

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16692

研究課題名(和文)腎癌血中遊離DNA断片の短小化のメカニズム解明とその遺伝子変異の検出方法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of shorten mechanism and detection of mutations for circulating tumor DNA in renal cell carcinoma patients.

研究代表者

山本 致之(Yamamoto, Yoshiyuki)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90759557

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)：腎癌は典型的な不均一性を持つ癌腫であり、それを克服する血液バイオマーカーが求められている。血液採取は比較的低侵襲でかつ複数回採取が可能であり、病勢モニタリングにより最適ナリソースである。近年、血中遊離DNAがliquid biopsyとして注目されている。本研究では血中遊離DNAの中でも、特に癌細胞由来である循環腫瘍DNAに着目し、腎癌に特化した独自の遺伝子変異パネルを設計し、臨床におけるその有効性を証明した。本研究成果は今後の腎癌診療の発展に寄与し意義深いと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌は典型的な不均一性を持つ癌腫であり、それを克服する血液バイオマーカーが求められている。血液採取は比較的低侵襲でかつ複数回採取が可能であり、病勢モニタリングにより最適ナリソースである。近年、血中遊離DNAがliquid biopsyとして注目されている。本研究では血中遊離DNAの中でも、特に癌細胞由来である循環腫瘍DNAに着目した。本研究で同定した循環腫瘍DNA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。

研究成果の概要(英文)：Renal cell carcinoma has genetic heterogeneity, and blood biomarkers which can overcome this problem are needed. Generally, blood examinations are relatively minimum invasive, and can be performed repeatedly. Recently, plasma cell free DNA attracts attention as a resource of liquid biopsy. In this study, we focused on circulating tumor DNA which was cell free DNA derived from cancer cells. We developed genetic examination of circulating tumor DNA specific to renal cell carcinoma. The outcome through this study can contribute to improvement of medical care for renal cell carcinoma.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：腎癌 循環腫瘍DNA 血中遊離DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの癌腫で遺伝子プロファイルの研究が進み、不均一性が報告され腎癌はその典型である。臨床において摘除癌組織の遺伝子変異や発現プロファイルは、予後予測のバイオマーカーとして有用性は示されているが、治療効果判定など病勢モニタリングはできない。また生検などの新たな組織採取は、侵襲性が高く、異なる部位や複数回の採取が困難である。一方、血液は低侵襲でかつ複数回採取が可能であり、病勢モニタリングにより最適ナリソースである。近年、血中遊離 DNA (cell free DNA; cfDNA) が liquid biopsy として注目されている。その由来は細胞の壊死、アポトーシス、分泌によって産生されると考えられているが、不明な点も多い。これまでに我々は、腎癌の cfDNA の研究を行い、病期に応じて濃度が上昇することを見出した。

cfDNA 中で腫瘍由来のものを循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) と呼ぶ。cfDNA は正常を含めた全細胞由来であるのに対し、ctDNA はその中で腫瘍細胞由来であり、腫瘍プロファイルを直接反映している。ctDNA の検出には、腫瘍特異的遺伝子変異の同定が必要であり、次世代シーケンスやデジタル PCR (digital PCR; dPCR) 法の技術進歩により可能となった。ctDNA は全身の腫瘍から生じるため、不均一性の問題を克服し遺伝子変異別の病勢モニタリングと個別化医療を実現するリソースとなる。腎癌の ctDNA の研究は他癌腫と比較して遅れており、発展が望まれている。

cfDNA は癌患者、健常者共に認め、断片長は一般的に 150~180bp であり、我々も腎癌患者と健常者でこれを確認した。また腎癌患者 cfDNA の断片長が短い群で予後不良であることも発見した。cfDNA 断片の短小化メカニズムは依然解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、腎癌の ctDNA の遺伝子変異を同定することが目的である。同時に cfDNA 断片の短小化メカニズムの解明を行う。さらに新規バイオマーカーとして ctDNA と cfDNA の臨床応用を目指し、個別化医療につなげることが目標である。

ctDNA の臨床応用のためには、患者個別の遺伝子変異の検出が必要である。本研究では ctDNA に特化した腎癌遺伝子変異パネルを作成し、臨床応用を目指す点で独創的である。腎癌の治療には分子標的療法や免疫療法が選択されるが、遺伝子変異に応じた薬剤選択には至っていない。特定の薬剤に対して耐性に陥った場合でも、遺伝子変異に応じた個別化医療の構築や再発の早期発見へ利用が期待される点で創造的である。

3. 研究の方法

(1) 公共データベースの約 2 万種類の腎癌の遺伝子変異の中から、変異頻度や腎癌の発生・増殖経路への関連を考慮して、標的遺伝子を 48 個に絞り込み、腎癌に特化した遺伝子変異パネルを設計した。本研究は微量な 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り候補遺伝子を絞ることで実現可能となる。遺伝子変異パネルは、微量な cfDNA のシーケンスライブラリ作成に適している Agilent 社の SureSelect のカスタムパネルを選択した。シーケンスは、癌組織由来ゲノム DNA、リンパ球由来ゲノム DNA、cfDNA をセットで行った。シーケンサーは HiSeq2500 を使用した。変異解析は、東京大学医科学研究所のスーパーコンピューターに内蔵されている Genomon2 を用いた。

(2) (1) で使用した遺伝子変異パネルの有効性を症例数を増やして検討した。シーケンスは、腎癌患者 48 例の cfDNA、リンパ球由来ゲノム DNA をセットで行った。(1) と同様に、シーケンサーは HiSeq2500 を使用し、変異解析は Genomon2 を用いた。

(3) (2) で得られたシーケンスデータから cfDNA の断片長の分布を解析した。断片長の分布を比較するために、各症例で 166bp 以下の断片数と 167bp 以上の断片数の比を測定し、これを断片長比と定義した。

(4) (1)~(3) で得られたデータを用いて、ctDNA プロファイルと分子標的治療薬の有効性の関連を検討した。cfDNA の断片長はバイオアナライザで測定し、166bp 以下を Short 群、167bp 以上を Long 群と設定した。生存曲線は Kaplan-Meier 法で作成し、分子標的治療薬開始後の無増悪生存率をログランク検定で評価した。

4. 研究成果

(1) 癌ゲノムと cfDNA をシーケンスした 5 例の結果を示す(図 1、次頁)。5 例全て、病期以上の進行癌を選択し、全例、癌ゲノムで変異を認め、4 例で VHL 変異を認めた。ctDNA を 5 例中 2 例に認めた。本研究では、cfDNA 中に変異を検出した症例を、ctDNA 陽性とした。症例 50 では、癌ゲノム、cfDNA 両方に VHL、TP53、TSC1、BAP1、FPGT の変異を認めた。一方、症例 53 では、cfDNA 中に TSC1、MTOR の変異を認めたが、TSC1 変異は cfDNA のみで認め、癌ゲノムでは認めなかった。変異アリル頻度は癌ゲノムが 2.1~60.2%、cfDNA が 1.2~17.4% であった。(2) 腎癌患者 53 例中((1)の 5 例を含む)、16 例で cfDNA 中に変異を認め ctDNA を検出し、その結果を示す(図 2、次頁)。変異遺伝子数は 1-7 個で、中央値 2 個であった。変異遺伝子はいものから順に TP53 が 6 例、BAP1・VHL が各 5 例ずつ、TSC1 が 4 例、SETD2 が 3 例であった。変異アリル頻度は 1.2~54.5% であった。

(3) シークエンスによる cfDNA 断片長の分布を示す(図 3)。横軸が断片長、縦軸が 166bp の断片数に対する割合で、赤色は ctDNA 陽性患者、青色は陰性患者になる。既報の通り全症例 166bp 付近の断片が最も多かった。また ctDNA 陽性患者の方が、130~150bp 付近の短い断片が多い印象であった。また図 4 のように断片長比を測定した。例えば、症例 50 では断片長比が 1.61、症例 52 では 0.89 であり、症例 50 の方が短い断片数が多いことを意味する。ctDNA と断片長比の関係に関して、遺伝子変異を持つ ctDNA 陽性患者では、断片長比は有意に高く、短い cfDNA 断片が多いことが分かった(図 5)。

(4) 次に ctDNA プロファイルと分子標的治療薬の有効性の関連を検討した。cfDNA の「断片長が短い群」では、分子標的治療薬開始後の無増悪生存期間が「断片長が長い群」に比べて短い傾向にあった(P=0.090)。また、ctDNA 陽性患者では、陰性患者に比べて有意に分子標的治療薬の奏功期間が短かった(P=0.049)。

本研究を通して、腎癌に特化した ctDNA の遺伝子変異パネルを作成し、その有用性を示せた。この変異パネルから得られる ctDNA の遺伝子変異と断片長のプロファイルから、薬物治療への反応性を予測できることが可能であった。確立した血液バイオマーカーが存在しない腎癌において、本研究成果は癌診療の発展に寄与し、社会的意義が大きいと考える。今後、腎癌における ctDNA の多施設での症例数の蓄積を重ね、腎癌診療のさらなる発展が期待される。

図 1

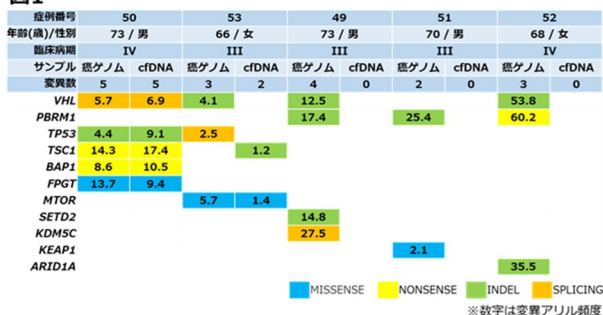


図 1 腎癌 cfDNA のシークエンス結果
腎癌患者 5 例の癌ゲノム・cfDNA をシークエンスした。

図 2

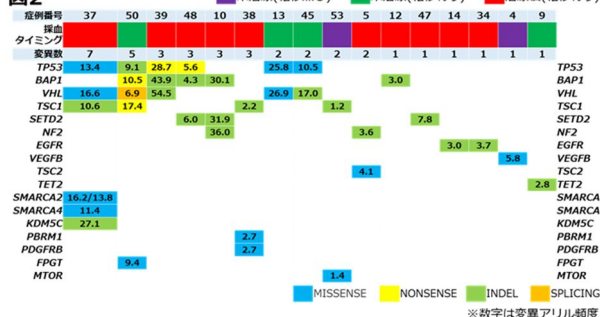


図 2 腎癌患者 16 例で ctDNA を検出した
腎癌患者 53 例中 16 例で遺伝子変異を同定した。

図 3

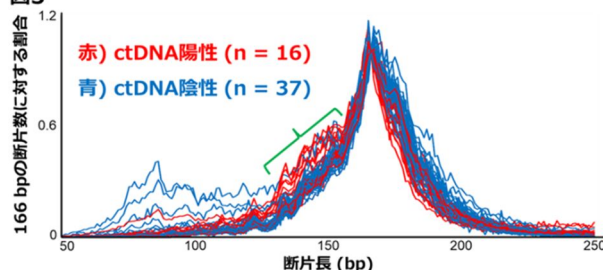


図 3 シークエンスによる cfDNA 断片長の分布
全症例 166bp 付近の cfDNA 断片が多かった

図 4

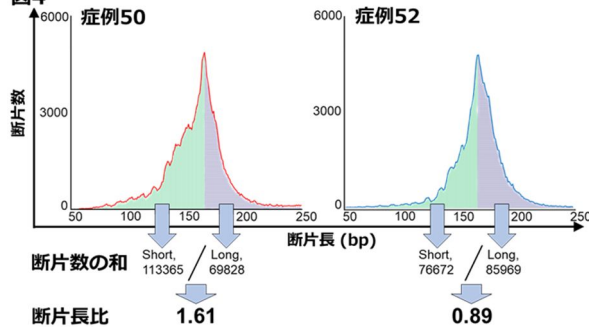


図 4 断片長比の設定

断片長比を、166bp 以下断片数と 167bp 以上断片数の比と定義した。

図 5

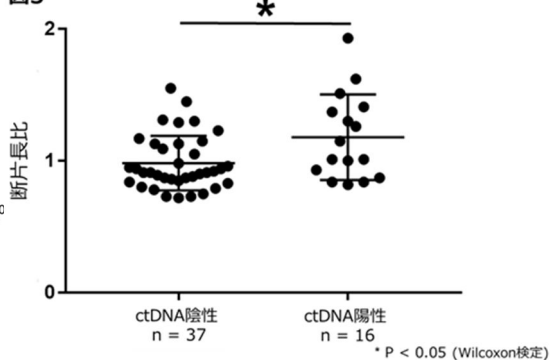


図 5 ctDNA と断片長比の関係

ctDNA 陽性患者は、断片長比が有意に高かった (n=53)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Yamamoto Y, Uemura M, Fujita M, Maejima K, Koh Y, Matsushita M, Nakano K, Hayashi Y, Wang C, Ishizuya Y, Kinouchi T, Hayashi T, Matsuzaki K, Jingushi K, Kato T, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, Fujita K, Imamura R, Nakagawa H, Nonomura N	4. 巻 110
2. 論文標題 Clinical significance of the mutational landscape and fragmentation of circulating tumor DNA in renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 617-628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13906. Epub 2019 Jan 25.	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 -

1. 著者名 山本 致之	4. 巻 10
2. 論文標題 腎がんにおけるcirculating tumor DNA解析の意義	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎臓内科・泌尿器科	6. 最初と最後の頁 515-521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本致之、植村元秀、洪 陽子、中野剛佑、林裕次郎、加藤大悟、河嶋厚成、氏家 剛、永原 啓、藤田和利、今村亮一、中川英刀、野々村祝夫
2. 発表標題 腎癌における循環腫瘍DNAの遺伝子変異プロファイルと断片長は、モニタリング・予後マーカーとして有用である
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 山本致之、植村元秀、洪 陽子、松下 慎、中野剛佑、林裕次郎、王 聡、石津谷祐、神宮司健太郎、加藤大悟、河嶋厚成、氏家 剛、永原 啓、藤田和利、今村亮一、中川英刀、野々村祝夫
2. 発表標題 腎癌における循環腫瘍DNAの遺伝子変異プロファイルと断片化は、モニタリング・予後マーカーとして有用である
3. 学会等名 第28回泌尿器科分子・細胞研究会
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
--	---------------------------	-----------------------	----