

令和元年5月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16789

研究課題名(和文) 循環腫瘍DNAに着目した腎癌特異的変異の同定とリキッドバイオプシーへの臨床応用

研究課題名(英文) Identification of renal cancer-specific mutations in circulating tumor DNA and its clinical application to liquid biopsy

研究代表者

石津谷 祐 (Ishizuya, Yu)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00783854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：淡明型腎細胞癌に特化した独自の遺伝子変異パネルを作成し、進行性腎細胞癌5症例の癌ゲノムと血中遊離DNA(cell free DNA:cfDNA)のシーケンスを行った。全症例癌ゲノムに変異を認め、2症例(40%)でcfDNAに変異を認めた。cfDNAで同定した変異は癌ゲノムと同一のもののほか、癌ゲノムでは同定されなかった変異もあり、cfDNAの変異は腫瘍の不均一性を克服するバイオマーカーとなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎細胞癌には低侵襲かつ簡便な診断・モニタリングのためのバイオマーカーが存在しないことが課題である。本研究では腎細胞癌の中でも最も頻度の高い淡明型腎細胞癌に特化した遺伝子変異パネルを作成しシーケンスを行うことで、血中遊離DNAの変異を同定し得た。この結果を元に多検体を用いた解析を進めることが可能となり、バイオマーカーとしての臨床応用につながる点で社会的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We created an original gene mutation panel for clear renal cell carcinoma, and sequenced the cancer genome and cell free DNA (cfDNA) of 5 cases of progressive renal cell carcinoma. Mutations in cancer genome were detected in all cases, whereas mutations in cfDNA were detected in 2 cases. Mutations identified in cfDNA are not only identical to the cancer genome, but also to mutations not identified in the cancer genome, suggesting that mutations in cfDNA are biomarkers for overcoming tumor heterogeneity.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：腎細胞癌 循環腫瘍DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)腎細胞癌の診断や治療経過のモニタリングは画像診断のみで行われており、確立されたバイオマーカーは存在しない。摘除癌組織における遺伝子変異や発現プロファイルが、予後予測のためのバイオマーカーとして有用であることが報告されている。しかし、多くの癌種で heterogeneity の存在が報告されており、腎細胞癌はその典型であるため、原発巣や生検で採取した組織のみから癌の全体像を把握することは困難である。また、治療経過のモニタリングのために繰り返し組織採取を行うことは患者への侵襲が比較的大きいことが問題である。

(2)近年、腫瘍組織ではなく体液を採取することで低侵襲的にバイオマーカーを測定し診断を行うリキッドバイオプシーが注目されている。血中遊離 DNA (cell free DNA; 以下 cfDNA) に含まれる循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA; 以下 ctDNA) がリキッドバイオプシーの解析対象として有力である。ctDNA は腫瘍細胞の壊死、アポトーシス、分泌によって産生され、遺伝子変異、メチル化、コピー数異常などを伴う。ctDNA は全身に存在する癌に由来するため、癌の全体像を反映し、heterogeneity の問題を克服し得ると考えられる。また、血液は繰り返し採取することも容易であり治療経過のモニタリングに最適である。大腸癌や乳癌では、ctDNA はそれぞれの血清腫瘍マーカーよりも、癌の再発の検出感度が優れていることや生存率との相関があることが報告されており、既存のバイオマーカーよりも鋭敏に病勢を反映する可能性がある。また、いくつかの癌種において cfDNA の断片長が予後予測マーカーになるとの報告もあり、cfDNA や ctDNA は新規バイオマーカーとして有望であるが、腎細胞癌における有用性の報告は例をみない。

### 2. 研究の目的

腎細胞癌患者の循環腫瘍 DNA の遺伝子変異を同定し、新規バイオマーカーとしての有効性を検討すること。

### 3. 研究の方法

#### (1)血漿からの cfDNA の抽出と確認

7ml の全血より血漿を採取し、血漿より QIAamp circulation nucleic acid kit (Qiagen) を用いて cfDNA を抽出した。cfDNA が抽出できていることをマイクロチップ型電気泳動装置 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology) で確認した。

#### (2)淡明型腎細胞癌特異的遺伝子変異パネルの作成

微量な cfDNA のシーケンスを行うため、特定の領域を重点的に深くシーケンスする必要がある。全エクソンシーケンスではなくターゲットシーケンスを選択した。腎細胞癌の病理組織の約 80% を占める淡明細胞型腎細胞癌に関して、Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) や The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータベース、遺伝子変異の各報告より、約 2 万種類の遺伝子の中から、変異頻度や腎細胞癌発生・増殖の pathway への関連、分子標的治療薬の標的遺伝子を遺伝子の選択基準とした。

#### (3)次世代シーケンスによる腎細胞癌ゲノム DNA および血中遊離 DNA における変異の同定

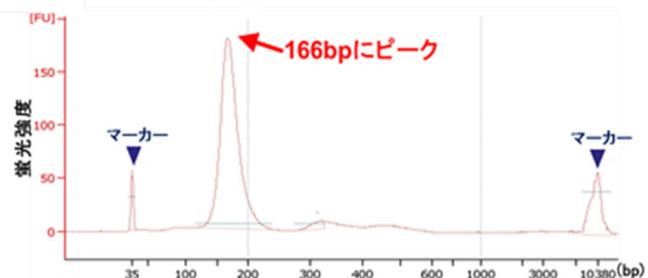
大阪大学医学部附属病院で診断・治療を行った腎癌患者 5 例を対象とした。全例病理学的に淡明型腎細胞癌と診断した。血漿由来 cfDNA と白血球由来生殖細胞ゲノム、および腎癌組織由来癌ゲノムをターゲットシーケンスした。シーケンサーは HiSeq2500 (Illumina) を使用した。cfDNA は 1 サンプル当たり 10Gb、癌ゲノムおよび生殖細胞ゲノムは 1 サンプル当たり 0.5Gb 読んだ。解析パイプラインは Genomon2 を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1)血漿からの cfDNA の抽出と確認

抽出した DNA をマイクロチップ型電気泳動装置で確認した(図 1)。症例毎に違いはあるものの、一般的に cfDNA の断片長として知られる 166bp 前後にピークを認め、cfDNA が抽出できていることが確認できた。

図 1. マイクロチップ型電気泳動装置による cfDNA の確認



#### (2)淡明型腎細胞癌特異的遺伝子変異パネルの作成

COSMIC 及び TCGA のデータベースにおいて、淡明型腎細胞癌において 1% 以上の頻度で体細胞変異が報告されている 1316 遺伝子のうち、2% 以上のコピー数増幅が報告されている 15 遺伝子、Driver 遺伝子として報告されている 35 遺伝子、2.5% 以上の変異が報告されている 18 遺伝子 (重複あり) など、計 48 遺伝子を選択した(図 2)。

(3)次世代シーケンスによる腎細胞癌ゲノム DNA および血中遊離 DNA における変異の同定

臨床病期 III もしくは IV の淡明型腎細胞癌 5 症例で癌ゲノム・cfDNA 両方のシーケンスを行い変異を同定した(図 3)。全ての症例で癌ゲノムに変異を認めた。癌ゲノムにおける変異アレル頻度は 2.1-60.2%であった。4 例(80%)に *VHL* 変異、3 例(60%)に *PBRM1* 変異を認めた。公共のデータベースと同様に最も高頻度に変異を認める遺伝子は *VHL* であった。*VHL* には変異ホットスポットがないことが知られているが、本研究においても *VHL* 変異を認めた 4 症例はいずれも異なる変異であった(図 4)。

cfDNA 中に変異を認めたものは 2 例(40%)であった。cfDNA における変異アレル頻度は 1.2-17.4%であった。cfDNA に変異を認めた 2 症例のうち 1 症例(症例番号 1)では cfDNA に 5 つの変異(*VHL*, *TP53*, *TSC1*, *BAP1*, *FPGT*)を認め、癌ゲノムで認めた変異と完全に一致していた。一方、もう 1 症例(症例番号 2)では cfDNA に 2 つの変異(*TSC1*, *MTOR*)を認めたが、*TSC1* 変異は癌ゲノムでは同定されておらず、癌組織の一部のみを対象としたシーケンスでは同定できない変異を cfDNA で同定し得ること、つまり cfDNA に着目することで heterogeneity の問題を克服できることを示唆する結果が得られた。

図 2. シーケンス対象遺伝子

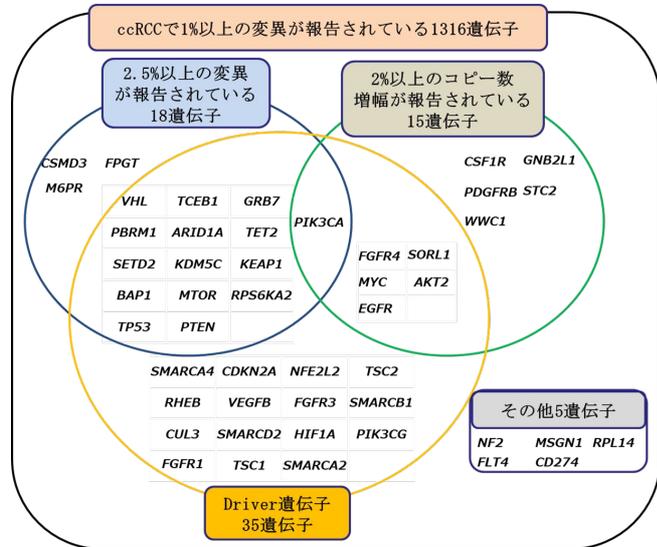


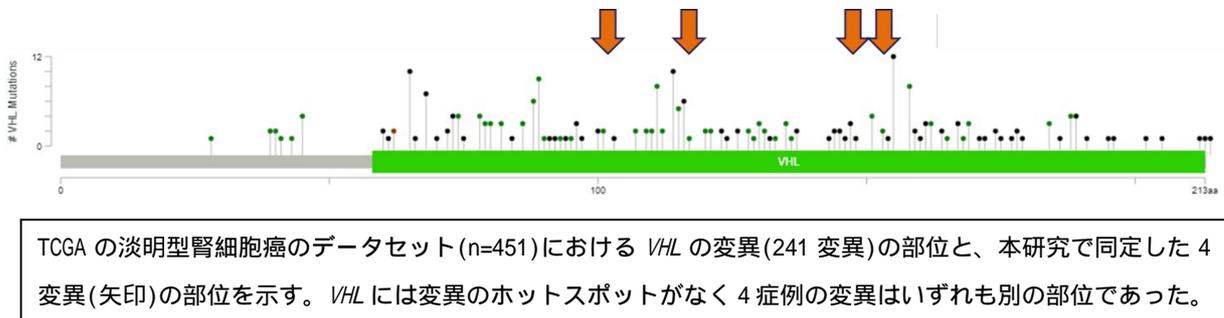
図 3. 5 症例における癌ゲノム・cfDNA の遺伝子変異

症例番号	1		2		3		4		5	
年齢(歳)	73		66		73		70		68	
性別	男		女		男		男		女	
臨床病期	IV		III		III		III		IV	
サンプル	癌ゲノム	cfDNA								
変異数	5	5	3	2	4	0	2	0	3	0
<i>VHL</i>	5.7	6.9	4.1		12.5				53.8	
<i>PBRM1</i>					17.4		25.4		60.2	
<i>TP53</i>	4.4	9.1	2.5							
<i>TSC1</i>	14.3	17.4		1.2						
<i>BAP1</i>	8.6	10.5								
<i>FPGT</i>	13.7	9.4								
<i>MTOR</i>			5.7	1.4						
<i>SETD2</i>					14.8					
<i>KDM5C</i>					27.5					
<i>KEAP1</i>							2.1			
<i>ARID1A</i>									35.5	

■ MISSENSE (Blue)  
 ■ NONSENSE (Yellow)  
 ■ INDEL (Green)  
 ■ SPICING (Orange)

数値は変異アレル頻度

図 4. *VHL* 変異を認めた 4 症例における変異部位



本研究の結果、独自の腎癌変異パネルを用いた次世代シーケンスにより腎癌ゲノムおよび腎癌患者血漿由来 cfDNA における変異を同定できること、同一症例において cfDNA のみで同定できる変異があり、cfDNA における変異は heterogeneity の問題を克服したバイオマーカーとなり得ることが明らかとなった。今後は多検体でシーケンスを行い、cfDNA における変異と臨床病理学的因子の関連や、予後や薬物療法奏効予測のバイオマーカーとしての有用性を検討す

る予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。