

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10586

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーとデジタルPCRを用いた食道癌患者末梢血中ctDNAの検出

研究課題名(英文) Detection of ctDNA in patients with esophageal squamous cell carcinoma using NGS and digital PCR

研究代表者

黒川 幸典 (Kurokawa, Yukinori)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10470197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：癌患者の血液中に存在する腫瘍由来遊離DNA(ctDNA)は、腫瘍の持つ遺伝子変異を簡便に診断する手法として注目されている。今回、食道癌患者の治療経過ごとのctDNAを、分子バーコードを用いた次世代シーケンサー(NGS)を用いて行った。その結果、再発時の血液からは分子バーコードの使用の有無に関わらず原発巣と同様の遺伝子変異を検出できたが、術後の血液からは分子バーコードを用いたNGS解析のみ同遺伝子変異を検出できた(0.20%)。以上の結果から、分子バーコードを用いたNGSは食道癌ctDNAの高感度な検出を可能にする有用な手法であ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

BEAMingやデジタルPCRなどといったctDNAの検出に広く行われてきた手法は、特定部位の変異の高感度な検出には優れているが、食道癌のように様々な部位に変異を生じる疾患では汎用性に乏しい。一方、NGSを用いた方法では少数のプライマーセットで網羅的な遺伝子解析が可能であるが、検出感度が低く、いずれも臨床応用には問題点が挙げられる。本研究では、分子バーコードを用いたNGSを用いることで食道癌ctDNAの高感度かつ網羅的な解析に成功した。本手法はctDNAを用いた臨床診断に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Next-generation sequencing (NGS) with molecular barcodes (MB) is a novel method that enables the highly sensitive detection of circulating tumor DNA (ctDNA) in a relatively wide range of genes. We examined the utility of NGS with MB for detecting ctDNA in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) at each time point during the treatment course. The maximum frequency of background errors were 3.22% using NGS without MB and 0.08% with MB, which indicated that the sensitivity of ctDNA detection using NGS with MB was much higher than without MB. In 1 patient who had recurrence half a year after surgery, only NGS with MB could detect ctDNA even at 4 weeks after surgery, at a frequency of 0.20%. Overall, NGS with MB enabled comprehensive and highly sensitive detection of ctDNA in a patient with ESCC. This novel method may be useful for the clinical diagnosis of ESCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道外科学 ctDNA 次世代シーケンサー 分子バーコード liquid biopsy

## 1. 研究開始当初の背景

食道癌は非常に予後の悪い疾患であり、手術、化学療法、放射線治療の併用による治療成績の向上をもってしても、5年生存率は20-30%程度である。さらなる治療成績の向上に向け、再発の早期発見や抗癌剤投与の至適時期、効果判定などに有用な高感度バイオマーカーの発見は重要な課題である。

癌患者の末梢血中に微量に存在する腫瘍由来遊離 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA)は、体内の腫瘍量と相関し、腫瘍由来の遺伝子変異を有するため、非侵襲的かつリアルタイムに測定可能なバイオマーカーとして世界中で注目されている (Diehl F, et al. Nat Med 2008)。我々はこれまでに BEAMing 法や次世代シーケンサー (Next-generation sequencing: NGS) という手法を用いて胃癌や食道癌、GIST における ctDNA の研究を行ってきた (Hamakawa T, Kurokawa Y, et al. Br J Cancer 2015; Wada N, Kurokawa Y, et al. Oncology 2016)。しかし、胃癌においては原発巣における遺伝子変異の同定割合が低いという問題が判明したため、我々は TP53 の変異頻度が約 9 割と他の癌腫と比べても非常に高い食道癌に着目した。

また、ctDNA の検出方法において、従来の NGS と比較してよりシーケンスエラーが少なく、より迅速かつ安価に末梢血中の ctDNA を検出することができるデジタル PCR という手法が近年注目されている。本手法は、ctDNA の日常臨床への応用に適していると考えられ、今後の更なる発展が期待されている。

一方で、別の ctDNA の検出方法として、DNA の対象遺伝子領域に分子バーコードを付加した上で PCR 増幅を行い、NGS により解析を行う手法が新たに開発された (Kinde I, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2011)。この分子バーコードを用いた NGS を用いることで読み取りエラーや PCR エラーを除去し、末梢血中に微量に存在する ctDNA の高感度かつ網羅的な解析が可能となる。本手法はデジタル PCR と同様に日常臨床により適した手法と考えられ、現在様々な研究が進められている。

## 2. 研究の目的

本研究は、食道癌患者の末梢血における ctDNA に対し、NGS とデジタル PCR などによる最新の分子学的手法を用いて ctDNA の検出を行い、早期発見や再発診断、薬物治療効果判定などの臨床応用につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

当院で診療を行った食道癌患者を対象とした。治療のために当科で切除された食道癌組織を収集して DNA を抽出した。また、同患者における治療経過の各時点(治療前、術前)での血液を採取し、同様に DNA の抽出を行った。食道癌の約 90% に変異が認められている TP53 遺伝子に着目し、同遺伝子の結合ドメイン領域における変異を、NGS を用いて検索した。治療前の血液にて TP53 遺伝子変異を認めた 1 例 (Patient1) に対しては、更に術後、再発後の血液を採取し、分子バーコードを用いた NGS と用いない NGS とによる解析を行うことで、その検出感度を比較検討した。

(1) 組織および血液採取と DNA の抽出: 手術切除標本から腫瘍組織を採取した。採取後ただちに -80 で凍結保存した。腫瘍組織からの DNA の抽出は QIAamp DNA Mini Kit を用いて行った。血液は術前治療前、術前 (Patient1 ではさらに術後、再発後) に 7ml 採取し、超遠心により debris を排除した血漿の状態、ただちに -80 で凍結保存した。血漿からの DNA 抽出は QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて行った。Quality control および cfDNA 濃度の測定は Qubit dsDNA HS Assay Kit を用いて行った。

(2) 分子バーコードを用いない NGS 解析: TP53 遺伝子の結合ドメイン領域に対して GeneRead DNAseq Custom Panel V2 を用いて PCR 増幅を行い、Reagent Nano Kit V2 および MiSeq によるシーケンスを行った。得られた塩基配列は GeneRead targeted enrichment panel variant-

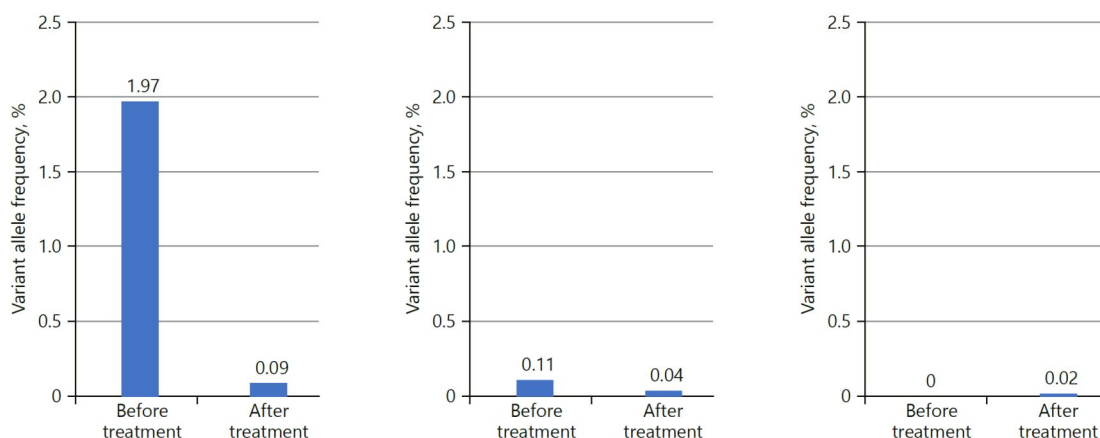
calling web service を用いて解析を行い、変異部位の同定を行った。更に、微小変異の検出にはフリーソフトである Integrative Genomics Viewer を用いて variant allele frequency (VAF) を算出した。

(3) 分子バーコードを用いた NGS 解析: Nonoverlapping integrated read sequencing system (NOIR-SS)法による分子バーコード NGS 解析を行った(Kukita Y, et al. DNA Res 2015)。シーケンスは Ion Torrent Proton sequencer を用いて行い、得られたデータは Torrent Suite を用いて変換した。同じバーコードでタグ付けされた read はグループ化し、エラーと考えられるものは除外した。COSMIC ver.78 によるフィルタリングを行い、これらにない variant は除外した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 腫瘍組織および血液における TP53 変異

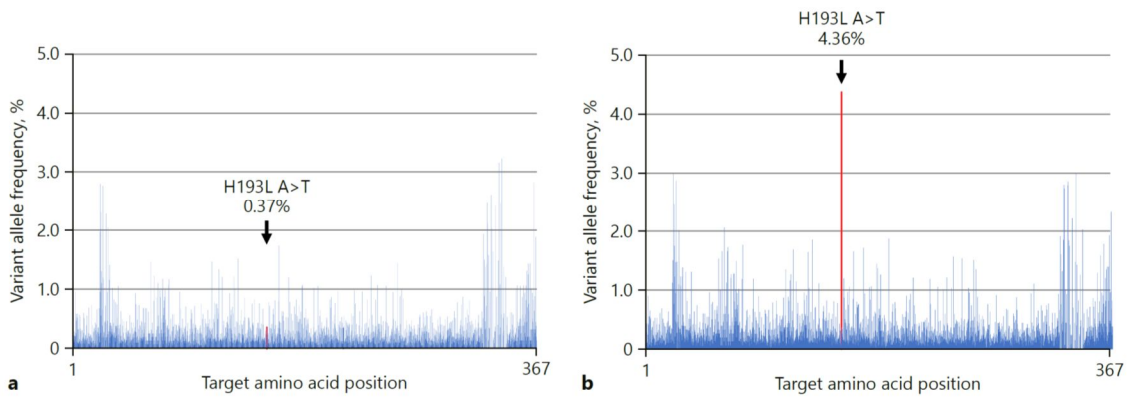
当科で手術を施行した、食道扁平上皮癌 5 例のうち、3 例に TP53 遺伝子変異を認めた。これらの 3 例のうち 1 例 (Patient1) で治療前変異遺伝子の VAF=1.97% と上昇を認め、DCF 治療後に 0.09% と低下を認めた。残りの 2 例においては、治療前、術前共に原発で認められた TP53 遺伝子変異の VAF の上昇は認めなかった。



本研究では当初より NGS とデジタル PCR を用いた ctDNA の解析を予定していたが、今回の腫瘍組織における TP53 遺伝子変異解析や過去の報告から、食道癌の TP53 変異部位は多岐にわたっており、いわゆる hot spot と考えられる部位が存在しないことが判明した。よって TP53 遺伝子の網羅的な解析が必要と判断し、以降の研究は、デジタル PCR ではなく、分子バーコードを用いた NGS による ctDNA の解析を進める方針とした。

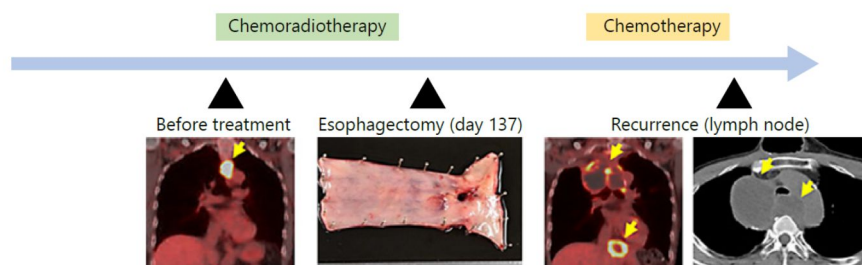
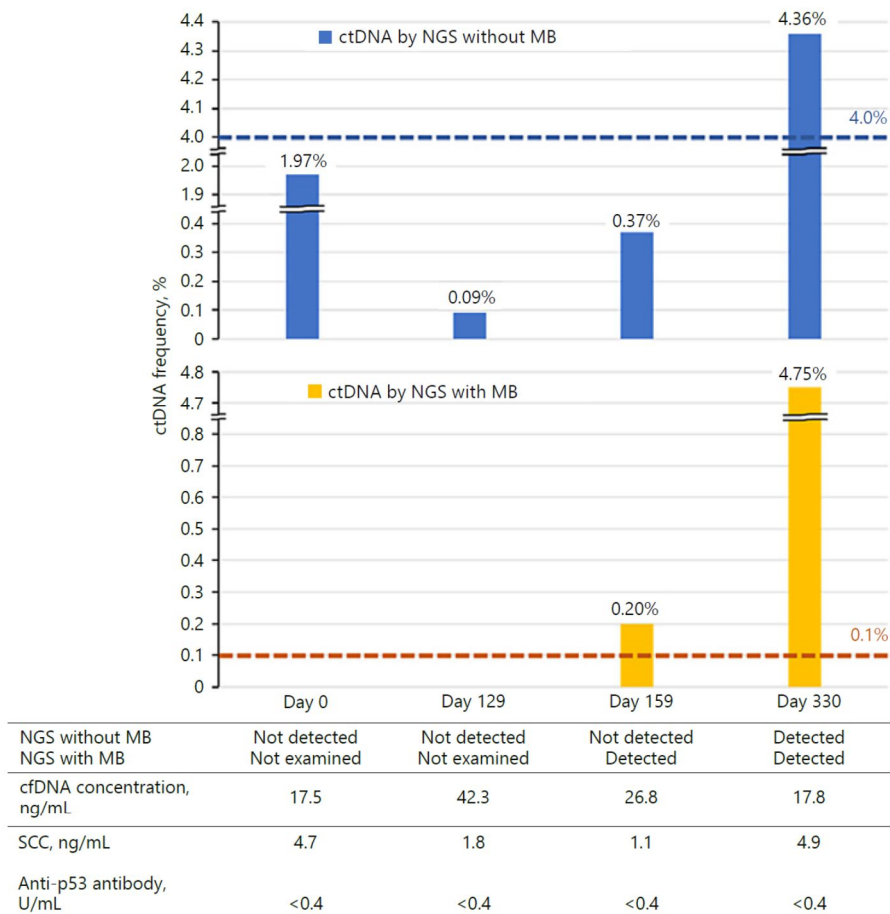
##### (2) 分子バーコードを用いた NGS、用いない NGS における ctDNA の検出閾値の設定

Patient1 における、術後および再発後の血液より DNA を抽出し、分子バーコードを用いた NGS、用いない NGS の両方で TP53 遺伝子解析を行った。分子バーコードを用いない NGS では、解析領域における PCR によるエラーなどと考えられる Single nucleotide variants (SNVs) は術後血液で 0-3.22%、再発後血液で 0-2.99% の範囲で認められた。これらの結果から分子バーコードを用いない NGS における変異検出閾値は 4% 程度であると推定された。分子バーコードを用いた NGS では、解析領域における PCR によるエラーなどと考えられる Single nucleotide variants (SNVs) は術後血液で 0-0.04%、再発後血液で 0-0.08% の範囲で認められた。これらの結果から分子バーコードを用いない NGS における変異検出閾値は 0.1% 程度であると推定された。これらの閾値を元に標的遺伝子変異の変異を解析したところ、術後血液においては分子バーコードを用いない NGS では変異を認めなかった (VAF=0.37%) が、分子バーコードを用いた NGS では同部位の変異を認めた (VAF=0.20%)。一方で、再発後血液においては分子バーコードを用いない NGS、用いた NGS 共に同部位の変異を認めた (VAF=4.36%, 4.75%)。



### (3) ctDNA の推移と腫瘍の臨床経過

Patient1 における、ctDNA の推移と腫瘍病勢との関連性について検討した。分子バーコードを用いない NGS では、再発後の血液のみから標的遺伝子変異が検出できた (VAF=4.36%)。一方で分子バーコードを用いた NGS では、再発後血液に加え (VAF=4.75%)、術後の血液からも標的遺伝子変異が検出可能であった (VAF=0.20%)。既存の腫瘍マーカーである、SCC や抗 p53 抗体も同時点では有意な上昇は認めず、分子バーコードを用いた NGS による ctDNA 解析により腫瘍の早期再発予測が可能となる可能性が示唆される結果であった。



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 0件）

1. 著者名 Hagi Takaomi, Kurokawa Yukinori, Takahashi Tsuyoshi, Saito Takuro, Yamashita Kotaro, Tanaka Koji, Makino Tomoki, Yamasaki Makoto, Nakajima Kiyokazu, Mori Masaki, Doki Yuichiro	4. 巻 98
2. 論文標題 Molecular Barcode Sequencing for Highly Sensitive Detection of Circulating Tumor DNA in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 222 ~ 229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000504808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	山崎 誠  (Yamazaki Makoto)  (50444518)	大阪大学・医学系研究科・准教授    (14401)	