

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18670

研究課題名(和文) 血漿Cell free DNA同定による卵巣癌新規リキッドバイオプシー法の確立

研究課題名(英文) Plasma cell free DNA can discriminate ovarian cancer from benign endometriotic cysts by detecting PIK3CA mutation faintly existing in plasma.

研究代表者

吉村 明彦 (Yoshimura, Akihiko)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10823528

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)：27症例の治療前の子宮内膜症関連癌(明細胞癌と類内膜腺癌)患者と良性の子宮内膜症性嚢胞患者51例より、血漿および手術時の組織切片を回収し、組織および血漿よりDNAを抽出し、組織DNAのNGSによる解析で同定できたPIK3CA変異が血漿のDigital PCR法で検出できるか検討した。明細胞癌17例のうち、患者血漿中のPIK3CAのH1047R変異は5例(29%)で同定でき、10例の類内膜腺癌のうち、患者血漿中のPIK3CAのH1047R例変異は2例(20%)で同定できた。一方で51例の良性子宮内膜症組織では1例(2%)にH1047R変異を認めしたが、血漿中では1例も変異を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮内膜症は約10%の有月経女性に発生する疾患でCommon Diseaseである。その約0.7%が将来的に癌化するが、現時点では臨床上有用なバイオマーカーが存在しない。子宮内膜症および関連癌患者におけるDigital PCR法による血漿中のPIK3CAのH1047R変異同定は、感度こそ27%と低かったが、特異度は75%と高く、陽性適中率は100%であった。癌遺伝子の変異のHot spotを組み合わせるにより、感度の向上は可能であり、Digital PCR法による血漿中の癌遺伝子変異同定は卵巣癌診療における新たなLiquid Biopsy法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The differential diagnosis of endometriosis-related cancers and endometriotic cysts is sometimes difficult in clinic. The aim of this study is to pursue its potential as a biomarker to detect ovarian cancer using patients' plasma. Twenty-seven plasma samples from patients with endometriosis-related cancers were collected. As non-malignant controls, 51 samples were collected from patients with benign endometriotic cysts. The presence of PIK3CA mutation in cell free DNA (cfDNA) existing in patients' plasma was confirmed with digital PCR method. There were 17 cases of clear cell carcinoma and 10 endometrioid carcinoma. Among 27 patients with endometriosis-related cancers, PIK3CA mutations in plasma were detected in 7 cases (26%) (clear cell carcinoma 5/17 and endometrioid carcinoma 2/10), while any mutations were not detected in plasma of patients with benign endometriotic cysts. This data suggests the potential of cfDNAs as a non-invasive biomarker for ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：cfDNA 卵巣癌 PIK3CA Digital PCR liquid biopsy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは我が国において年々増加している。厚生労働省の 2011 年の統計では年間 9314 名が罹患し、うち半数以上の 4717 名が現病死している。進行卵巣がんはいまだに“致死的な”疾患である。

卵巣がんの予後を根本的に改善させる方策の一つとして早期発見につながる新規バイオマーカーの開発が挙げられる。予後不良である最大の要因は、腹腔内奥に存在する卵巣は腫瘍を形成しただけでは自覚症状の出現に至らず、約半数が腹腔播種を来した III 期以上で見つかる点にある。実際、卵巣に限局した I 期であれば、約 90% の 5 年生存率であり、子宮、卵管にまで浸潤している II 期であっても、5 年生存率は 70% を超えている。卵巣がんの代表的な腫瘍マーカーは CA125 である。CA125 は進行がんであれば、病勢に忠実に反映するが、初期癌 (I/II 期) では CA125 の上昇が約 50% にとどまるうえに、月経や子宮内膜症、炎症の影響を受ける CA125 による卵巣がんスクリーニングは、いくつかの臨床試験が示すように卵巣がんの早期発見や患者の生存率の減少にも寄与しない (JAMA 2011; 305: 2295-303)。

これまで、我々はがん細胞が放出する microRNA (miRNA) が血中に安定することに着目して、そのバイオマーカーとしての可能性を検討してきた (BMC Cancer. 2018; 18: 1065. J Ovarian Res. 2018;11:81) が、単独の miRNA では臨床使用に耐えうる有望なものは認められなかった。これまでのいくつかの報告を見ても単独の miRNA による早期発見は難しいと考える。

がん患者の血漿中には、がん由来の遊離 DNA (cell-free DNA (cfDNA)) が存在することは、古くから知られている (Nat Medicine 1996;2:1033-5)。しかし、血漿中のがん由来の cfDNA は、全体の cfDNA の 1% 未満であることも多いため、従来のシーケンス法や Real time PCR 法では検出不可能であった。しかしながら、近年のデジタル PCR や次世代シーケンサーなどの革新的な進歩と血液・体液中の cfDNA の抽出技術の開発により、これまで不可能と考えられていた cfDNA のゲノム異常 (点突然変異あるいはコピー数異常) を検出することが可能になった。特にデジタル PCR 法では DNA 溶液を一反応系に一分子だけ存在するように限外希釈の上 PCR 増幅することにより、増幅産物のできた反応系の数から存在する DNA 量を絶対定量できる。その精度の高さ、再現性の高さゆえに患者血漿などの少量のサンプルにおけるコピー数多型 (CNV) の検出や癌特異的なレアな変異の検出が可能である。従って、もしそれぞれのがんに特異的な CNV や変異を血漿中に存在する cfDNA からのデジタル PCR で検出できるなら、それが新たな高精度かつ低侵襲ながんのバイオマーカーになりえるが、未だ卵巣がんに関しては、確立された報告が存在しない。

2. 研究の目的

そこで、今回の研究において、しばしば臨床では鑑別が困難な卵巣腫瘍の良性悪性の判別が、患者血漿を用いたデジタル PCR 法で可能かどうかを検証することにした。

卵巣がんは大きく分けて漿液性腺癌、明細胞腺癌、類内膜腺癌、粘液性腺癌の 4 つの組織型が存在する。近年のがんゲノムアトラス (TCGA) プロジェクトをはじめとするゲノム解析の進歩により、これら組織型特有の前がん病変の存在、遺伝子変異の存在、頻度が明らかになっている。

その中で今回、子宮内膜症から発生する類内膜腺癌、明細胞腺癌に着目した。子宮内膜症は約 10%の有月経女性に発生する疾患で Common Disease である。内膜症女性の約半数に卵巣子宮内膜症があり、その約 0.7% が将来的に癌化するが、現時点では年齢やサイズ以外に卵巣子宮内膜症の癌化を予見できる明確なバイオマーカーが存在しない。近年のゲノム解析の進歩により子宮内膜症関連卵巣癌で ARID1A や PIK3CA の変異が高頻度に見られることが報告されている (Engl J Med. 2010;363:1532-43)。すなわち、子宮内膜症患者における cfDNA におけるこれらの変異を定期的にモニターすることにより、結果的に卵巣がんの早期発見、早期治療につながるのではないかと考える。過去の報告では ARID1A の変異はコーディング領域全般に広がっており、デジタル PCR での検出には適していない。よって、本研究ではホットスポットが判明している PIK3CA に焦点をあて、卵巣癌患者血漿を用いて、デジタル PCR 法にて、PIK3CA 変異を同定できるかを検証することにした。

3. 研究の方法

(1) 子宮内膜症関連卵巣癌の組織および患者血漿の収集とそれよりの DNA 抽出

倫理委員会の承認を得たのちに、当院で治療した子宮内膜症関連卵巣癌(明細胞癌と類内膜腺癌)の組織および患者血漿を収集し、PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen) を用いて DNA を収集した。対照として、良性卵巣子宮内膜症組織とそれぞれの患者血漿を収集した。

(2) 得られた卵巣癌組織検体の次世代シーケンサー法による PIK3CA 変異の解析

上記(1)で17例の明細胞癌と10例の類内膜腺癌の卵巣癌組織より DNA を抽出した。それを次世代シーケンサー法(Miseq (illumina))で PIK3CA の変異の有無、それぞれの変異のアレル頻度を検索した。

(3) 卵巣癌患者血漿における PIK3CA 変異の同定

上記(2)の検討により、H1047R 変異に着目した。卵巣癌患者血漿を用いて、デジタル PCR 法 (QuantStudio 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific)) を用いて、血漿中の H1047R 変異が同定できるかの検討を行った。さらに良性卵巣子宮内膜症患者の血漿による解析をあわせて行い、デジタル PCR 法による患者血漿の PIK3CA 変異解析により卵巣癌の同定が可能かどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜症関連卵巣癌の組織および患者血漿の収集とそれよりの DNA 抽出

収集した子宮内膜症関連癌の患者背景を図1に示した。研究期間で17例の明細胞癌と10例の類内膜腺癌症例より、癌組織と血漿を収集することができた。良性コントロールとして、51例の良性子宮内膜症性嚢胞患者より、腫瘍組織と血漿を収集した。さらにそれらを用いて PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen) を用いて DNA を収集した。また、患者血漿より抽出した DNA を Agilent Bioanalyzer で解析し、血漿中に 150 - 170bp ぐらいのフラグメント化した DNA、すなわち Cell free DNA が存在していることを確認した。

		Overall
Age, years old		Median 53
Histology, n (%)	Clear cell carcinoma	17
	Endometrioid carcinoma	10
	endometriotic cyst (benign)	51
Clinical stage, n (%)	1	17
	2	3
	3	5
	4	2

図1 患者背景

(2) 得られた卵巣癌組織検体の次世代シーケンサー法による PIK3CA 変異の解析

抽出した 27 例の子宮内膜症関連癌組織における PIK3CA 変異を次世代シーケンサー法

で解析した。図2に示すとおり、27例中24例でPIK3CA変異を認めたが、その中でアレル頻度が1%以上のものは、E545A, E1047R, E542K, T1025A, Q546R, K1030Eの6つであった。ホットスポットである542および545番目のグルタミン酸残基、そして1047番目のヒスチジン残基における変異は、PIK3CAのキナーゼ活性を亢進させるドライバー変異として知られている。今回の研究では、その中でアレル頻度が最も高かったH1047R変異に焦点をあてて、患者血漿を用いたデジタルPCR解析を行うことにした。

Amino Acid Change	gene	chr	pos(start)	pos(end)	ref	alt	allele frequencies, median	Case, n
E545A	PIK3CA	chr3	179218304	179218304	A	C	0.01296014	22
H1047R	PIK3CA	chr3	179234297	179234297	A	G	0.30362382	6
E542K	PIK3CA	chr3	179218294	179218294	G	A	0.39388344	1
T1025A	PIK3CA	chr3	179234230	179234230	A	G	0.15426703	1
Q546R	PIK3CA	chr3	179218307	179218307	A	G	0.01430358	1
K1030E	PIK3CA	chr3	179234245	179234245	A	G	0.001218	1
	PIK3CA	chr3	179234313	179234313	A	G	0.000914	1
	PIK3CA	chr3	179234316	179234316	A	G	0.000914	1
	PIK3CA	chr3	179234340	179234340	A	G	0.000838	1
	PIK3CA (NM_006218:c.*23G>T)	chr3	179234387	179234387	G	T	0.005602	1
	PIK3CA (NM_006218:c.*46>T)	chr3	179234368	179234368	G	T	0.002135	1
	PIK3CA (NM_006218:c.*13G>T)	chr3	179234377	179234377	G	T	0.003889	1

図2 子宮内膜症関連癌27例の癌組織におけるPIK3CA変異の次世代シーケンサー解析

て知られている。今回の研究では、その中でアレル頻度が最も高かったH1047R変異に焦点をあてて、患者血漿を用いたデジタルPCR解析を行うことにした。

(3) 卵巣癌患者血漿におけるPIK3CA変異の同定

続いて、子宮内膜症関連癌組織および血漿より抽出したDNAを用いて、H1047R変異が同定できるかどうかの検証を行った。明細胞癌17例のうち、組織中のPIK3CA

Histological subtypes	Patient total number, n	Gene, Amino acid change	Detection rate, n (%)	
			tumor	Cell free DNA (preoperative blood)
Clear cell carcinoma	17	PIK3CA, H1047R/E542K/E545K	6 / 17 (35%)	5 / 17 (29%)
Endometrioid carcinoma	10	PIK3CA, H1047R/E542K/E545K	2 / 10 (20%)	2 / 10 (20%)
Endometriotic cyst (benign tumor)	51	PIK3CA, H1047R/E542K/E545K	1 / 51 (2%)	0 / 51 (0%)

図3 明細胞癌17例と類内膜腺癌10例における腫瘍と患者血漿におけるPIK3CAにおけるH1047Rの変異検出率。対照として、良性卵巣子宮内膜症性嚢胞51例の腫瘍と患者血漿における検出率を示す。

のH1047R変異は6例(35%)で同定でき、10例の類内膜腺癌のうち、組織中のPIK3CAのH1047R例変異は2例(20%)で同定できた。一方で、血漿中においては、明細胞癌6例中5例(83%)、類内膜腺癌2例中2例(100%)でH1047R変異を同定することができた。一方で51例の良性子宮内膜症組織では1例(2%)にH1047R変異を認めたが、血漿中では1例も変異を認めなかった。

従って、子宮内膜症および関連癌患者におけるデジタルPCR法による血漿中のPIK3CAのH1047R変異同定は、感度こそ26%と低かったが、特異度は75%と高く、陽性適中率は100%であった。さらなる癌遺伝子の変異のHot spotを組み合わせるにより、感度の向上は可能であり、デジタルPCR法による血漿中の癌遺伝子変異同定は卵巣癌診療における新たなLiquid Biopsy法として有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamamoto, M. Sawada, K. Shimizu, A. Matsumoto, Y. Kodama, M. Hashimoto, K. Kimura, T.
2. 発表標題 The potential of circulating cell-free tumor DNA as a diagnostic marker of ovarian cancer
3. 学会等名 AACR Advances in Liquid Biopsies (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto, M. Sawada, K. Shimizu, A. Matsumoto, Y. Kodama, M. Hashimoto, K. Kimura, T.
2. 発表標題 The potential of circulating cell-free tumor DNA as a diagnostic marker of ovarian cancer
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamamoto, M. Sawada, K. Shimizu, A. Kinose, Y. Kodama, M. Hashimoto, K. Kimura, T.
2. 発表標題 The potential of circulating cell-free tumor DNA as a diagnostic marker of ovarian cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究協力者	澤田 健二郎 (Sawada Kenjiro) (00452392)		

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
研究協力者	山本 実咲 (Yamamoto Misa)		

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