

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16776

研究課題名(和文) 超高感度次世代シーケンサーを用いた婦人科癌リキッドバイオプシーの網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文) comprehensive gene mutation profiling in liquid biopsy from gynecological cancer

研究代表者

岩橋 尚幸 (Iwahashi, Naoyuki)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50750907

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)：本研究では分子バーコード法とエラー抑制法を併用する超高感度次世代シーケンシング法であるcancer personalized profiling by deep sequencing (CAPP-seq)を用い、婦人科liquid biopsyの有用性について検討した。50例の婦人科癌の血漿検体での検討を行った結果、49例(98%)で何らかの遺伝子変異が検出され、多いものとしてはTP53が38%、APCが22%、KRASが22%、EGFRが14%であった。今後の婦人科癌における個別化治療戦略において、liquid biopsyによる腫瘍遺伝子プロファイリングが有用だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行婦人科癌の長期予後は不良であり、今後の婦人科癌の治療戦略として、患者個々の遺伝子変異プロファイルに合わせた適切な抗癌剤・分子標的薬の選択が予後の改善に重要となる。Liquid Biopsyにより新たな標的遺伝子を同定し、婦人科悪性腫瘍における治療標的遺伝子のメカニズムを解明することにより、既存の抗癌剤や分子標的薬の感受性も含めた新たな治療戦略の検討や、新規分子標的薬の開発へと発展させることができ、本研究は新規Precision medicine治療の推進のために意義の大きな研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Liquid biopsies of circulating tumor DNA (ctDNA) can detect tumor-specific molecular alterations and have been used as a non-invasive diagnostic, prognostic, and predictive tool. We investigated comprehensive gene mutation profiling in gynecological cancer utilizing plasma ctDNA. We examined the mutation profiles of plasma ctDNA samples obtained from 50 gynecological cancers (31 ovarian cancers, 5 endometrial cancers, 4 cervical cancers, and 10 other rare pathological types of cancer) by CAPP-seq, a novel ultrasensitive NGS-based approach, with AVENIO ctDNA Surveillance Kit (197genes). Among 50 cancers, 49 (98%) harbored one or more non-synonymous somatic mutation. The most frequently altered genes were TP53 (38%), APC (22%), KRAS (22%), EGFR (14%). These findings suggest that characterization of the genetic profiles of independent tumors using plasma ctDNA may lead to the development of novel personalized treatment strategies in gynecological cancer.

研究分野：産婦人科学関連

キーワード：リキッドバイオプシー 婦人科癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

婦人科癌は女性の癌死因の約半数を占め、近年初期癌の治療成績は向上しているが、中期症例の予後は不良であり、予後改善のためには新規標的治療の確立が必要である。肺癌などの悪性腫瘍では患者個々の癌の遺伝子プロファイルに合わせた Precision medicine 研究が進められており、標的遺伝子に対する分子標的薬が臨床導入されているのに対し、婦人科癌ではターゲットとなる標的遺伝子異常がほとんど同定されていない。

近年の癌ゲノム医療において、腫瘍組織の遺伝子解析のみならず、低侵襲的に採取し得る末梢血中腫瘍循環 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) の Liquid Biopsy による遺伝子解析が注目されている。血液中には僅かながら癌細胞からアポトーシス・ネクローシスなど様々な機序で ctDNA が末梢血に放出されており、ゲノム解析技術の発展により、血液中的ごく少量の ctDNA から腫瘍の遺伝子変異を検出することが可能となった。侵襲的な処置が必要となる原発巣や転移巣の手術・生検検体に代わり、より簡便で低侵襲に、しかも繰り返し経時的に採取できる末梢血を用いた Liquid Biopsy により、腫瘍特有の遺伝子変異を解析することができる。Liquid Biopsy による遺伝子変異の経時的変化を追うことにより、従来の腫瘍マーカーや画像検査に先んじて上昇が確認された報告もあり、腫瘍組織に代わるだけでなく、超早期ガンのスクリーニング・治療病勢のモニタリング・早期再発診断としての Liquid Biopsy の有用性が注目されている。

婦人科癌において、卵巣癌や子宮体癌などで腫瘍組織の遺伝子発現解析の研究は進められているが、血液サンプルを用いた ctDNA の Liquid Biopsy による網羅的な遺伝子発現・変異に関する解析はない。特に卵巣癌では腫瘍の不均一性が指摘されており、原発巣の一部の遺伝子解析では腫瘍や転移巣全体を反映しておらず、Liquid Biopsy による遺伝子異常の解析がより有効な可能性がある。今後の婦人科癌における Precision medicine を進める上で、新たな標的遺伝子の検出が求められており、新規診断・治療法の開発のためには、腫瘍組織の遺伝子解析だけでなく、Liquid Biopsy 研究の導入が期待されている。

2. 研究の目的

ctDNA 解析技術として、“検出感度”に優れたデジタル PCR と、“網羅性”に優れた次世代シーケンサーが開発されてきたが、“検出感度”と“網羅性”の両立が困難であり、ctDNA を用いた Liquid Biopsy 解析の問題点となっていた。近年、新たな Liquid Biopsy の網羅的遺伝子解析技術として、分子バーコード法とエラー抑制法を併用する超高感度次世代シーケンサー (Ultrasensitive NGS) である CAPP-seq (cancer personalized profiling by deep sequencing) が開発され、末梢血の ctDNA 中の 197 種類の癌特異的な遺伝子異常 (一塩基置換、挿入、欠失、融合、コピー数変異) を 99.99% 以上の感度・特異度で検出・定量することができるようになった。これまでの Liquid Biopsy 研究で問題となっていた“検出感度”と“網羅性”を兼ね備えた ctDNA 解析が可能となり、新たな標的遺伝子の検出に有用となる可能性が示された。

婦人科癌は他癌種に比べると Precision medicine 研究が遅れている領域であり、これまでに ctDNA の Liquid Biopsy による網羅的な遺伝子解析研究はほとんどない。結果として新規分子標的薬の臨床応用の遅れをもたらしており、進行婦人科癌の予後不良症例の治療選択肢が限られ、婦人科癌における Precision medicine 研究の推進は急務となっている。本研究では、最新の遺伝子解析技術である Ultrasensitive NGS による CAPP-seq を、婦人科癌患者末梢血からの ctDNA-Liquid Biopsy の網羅的遺伝子解析に用い、新規治療戦略の確立や診断および治療バイオマーカーの同定の臨床応用を目指し、患者個々の癌遺伝子プロファイルに合わせた治療選択を行う、婦人科癌の新規 Precision medicine 治療への基盤作成を目的としている。

3. 研究の方法

(1) CAPP-seq を用いた circulating tumor DNA による網羅的遺伝子変異解析

患者個別にインフォームドコンセントを行い、文書にて本研究に同意を得られた症例を対象とした。外科的切除、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が実施され、各治療の前後の通常の臨床検査に必要な採血時に、同時に研究用の患者血液検体を採取した。血漿検体から抽出した ctDNA の Ultrasensitive NGS による網羅的遺伝子変異解析は、AVENIO ctDNA Surveillance Kit (Roche Diagnostics) を用い行った。

(2) CAPP-seq を用いた circulating tumor DNA による Blood Tumor Mutation Burden 解析

腫瘍組織の遺伝子変異数の指標である Tumor Mutation Burden (TMB) が薬剤バイオマーカーとして注目されているが、進行/再発症例などの十分な組織採取困難な症例は解析できない。そこで、腫瘍組織を用いた TMB を Liquid Biopsy で検出する、“Blood Tumor Mutation Burden (bTMB)”を解析した。血液検体の“bTMB”は、1Mb 当たりの血液中 ctDNA から検出される non-synonymous な体細胞変異の数で計算した。

(3) CAPP-seq を用いた卵巣癌術前化学療法の治療効果予測の検討

進行卵巣癌の治療として術前補助化学療法 (NAC) が行われているが、現在のところ術前に腫瘍の組織型や遺伝子変異などの腫瘍の特性を同定することは困難であり、また腫瘍マーカー以外の治療効果判定のためのバイオマーカーは確立されておらず、進行卵巣癌における個別化医

療の障害となっている。そこで、NAC 前後の採血検体を用い、CAPP-seq を用いた卵巣癌術前化学療法の治療効果予測・モニタリングとしての有用性について検討する。

4. 研究成果

(1) CAPP-seq を用いた circulating tumor DNA による網羅的遺伝子変異解析

50 例の婦人科癌の血漿検体での検討を行った結果、49 例(98%)で何らかの遺伝子変異が検出され、多いものとしては TP53 が 38%、APC が 22%、KRAS が 22%、EGFR が 14%であった。組織型においては、高異型度漿液性腺癌・類内膜腺癌・明細胞腺癌・粘液性癌・転移性癌などについて遺伝子変異プロファイリングが可能であった。Pathogenic な遺伝子変異を 1 つ以上もつ症例群は、Pathogenic な遺伝子変異をもたない症例群に比べ予後不良であった。

(2) CAPP-seq を用いた circulating tumor DNA による Blood Tumor Mutation Burden 解析

Blood Tumor Mutation Burden の中央値は 15.15 (0.00-267.67) mutations/Mb であり、組織型による有意差は認めなかったが、一部に hyper-mutator の可能性のある症例を認めた。

(3) CAPP-seq を用いた卵巣癌術前化学療法の治療効果予測の検討

進行卵巣癌 10 例で NAC 前後の Liquid biopsy の変化について検討した。NAC 反応良好例と NAC 反応不良例とを比較し、NAC 前後の遺伝子変異プロファイリングの変化や、bTMB の変化、Pathogenic な遺伝子変異の変異量の変化についてモニタリングができた。

(4) まとめ

婦人科癌における Liquid Biopsy を用いた遺伝子発現解析を行なった。経時的に血液検体を採取できた進行/再発症例に関して、遺伝子変異や“bTMB”を経時的にモニタリングし、腫瘍特性評価や病勢モニタリングとしての Liquid Biopsy の有用性を検討できた。本研究成果により、婦人科癌の Liquid Biopsy を用いた Precision medicine の臨床応用にむけた基盤作成が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Iwahashi Naoyuki, Sakai Kazuko, Noguchi Tomoko, Yahata Tamaki, Matsukawa Hitomi, Toujima Saori, Nishio Kazuto, Ino Kazuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Liquid biopsy-based comprehensive gene mutation profiling for gynecological cancer using CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-019-47030-w	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 Noguchi Tomoko, Sakai Kazuko, Iwahashi Naoyuki, Matsuda Kaho, Matsukawa Hitomi, Yahata Tamaki, Toujima Saori, Nishio Kazuto, Ino Kazuhiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Changes in the gene mutation profiles of circulating tumor DNA detected using CAPP?Seq in neoadjuvant chemotherapy?reated advanced ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2713-2720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3892/ol.2020.11356	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 Iwahashi Naoyuki, Inai Yoko, Minakata Shiho, Sakurai Sho, Manabe Shino, Ito Yukishige, Ino Kazuhiko, Ihara Yoshito	4. 巻 19
2. 論文標題 C-Mannosyl tryptophan increases in the plasma of patients with ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 908-916
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3892/ol.2019.11161	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 Iwahashi Naoyuki, Sakai Kazuko, Noguchi Tomoko, Yahata Tamaki, Toujima Saori, Nishio Kazuto, Ino Kazuhiko	4. 巻 16
2. 論文標題 A comprehensive gene mutation analysis of liquid biopsy samples from patients with metastatic colorectal cancer to the ovary: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 6431-6436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.9467	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8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岩橋 尚幸, 野口 智子, 八幡 環, 馬淵 泰士, 八木 重孝, 南 佐和子, 井籠 一彦
2. 発表標題 婦人科癌liquid biopsyによるblood Tumor Mutation Burden解析
3. 学会等名 第140回近畿産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩橋 尚幸, 坂井 和子, 野口 智子, 馬淵 泰士, 西尾 和人, 井籠 一彦
2. 発表標題 婦人科癌におけるctDNAを用いたblood tumor mutational burdenと網羅的遺伝子変異解析
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口 智子, 岩橋 尚幸, 馬淵 泰士, 八木 重孝, 坂井 和子, 西尾 和人, 井籠 一彦
2. 発表標題 Liquid biopsyによる卵巣癌術前化学療法の治療効果予測に関する研究
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoyuki Iwahashi, Kazuko Sakai, Tomoko Noguchi, Tamaki Yahata, Saori Toujima, Kazuto Nishio, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 A comprehensive gene mutation profiling of liquid biopsy samples from patients with gynecologic cancer
3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩橋 尚幸, 坂井 和子, 八幡 環, 東嶋 左緒里, 西尾 和人, 井籠 一彦
2. 発表標題 CAPP-seqを用いた婦人科癌Liquid biopsyによる網羅的遺伝子変異プロファイリング
3. 学会等名 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoyuki Iwahashi, Kazuko Sakai, Tomoko Noguchi, Tamaki Yahata, Saori Toujima, Kazuto Nishio, Kazuhiko Ino
2. 発表標題 A comprehensive gene mutation profiling of liquid biopsy samples from gynecologic cancer patients by using CAPP-seq
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩橋 尚幸, 坂井 和子, 八幡 環, 東嶋 左緒里, 西尾 和人, 井籠 一彦
2. 発表標題 婦人科癌Liquid biopsyによる網羅的遺伝子変異プロファイリング
3. 学会等名 第17回婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩橋 尚幸
2. 発表標題 Liquid biopsyによる婦人科腫瘍の網羅的遺伝子変異・発現解析 ～17症例の検討から～
3. 学会等名 第6回和歌山婦人科腫瘍研究会
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
--	---------------------------	-----------------------	----