

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591928

研究課題名(和文) 胃癌患者末梢血中の癌細胞由来浮遊DNA検出法の確立

研究課題名(英文) Quantitative detection of circulating tumor DNA in the plasma of gastric cancer patients

研究代表者

黒川 幸典 (Kurokawa, Yukinori)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10470197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌患者の血漿中遊離DNAをBEAMingあるいは次世代シーケンサーで解析し、胃癌原発巣と同一の遺伝子変異(circulating tumor DNA: ctDNA)の定量的検出を行った。ctDNAの定量値を治療経過および臨床所見と比較した。進行胃癌術前血漿をTP53に関して解析した6例中3例でctDNAの検出が可能であり、切除や術後再発や抗癌剤治療の効果と関連していることを示した。胃癌患者においてもctDNAは腫瘍量のモニタリングに有用なマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We performed quantitative detection of circulating tumor DNA (ctDNA) that harbors gene mutations identical to the primary tumor, by analyzing cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients using BEAMing or next generation sequencer. 3 out of 6 advanced gastric cancer patients showed positive ctDNA for TP53 before surgery. ctDNA level corresponded to surgical resection, tumor recurrence, and response to chemotherapy. We demonstrated that ctDNA might be useful biomarker for monitoring tumor progression in gastric cancer patients.

研究分野：上部消化管外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌 ctDNA BEAMing 次世代シーケンサー

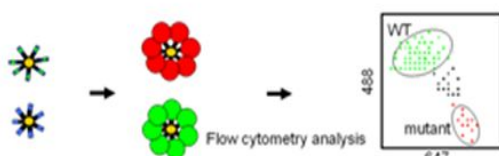
1. 研究開始当初の背景

癌患者の末梢血中には、浮遊癌細胞 (Circulating tumor cell: CTC) が存在していることは以前より知られており、血中の CTC 数を手がかりにした癌の早期診断に関する研究はこれまで盛んに行われてきた。乳癌における CTC 数と予後との関連性を調べた研究なども数多く報告されていたものの、末梢血中の CTC を直接計測する方法は依然として検出感度が低いという問題があり、臨床応用にはまだほど遠かった。

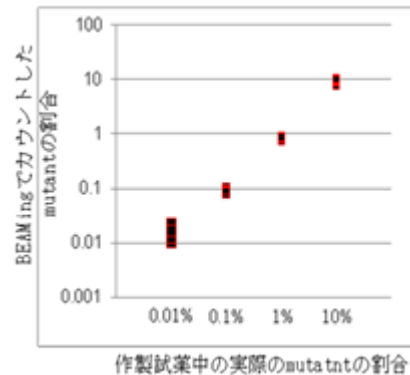
一方、血漿中には遊離 DNA 断片 (cell-free DNA) が存在し、特に癌患者においてはその一部に癌細胞由来浮遊 DNA circulating tumor DNA (ctDNA) と呼ばれる癌由来の DNA 断片が混在していることが知られている。血漿中に存在する ctDNA は、正常細胞もしくは癌細胞から DNA が漏れ出したものと考えられており、由来する癌組織と同じ遺伝子変異を有しているとされている。腫瘍の持つ遺伝子変異を血液から検出できることから、血漿から ctDNA を検出することは "liquid biopsy" とも言われており、腫瘍の治療経過を反映する疾患特異的なバイオマーカーとして注目されている。正常人の血中にも浮遊 DNA が存在していることが明らかとなっているが、これまでの肺癌患者 100 名を用いた報告では、平均して正常人の 8 倍の量の ctDNA が検出され、肺癌の stage が進むに伴って ctDNA 量が増加していることも確認されている (J Clin Oncol 2003)。しかし一般に cell-free DNA のうち ctDNA の割合は数%以下、症例によっては 0.1-0.01% と極微量であることから、検出感度や定量性の問題が依然として残っていた。

(2) そうした中で、2006 年に BEAMing (beads, emulsions, amplification, magnetics) という DNA 検出感度を飛躍的に改善させる手法が報告された (Nature Methods 2006)。BEAMing とは、変異遺伝子を高感度に検出し、かつ定量できる手法である。オイルエマルジョン中で PCR 反応を行い、1 個のナノ粒子に 1 分子由来の PCR 産物を固定する (下図および右上図)。

その後、当該部位の正常及び変異塩基を異なった蛍光色素で標識し、そのビーズを FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて直接カウントする (下図参照)。



この方法では、スクリーニングするビーズ数を増やすことにより感度を上げられることに加え、変異細胞の割合を正確にカウントして数値化できる (下図参照)。



したがって、これまでの定量的 PCR のように検量線を書く必要がないために誤差が非常に少なく、定量性の面でも非常に優れている。またこの方法は遺伝子変異の検出を行うため、これまでの腫瘍マーカーに比べて腫瘍特異性が高いという長所もある。

研究協力施設である大阪府立成人病センター研究所では、すでにこの BEAMing の技術を用いた解析システムを確立しており、予備研究として肺癌に対する CTD の検出を行ってきた。これまでに EGFR 遺伝子変異を有する肺癌患者のサンプルから、EGFR 遺伝子の 790 番目のアミノ酸であるトレオニンのメチオニンへの置換 (T790M) の検出を行ってきており、肺原発巣組織中の T790M 変異を数万分の 1 の感度で検出でき、約半数の非小細胞肺癌患者の血液中からも T790M を検出できるという結果を得ている (日本癌学会 2010)。

(3) 我々の診療対象である胃癌においては感度・特異度にすぐれた血中バイオマーカーが存在せず、新たなバイオマーカーの開発が期待されている。胃癌におけるこれまでの報告では、integrity index (Anticancer Research 2007) やメチル化異常 (Anticancer Research 2009) に関する報告はあるものの、ctDNA に関する報告はまだなく、上述の BEAMing を用いて末梢血から ctDNA を検出、定量することは、非侵襲的に癌を診断するという点で有用と考える。また、深部臓器や体腔内に再発した際には組織採取による確定診断が困難なことも多い。ctDNA 量の推移を調べることで治療経過の追跡に応用することができれば、血液を用いて非侵襲的および簡便に再発後の化学療法効果判定が行えると考えられる。今回の研究対象である胃癌においては、遺伝子変異の頻度の多いものとして TP53、APC、CDH1、KRAS などが報告されているため、これらを標的とした ctDNA の検出を行うことを計画した。TP53 および APC は胃癌においてそれぞれ約 60%、約 40% に変異が認められると報告されており、臓器特異性の問題はあっても、血液

中で検出できる可能性は高いと考えている。CDH1 は家族性胃癌の原因遺伝子の1つとして注目されているが、KRAS と同様に胃癌全体においても約 20%で遺伝子変異があるというデータもあり、今回の ctDNA 検出に利用することを計画した。

(4) 術前血液サンプルを用いて、胃癌における一般的な遺伝子変異のデータを基に primer をいくつか設計し、血中に浮遊しているごく微量の ctDNA を検出するという包括的アプローチによって、胃癌の早期発見法の確立が可能であると考え。一方、TP53 などの一般的な遺伝子変異を認めない胃癌においても、個々の胃癌組織から腫瘍特異的な遺伝子変異を同定することは可能である。個々の患者の胃癌組織中の遺伝子変異を検出した上で、その変異に対する患者毎にオリジナルの primer を設計し、術後サンプルにおいて検索するという個別のアプローチによって、術後の再発診断や再発後の化学療法効果判定を行うことができると考える。

## 2. 研究の目的

(1)胃癌患者の血漿から ctDNA が検出可能であるかを調べる。

(2) ctDNA が、胃癌の早期発見、切除後の再発、抗癌剤治療の効果を診断するマーカーとして応用可能であるかを調べる。

## 3. 研究の方法

### (1)原発巣の変異解析

当科で進行胃癌に対して胃切除手術を行った患者から採取した腫瘍組織(新鮮凍結切片)から DNA を抽出した。各種癌における Somatic mutation の報告を集めたデータベースである COSMIC(Catalogue of somatic mutation in cancer)を参照に、変異報告の多い箇所(TP53 の各エクソンおよび APC の exon16 内の 5 つの領域、KRAS の exon2、3)をはさむような primer を設計し、PCR で増幅した後、Sanger 法を用いてサイクルシーケンシング反応を行い、3730 DNA Analyzer を用いて遺伝子変異の検索を行った。さらに研究期間途中からは、複数の頻度の低い変異を同時に検出することができる次世代シーケンサー(Ion torrent PGM)を使用し、TP53 に加え ALK や EGFR、BRAF、KRAS などの 48 の癌関連遺伝子を一度に検索可能な次世代シーケンサー用のパネルを用いて、原発巣の解析を追加した。

### (2)血液からの血漿 DNA の抽出

術前血液サンプルの血漿から DNA を抽出した。また、ここで遺伝子変異が検出された患者からは、術後 1 週間後に血液を提供していただき DNA を抽出した。このような症例で再発を認めただけには、術後 3 か月ごとに 1 年間血液を提供していただき、DNA を抽出した。

(3)BEAMing を用いた血漿 DNA の変異検出  
抽出した DNA は BEAMing を用いて変異の検出を行った。まず、腫瘍組織で認められた変異をはさむようなプライマーを個々に用意し、cell-free DNA で PCR を行い、目的の遺伝子領域を増幅する。次にオイルエマルジョン中で PCR を行い、1 個のナノ粒子に 1 分子由来の PCR 産物が固定された状態の monoclonal な産物を作成する。当該部位の正常及び既知の変異点を異なった蛍光色素で標識し、そのビーズを FACS(fluorescence activated cell sorting)を用いて直接カウントする。この BEAMing による解析は主に初期の症例に実施した。

(4)次世代シーケンサー(Ion torrent PGM)を用いた血漿 DNA の変異検出  
研究期間途中からは、次世代シーケンサー(Ion torrent PGM)を用いた。この次世代シーケンサーは、DNA ポリメラーゼにより各塩基が取り込まれるときに放出される水素イオン(pH 変化)を検出することでシーケンシングを実現した。蛍光色素等が不必要なため、これまでのシーケンサーに比べ極端にランニングコストが安く、かつ短時間で処理できるという特徴がある。これを用いることで大量の DNA 断片の塩基配列決定と変異割合の算

出を同時に効率的に行うことができることから、ctDNA の定量的検出に應用が可能と考えられたため、次世代シーケンサー(Ion torrent PGM)を用いた ctDNA 断片の targeted deep sequencing に移行した。

(5)術前血液サンプルの血漿から、腫瘍組織と同じ変異を検出した症例において、再発を認めただけ時点およびその後 3 か月ごと、もしくは臨床的に病勢に変化のあった時点で血液を提供していただき、DNA を抽出した。腫瘍組織の DNA で認められた変異を検索するような、患者毎にオリジナルの primer を設計し、次世代シーケンサー(Ion torrent PGM)を用いた targeted deep sequencing を行った。Cell-freeDNA 中に占める ctDNA の割合と、画像所見、腫瘍マーカーの推移を比較した。

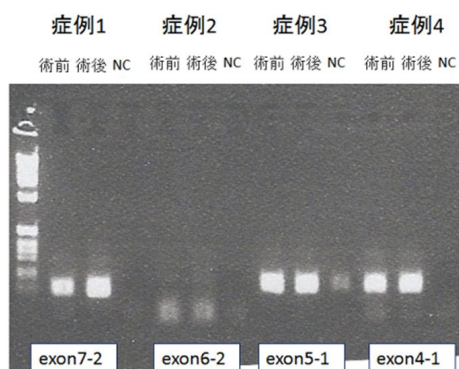
## 4. 研究成果

(1)当施設で手術された胃癌原発巣 42 例を用いて TP53、APC、CDH1、KRAS の解析を行い、10 例(24%)で TP53 の変異を同定した。変異を認めただけ部位は exon4-7 の間に置換や挿入、欠損として認め、全て異なる変異であった。

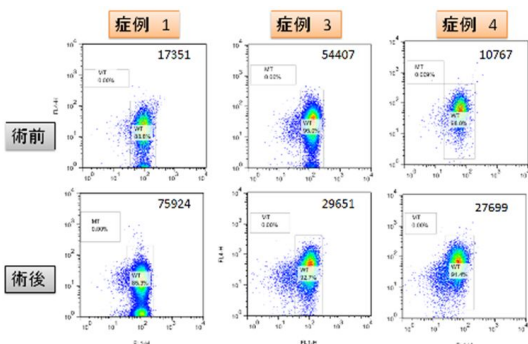
(2) TP53 の変異を同定した 10 例のうち、4 例の術前血液サンプルを用いて、血漿中の cell-free DNA の抽出を行った。それぞれの症例において、術前、術後の 2 サンプルずつから、14.1-58.9ng の cell-free DNA を回収することができた(下図参照)。

症例	Stage	組織型	TP53変異	primer	血漿	ctDNA回収量, ng
1	IIA	por2	c.734G>T	exon7-2	術前	14.1
					術後POD6	58.9
2	IB	tub2	c.659A>G	exon6-2	術前	20.8
					術後POD7	48.1
3	yp-IIA	tub2	c.395 A>G	exon5-1	術前	37.6
					術後POD39	27.0
4	IIIC	tub2	c.103 del T	exon4-1	術前	19.7
					術後POD8	39.0

次に、腫瘍組織で認めた TP53 の変異部位をはさむような primer を設計し、オイルエマルジョン中で PCR 反応を行い、1 個のナノ粒子に 1 分子由来の PCR 産物を固定した。4 症例のうち、症例 2 を除く 3 例において電気泳動で増幅が確認できた(下図参照)。



増幅が確認できた 3 例(症例 1、3、4)で BEAMing を行った結果、この 3 例では mutant fragment は検出されなかった(下図参照)。



その理由として、実験過程においてビーズが失われてしまい、FACS で検出した総ビーズカウントが理想より少なく、十分な精度でなかったことが考えられた。また実験系が煩雑であったこともあり、その後の症例は実験系が比較的容易な次世代シーケンサーでの検出を行うこととした。

(3)TP53 の変異を同定した 10 例のうち、さきほどの 4 例に新たに 2 例を加えた計 6 例の術前血漿サンプルを用いて、次世代シーケンサーを用いた deep sequencing を行い、3 例で腫瘍と同一の変異を持つ ctDNA を血漿から検

出した。検出例はいずれも StageIIIC や IV の非常に進行した胃癌患者であった。これら 3 例の変異に関して、healthy volunteer 24 例から得た正常 WBC ゲノムの deep sequencing からシーケンサー固有のシーケンシングエラーレートを求め、ctDNA の検出閾値を決定した。

治療経過中の血液サンプルを追跡したところ、ctDNA の定量値が腫瘍量、治療効果、血清腫瘍抗原の推移と合致していた。このことから、ctDNA が術後の再発診断や再発後の化学療法効果判定を行うマーカーとして応用可能である可能性が示唆された。

(4)TP53 で ctDNA を追跡しえた 3 例に関して、次世代シーケンサー用パネルを用いた解析を施行し、TP53 以外の遺伝子について変異を検索したところ、1 つ以上の別の遺伝子の変異を同定することができた。それらの遺伝子で ctDNA を調べたところ TP53 と同様の推移を示していた。このことから、TP53 以外の遺伝子の変異もマーカーとして応用可能である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Takuya Hamakawa, Yoji Kukita, Yukinori Kurokawa et al. Circulating tumor DNA can be useful biomarker for gastric cancer by full utilization of next generation sequencer 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3 日 横浜

浜川卓也、久木田洋児、黒川幸典ほか 次世代シーケンサーを用いた胃癌患者血漿中の癌細胞由来遊離 DNA の検出 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013 年 4 月 11 日 福岡

浜川卓也、久木田洋児、黒川幸典ほか 次世代シーケンサーを用いた胃癌患者血漿中の癌細胞由来遊離 DNA の検出 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

黒川 幸典 (KUROKAWA YUKINORI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10470197

##### (2) 研究分担者

瀧口 修司 (TAKIGUCHI SHUJI)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：00301268

加藤 菊也 (KATO KIKUYA)  
大阪府立成人病センター研究所・所長  
研究者番号：60194809

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：