

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07451

研究課題名(和文) 遺伝子検査における cfDNA の品質管理と品質チェックシステムの構築

研究課題名(英文) Construction of cfDNA quality management and quality check system in genetic testing

研究代表者

佐藤 明美 (Sato, Akemi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20568357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：circulating cell free DNA(cfDNA)を使用したLiquid biopsyは、再生検の推奨される代替方法である。cfDNAによる品質管理が不可欠であり、高品質のcfDNA分離を実現することが望まれている。今回、標準的な臨床検査室で通常の手順として実行されるcfDNA分析に対する分析前の手順の影響と、長期保管によるcfDNA品質の低下の程度について調べた。cfDNA分析に対する分析前の手順の影響については抗凝固剤はEDTA 2Kよりも3.2%クエン酸ナトリウムを含む方がcfDNAの品質は優れており採血後最大72時間、4℃で保存して維持したものが良いことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Liquid biopsy検体については国内外多くの研究があり、それは主に検査系の開発やその機能解析である。検体そのものについては4～5年前から少しずつ論文となっているが、現在cfDNAについては血清ではなく血漿から抽出されているのが現状である。今回の研究成果では、cfDNA分析に対する分析前の手順の影響については抗凝固剤の種類、保存温度、および血液分離の期間の間の比較は、cfDNAの定量化、cfDNAのサイズ分布、およびEGFR変異の検出の観点から解析を行い、Liquid biopsyの標準化された分析前手順の確立に近づいていると考えている。

研究成果の概要(英文)：Liquid biopsy with circulating free DNA (cfDNA) is a recommended alternative method of re-biopsy. Quality control with cfDNA is indispensable for precise examinations, and it is desirable to achieve high-quality cfDNA separation. We investigated two issues: the influence of pre-analytical procedures on cfDNA analysis performed as a routine procedure in a standard clinical laboratory, and the extent of deterioration of cfDNA quality due to long-term storage. Comparisons among blood collection tube types, storage temperatures, and periods of blood separation were performed in terms of cfDNA quantification, cfDNA size distribution, and detection of EGFR mutations. Quality of cfDNA was better with collection tubes containing 3.2% sodium citrate than with those containing EDTA 2K, and was maintained with storage at 4℃ for up to 72 h after blood collection, equivalent to results with cell-stabilizing blood collection tubes.

研究分野：臨床検査学・腫瘍分子生物学

キーワード：Liquid biopsy cfDNA 品質管理 遺伝子検査

1. 研究開始当初の背景

近年、cfDNA など末梢血を用いた Liquid biopsy 検体による遺伝子検査は治療法の選択や治療経過のモニタリングとして臨床応用され、Liquid biopsy 検体については多くの研究が進められている。しかし、多様化する検査法とは異なり、Liquid biopsy 検体自身の採取法や保存期間・温度などは不明な点が多い。

これまで我々は Liquid biopsy 検体である血漿 DNA が微量であるため、それを検出する方法として高感度全自動変異検出系 mutation-biased PCR and quenched probe (MBP-QP)法を開発し、肺がん患者 EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤耐性化モニタリングを行ってきた(Nakamura, *J Thorac Oncol*, 2011, 2012)。非侵襲的な検査法であるために何度も採取することができ、病期の進展や転移などの時、遺伝子レベルで何が起こっていたかさかのぼって検査し、新たな知見を得ることができる検体であるため、より良い品質の検体を得ること、そしてその品質を保つことは重要課題であると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は遺伝子検査における cfDNA 検体の最適な採取方法や保存方法を明らかにするとともに品質のチェック方法の構築を行うことである。

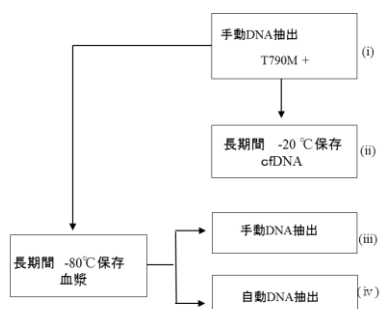
独自性と創造性は以前より血漿 DNA について研究を行っているため cfDNA としての検体を多く持っていること、その当時の血漿検体も保存していることから、血漿 DNA での保存と血漿での保存の比較ができる。また過去の検体がどのくらい遺伝子検査に耐えるのか、その検体がどのような品質であるのか明らかにすることができる。cfDNA 検体になるまでの過程、採血⇒血漿分離⇒血漿 DNA 抽出においても最適条件を深く検討し、cfDNA を使用した Liquid biopsy の標準化された分析前手順の確立を目的としている。

3. 研究の方法

①cfDNAに最適な抗凝固剤の検討及び採血後処理までの時間と温度の検討

健康人の採血をいくつかの抗凝固剤によって行い、その後血漿分離までの時間・温度を変え、cfDNA を抽出する。そしてその DNA の濃度やサイズ分布を確認し、最適な条件を見出す。濃度は 2 本鎖の DNA のみを測定する Quantus を用いる。サイズ分布についてはバイオアナライザを用いて行う。さらにかん患者でも同様に行い、健康人との比較を行う。

②長期保存する場合、最適な保存検体は血漿と cfDNA のどちらが適しているか



過去に手動DNA抽出により採取された血漿DNAの中で EGFR T790M 変異を有する検体(i) が7年間 -20℃で保存されておりこれを再度MBP-QP法にて再検査する(ii)。 (i)と(ii)の結果を比較することによりDNAでの品質劣化を表すことができる。長期間-80℃に保存した血漿からDNAを抽出してMBP-QP法によって検査する(iii)。 (i)と(iii)を比較することで血漿での保存とcfDNAでの保存で保存する状態を決定する。

さらに血漿に余裕がある検体については DNA 抽出方法を変え(iv)、 (i)~(iv)の比較より、血漿で保存されている検体を今後どうするか検討を行う。品質についてはどのような検体が劣化しやすいのかを検討する。

③cfDNAの保存期間による影響

長期間-20℃に保存した EGFR T790M 変異を有するcfDNA 検体(ii)については MBP-QP 法による T790M 検査に加えて、DNA サイズ分布の解析をバイオアナライザにて行う。

④cfDNA抽出法の検討

現在cfDNAのNGSにむけて血漿量を増やしDNA抽出が行われている。これまでは1ml血漿からDNA抽出での最適化を行ってきたので、NGSに最適な血漿量や最終濃度を明らかにする。

4. 研究成果

①抗凝固剤および保存条件におけるcfDNAの品質への影響

10人の健康なボランティアから末梢血を採取し、8本はクエン酸ナトリウム、8本はEDTA 2Kの採血管に分けた(Fig. 1)。健康なボランティアは40代が2人、30代が8人で、血液は、直ちにcfDNA分離を行うか、cfDNA分離を実行できるようになるまで、4°Cまたは室温(RT)で図に示す期間保存した。血漿分離は、3000 rpmで20分間、4°Cで遠心分離し、その後、800 μLの上清からcfDNA抽出を行った。

まず、cfDNA濃度に対する保存の影響についてはクエン酸ナトリウムを使用した結果をFig. 2Aに示す。cfDNA濃度は、4°Cで採血してから72時間後まで有意に変化しなかったが、RTでは72時間までに有意に上昇した($p < 0.001$)。採血後1週間保存すると、4°Cで保存してもcfDNA濃度の大幅な上昇が認められた。EDTA 2Kでは、採血直後のcfDNA濃度の中央値は8.8 ng/mL血漿であった(Fig. 2B)。cfDNA濃度は、4°CおよびRTどちらにおいても72時間および1週間有意(4°C: $p = 0.021$ RT: $p < 0.001$)に上昇した。次に、cfDNAのサイズ分布については、各条件の代表的な結果を、クエン酸ナトリウム(Fig. 2C、E)およびEDTA 2K(Fig. 2D、F)についてFig. 2に示す。血液を4°Cで保存した場合、クエン酸ナトリウムで170 bpに単一のピークが観察された(Fig. 2E)。ただし、採血の72時間後にEDTA 2Kで1~9 kbの大きなcfDNAが現れた(Fig. 2F)。RTで保存すると、両方の抗凝固剤で、採血後1週間では大きなcfDNAの量が増加した(Fig. 2C、D)。Fig. 2には示していないが、他の健康なボランティアから得られた検体の結果も同様であった。

cfDNAサイズ分布をさらに評価するために、大きなフラグメントサイズはゲノムDNAによるものと考え、4°Cで保存した後のフラグメントサイズの2つのクラス(大きなフラグメント: 1~9 kb、Fig. 2Gと小さなフラグメント: 100~250 bp、Fig. 2H)でcfDNA濃度を測定した。4°Cで保存した後の大きな断片の濃度は、EDTA 2Kでは72時間で有意に高かったが、クエン酸ナトリウムではそうではなかった(Fig. 2G)。ただし、4°Cで保存した後の短い断片の濃度は、どちらのタイプの抗凝固剤でも1週間まで変化していなかった(Fig. 2H)。これらの結果は、血液検体を4°Cで保存し、cfDNAの品質を維持するためにクエン酸ナトリウムを使用して72時間以内に血漿分離を行う必要があることを示唆している。上記の結果に基づいて、クエン酸ナトリウムにて採血後、NSCLC患者から分離されたcfDNAのEGFR変異L858Rの検出に対する4°CおよびRTでの保存の効

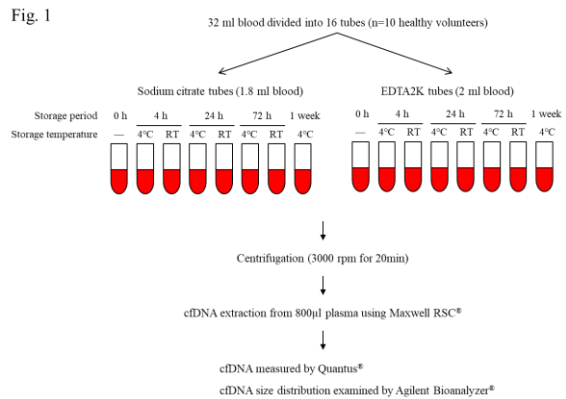


Fig. 2

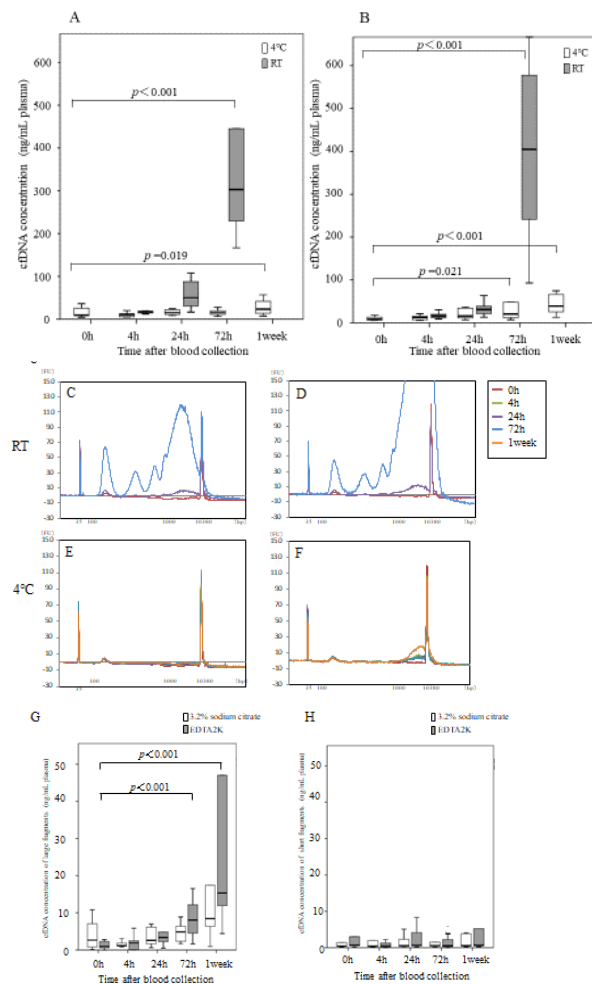
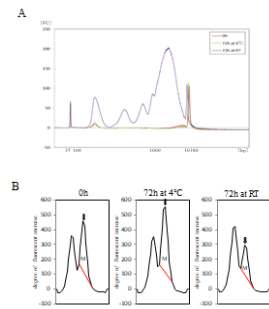


Fig. 3

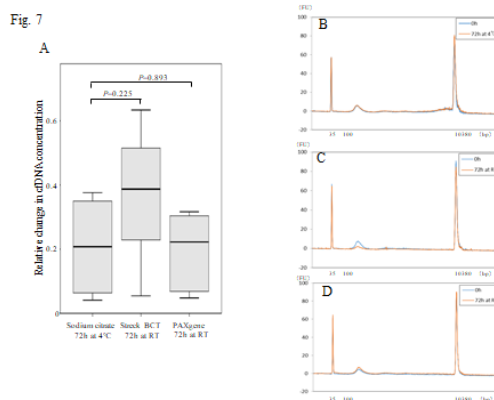
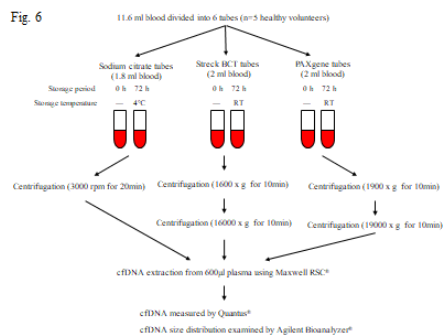
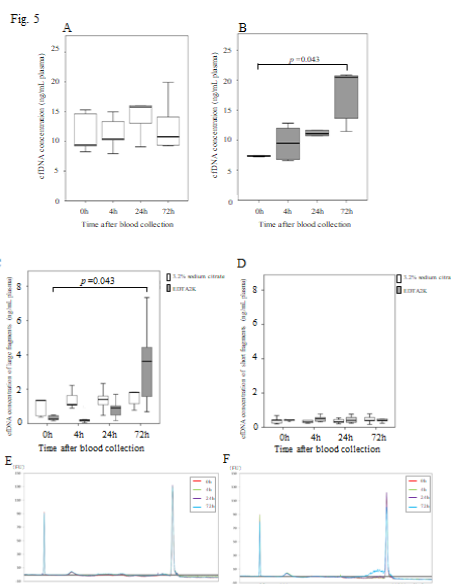
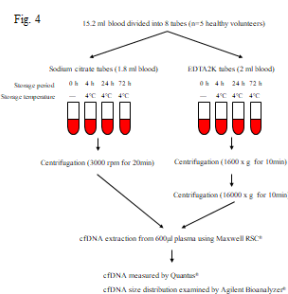


果を比較した(Fig 3)。EGFR L858R 変異を有する進行性肺癌の 1 人の患者から、合計 5.4ml の採血を行った。患者の侵襲性を最小限に抑えるために、治療に必要な臨床検査と併せて採血を行った。血液を 3 本のクエン酸ナトリウムに分け、1 本はすぐに cfDNA 分離にかけ、もう 1 本は cfDNA 分離の前に RT または 4°C で 72 時間保存した。健康なボランティアの場合と同様に、RT での保存では比較的大量の大きな cfDNA を観察した(Fig 3A)。L858R の量は、変異ピーク下の面積(M)を測定することによって評価した(Fig 3B)。L858R の面積は、RT での保存では採血後 72 時間で低かったが、4°C での保存では採血直後すぐに採取したものと変わらなかった。cfDNA 濃度が高いにもかかわらず、RT 保存後の L858R の面積が低かったことは、検体を RT のままにしておくと、ゲノム DNA によるコンタミネーションが発生し、ゲノム変化の過小評価につながることを示唆している(Fig 3B)。

②クエン酸ナトリウム採血の cfDNA と市販の細胞安定化採血管の cfDNA の品質比較

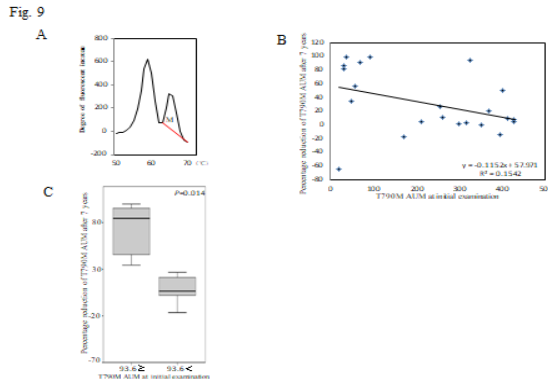
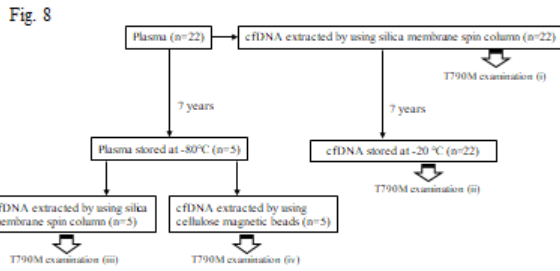
Fig 3 までの検討では採血管の遠心を 1 回施行した結果だが、通常 EDTA 2K 採血管で施行される一般的な方法は 2 段階遠心分離によるものである。そこでさらに 5 人の追加の健康なボランティアから採血を行い、Fig. 4 のような条件で再度検討を行った。2 段階遠心分離による EDTA2K の血漿分離は、以前報告された方法で行った。総 cfDNA 濃度は、EDTA 2K を使用して 4°C で 72 時間保存した後、有意に高くなったが、クエン酸ナトリウムを使用した場合はあまり変化を認めなかった(Fig 5A,B)。また、大きな cfDNA フラグメントは 4°C で 72 時間保存した後、EDTA 2K で有意に認められたが(Fig 5C)、短いフラグメントの濃度は採血後 72 時間まで変化しなかった(Fig 5D)。これらの結果は、Fig 3 までの検討のように、1 回の遠心分離を使用した EDTA 2K の結果と同等であった(Fig 2)。

さらにクエン酸ナトリウムは、市販の細胞安定化採血管とも比較を行った(Fig 6)。細胞安定化採血管は採血後室温に置いていても安定であり今回は 2 種、Streck BCT と PAXgene 採血管を用いた。cfDNA は採血の 72 時間後に分離され、クエン酸ナトリウムは 4°C に保ち、細胞安定化チューブは RT に保った。つまり、それぞれの採血管に推奨される最適温度で施行した。結果、cfDNA 濃度の相対的変化(72 時間保存後の濃度を採血直後の濃度で割ったもの)は、クエン酸ナトリウムと Streck BCT では $p = 0.2251$ 、またはクエン酸ナトリウムと PAXgene $p = 0.893$ であった(Fig 7A)。また、3 種類の採血管間で cfDNA のサイ



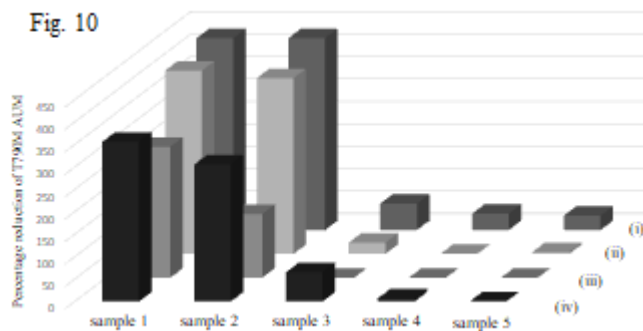
ズ分布に変化は見られず、分布には 170bp に小さな単一のピークが含まれていました。代表的なケースを Fig 7B-D に示した(B:クエン酸ナトリウム; C:Streck BCT; D:PAXgene)。これらは、cfDNA の量と質の点で、クエン酸ナトリウムを 4°C で保存した結果と細胞安定化採血管を用いた結果と同等であることを示した。

③cfDNA の長期保存による品質変化



T790M 面積の値と逆相関した (Fig 9B)。回帰直線によると、面積 93.6 での削減率は 50% と予測することができ、削減率は、93.6 をカットオフとして定義した 2 つのグループ間で大幅に異なった ($p = 0.014$; Fig 9C)。これらの結果では、cfDNA の劣化は、高い変異面積よりも低い変異面積の方が起こりやすいことを示唆している。

④長期保存の品質劣化を軽減できるDNA 抽出法



ピンカラムを備えた QIAamp DNA Mini Kit® (Fig 8 ステップ (iii)) またはセルロース磁気ビーズシステムを備えた Maxwell RSC cfDNA プラズマカートリッジ® (Fig 8 ステップ (iv)) の 2 つの異なる方法で分離した。5 つの血漿すべてで、T790M 変異面積は最初の検査で最も高く (Fig 10: i)、7 年間保存された cfDNA でより低くなった (Fig 10: ii)。同じ保存期間と抽出方法にもかかわらず、7 年間保存された血漿中の T790M 変異面積 (Fig 10: iii) は、保存された cfDNA (Fig 10: ii) よりも著しく低かった。ただし、セルロース磁気ビーズシステム (Fig 10: iv) を使用すると、保存された血漿中の T790M 変異面積は、7 年間の保存後でも回復した。

ここまでの結果を総合すると、血漿 cfDNA はクエン酸ナトリウム採血管で採血後、速やかに血漿分離を行い、さらに cfDNA 抽出を行うほうが良いことが示唆された。また DNA 抽出に関してセルロース磁気ビーズシステムで行うほうが良いと考えられた。もし、採血後、分離までに時間がかかるようならば、4°C に保管し、72 時間以内に分離、抽出を行うことが望ましいことが確認できた。

cfDNA の長期保存が遺伝子の変異検出にどのように影響するかを調べるため、2010 年に佐賀大学病院で治療された進行 NSCLC 患者 22 人から 1) 遠隔転移を伴う進行性肺癌を患っている、2) cfDNA で検証された EGFR T790M、および 3) 当時 cfDNA および血漿サンプルを保存するという 3 つの条件の検体を用いた (Fig 8)。当時、採血直後に血漿分離を行い、200 μ L の血漿から cfDNA を単離した。残りの血漿は -80°C、cfDNA は -20°C で保存された。それら検体数は血漿で 5 例、cfDNA で 22 例であった。まず、最初の検査 (Fig 8 ステップ (i)) で新たに単離した cfDNA との EGFR T790M 変異の量を、-20°C で 7 年間保存した後の量と比較した。T790M 変異の量は、L858R 変異の時と同様に面積 M を測定することによって評価した (Fig 9A)。減少率は、[初期検査時の T790M 面積 (i) - 7 年後の T790M 面積 (ii)] / [初期検査時の T790M 面積 (i)] として計算し、初期検査時の

cfDNA の品質に対する長期血漿保存の影響を調べるために、7 年間保存された 5 つの血漿検体から保存後に分離された cfDNA を含む T790M 変異の面積を、7 年間保存された cfDNA を使用したものと比較した (Fig 8 ステップ (ii))。最初の検査の T790M 変異の面積をコントロールとして使用した (Fig 8 ステップ (i))。7 年間保存された血漿からの cfDNA は、シリカメンブレンス

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 Sato A, Nakashima C, Abe T, Kato J, Hirai M, Nakamura T, Komiya K, Kimura S, Sueoka E, Sueoka-Aragane N.	4. 巻 61
2. 論文標題 Investigation of appropriate pre-analytical procedure for circulating free DNA from liquid biopsy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31904-31914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25881	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 明美、中島 千穂、安部 友範、中村 秀明、荒金 尚子、木村 晋也、末岡榮三朗
2. 発表標題 Liquid biopsyのためのプレアナリシス段階の検体品質管理に関する検討
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年時学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 明美、中島 千穂、安部 友範、中村 秀明、荒金 尚子、木村 晋也、末岡榮三朗
2. 発表標題 遺伝子検査におけるcirculating free DNAの保存条件に関する検討
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会 第50回大会
4. 発表年 2018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	末岡 榮三朗 (Sueoka Eisaburo) (00270603)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中村 秀明 (Nakamura Hideaki) (10452616)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関