比較したところ、腫瘍DNAでVHL変異が同定された症例は27例(69.2%)であり、その27例のうちcfDNAでもVHL変異が同定された症例は8例(29.6%)のみであった。これらの結果から、腎細胞癌由来cfDNAにおけるVHL変異の検出率は低く、検出された場合でも変異アレル頻度は前立腺癌のそれと比較して低値であり、腎細胞癌における血中バイオマーカーとして応用するには検出率の改善が必要であると考えられた。

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 Sumiyoshi T, Mizuno K, Yamasaki T, Miyazaki Y, Makino Y, Okasho K, Li X, Utsunomiya N, Goto T, Kobayashi T, Terada N, Inoue T, Kamba T, Fujimoto A, Ogawa O, Akamatsu S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Clinical utility of androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA as a biomarker for treatment of castration-resistant prostate cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4030
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40719-y.	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 Androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA from patients with castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 第106回泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 Androgen receptor gene aberrations in circulating cell free DNA from Japanese castration resistant prostate cancer patients
3. 学会等名 AUA2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 Detection of Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA from Japanese Castration-Resistant Prostate Cancer Patients
3. 学会等名 38th SIU（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 Detection of androgen receptor gene aberrations in circulating cell-free DNA from Japanese castration-resistant prostate cancer patients
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水野 桂
2. 発表標題 Comparing sequencing of abiraterone and enzalutamide with pre-docetaxel castration resistant prostate cancer
3. 学会等名 Asian Pacific Prostate Society 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌における血漿遊離DNAのアンドロゲン受容体遺伝子異常のバイオマーカーとしての有用性の検討
3. 学会等名 第28回泌尿器分子細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 Digital PCRを用いた去勢抵抗性前立腺癌における血漿遊離DNAのアンドロゲン受容体遺伝子コピー数の同定
3. 学会等名 第105回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 Detection of copy number variations of androgen receptor gene in cell-free DNA from castration-resistant prostate cancer by digital PCR
3. 学会等名 第34回日韓泌尿器科会議（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤松 修輔
2. 発表標題 Dynamic alteration of androgen receptor amplification status detected by ctDNA during treatment of castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 37th Congress of the SIU（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 Digital PCRを用いた去勢抵抗性前立腺癌における血漿遊離DNAのアンドロゲン受容体遺伝子コピー数の同定
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌における血漿遊離DNA中のアンドロゲン受容体遺伝子変異の解析
3. 学会等名 第27回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤松 秀輔
2. 発表標題 淡明型腎細胞癌における血漿遊離 DNA の VHL 遺伝子変異の検討
3. 学会等名 第4回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住吉 崇幸
2. 発表標題 淡明型腎細胞癌における血漿遊離DNA中のVHL遺伝子変異の検討
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 俊成
2. 発表標題 The evaluation of VHL gene in circulating cell-free DNA from patients with renal cell carcinoma
3. 学会等名 第50回腎癌研究会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	赤松 秀輔  (Akamatsu Shusuke)  (20767248)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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	小川 修  (Ogawa Osamu)  (90260611)	京都大学・医学研究科・教授    (14301)	