

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430144

研究課題名(和文) 血漿遊離DNAの出現機序の解析とヒト肺がん細胞転移モデルマウスへの応用

研究課題名(英文) Analysis how circulating plasma DNA release to peripheral blood and that applies to metastatic animal model using human lung cancer cells

研究代表者

荒金 尚子 (Aragane, Naoko)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：20321846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR変異を有するヒト肺がん細胞株H1975を、高度免疫不全マウスに移植しヒト肺がん転移(同種)を再現したモデルマウスを構築した。腫瘍容量増加、転移頻度の上昇に伴い、腫瘍細胞由来血漿遊離DNA検出頻度は上昇した。H1975細胞を皮下移植すると全体の93%で転移を認めたが、リンパ節に高頻度(79%)に転移した。一方、H226B細胞を皮下移植すると全例肺転移を認めた。原発巣と比べ、転移巣でリン酸化を認めた数種の分子を同定した。H1975にルシフェーゼ発現プラスミドを導入し、H1975-lucを作成した。経時的に、腫瘍容量、転移頻度をin vivoイメージングシステムで解析可能になった

研究成果の概要(英文)：We established a highly metastatic animal model using immunodeficient mice inoculated with human lung cancer cell line, H1975 carrying EGFR mutations. Tumor-derived circulating DNA (ctDNA) was analyzed using MBP-QP method on the animal model, and the results are obtained as follows:1) Frequency of ctDNA detection was correlated with tumor burden and metastasis, suggesting that ctDNA appears in peripheral blood concomitant with tumor progression.2) Organ preference of metastasis was analyzed. Inoculation with H1975 and H226B was metastasized into lymph nodes and lung, respectively. Several molecules were more phosphorylated in metastatic lymph nodes compared to primary lesion.3) Monitoring of anti-tumor effect of 3rd generation EGFR tyrosine kinase inhibitor could be performed by detection of ctDNA.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：リキッドバイオプシー バイオマーカー 血漿DNA

1. 研究開始当初の背景

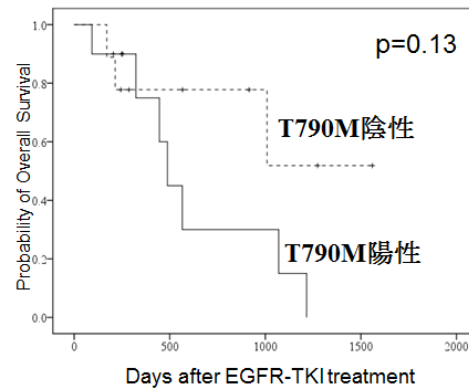
(1) 血漿遊離 DNA 陽性患者の臨床的特徴

近年、がん組織を採取せず末梢血で遺伝子解析を行う liquid biopsy についての報告が多くみられるようになった。我々は、血液中に微量に存在する腫瘍細胞由来の血漿遊離 DNA を検出するため全自動高感度遺伝子変異検出系である mutation-biased PCR and quenched probe system (MBP-QP) 法を開発した。この系を用いて、肺がん患者血漿遊離 DNA 中に、分子標的薬である EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) の耐性化遺伝子変異である EGFR T790M が、EGFR-TKI 獲得耐性を起こした患者血漿で同定されたこと、がん組織で得られた検出頻度 (約 50%) と程同等な検出率であったことを報告してきた (Nakamura, J Thorac Oncol, 2011)。さらに、EGFR-TKI 効果予測因子である EGFR L858R, exon 19 欠失変異も新規開発した検査系を用いて肺がん患者血漿中で検出可能であったことも報告した (Nakamura, J Thorac Oncol, 2012)。しかし、担がん患者血漿遊離 DNA が同定されて 35 年経過した現在でもがん組織由来の DNA がどのように遊離されるのか明らかにされておらず、またその生理的な役割も不明である。我々の検討では、がん組織由来血漿 DNA が同定された患者には以下のような特徴がみられた。

1. 血漿 T790M 陽性患者は、陰性患者と比べ**予後不良**の傾向がみられた (図 1) (Nakamura, J Thorac Oncol, 2011)。治療前組織を用いた T790M 陽性例では予後不良、良好と一定の見解が得られていない (Su, J Clin Oncol, 2012, Fujita, J

Thorac Oncol 2012)。

図1 血漿T790Mと予後



2. 血漿 EGFR L858R, exon 19 欠失変異陽性患者は、進行癌でのみ検出され、**多臓器転移**がみられた患者で高頻度に検出した (表 1) (Nakamura, J Thorac Oncol, 2012)。

表1 癌の進展と血漿DNA遺伝子変異検出感度

原発巣のEGFR 遺伝子変異	遺伝子変異検出サンプル数 /血漿DNA測定サンプル数		
	全症例	StageIV	3臓器以上 進展
Exon 19	21/47 (44.7%)	21/41 (51.2%)	20/35 (57.1%)
L858R	2/23 (8.7%)	1/14 (7.1%)	1/12 (8.3%)
合計	23/70 (32.9%)	22/55 (40.0%)	21/47 (44.7%)

上記の結果より、血漿中に腫瘍由来の DNA を検出する事は、がんの進展に関与している可能性がある。血漿中変異 DNA と臨床的特徴の確認は、現在施行中の多施設共同研究前向き検討で行う予定である。

(2) ヒト肺がん転移を再現したモデルマウス

我々は、可能な限りヒトの転移を模したマウスモデルの構築を行うため、**高度免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3 欠損マウス: NOJ マウス)**を用いて検討している。NOJ マウスは、熊本大学・岡田誠治教授が樹立した高度免疫不全マウスである。NOD.Cg-Prkdc^{Scid}種と Jak3 欠損マウスを交配して作成され、T 細胞、B 細胞、NKT

細胞の欠損に加えて、NK 細胞欠損、補体低下、マクロファージ・樹状細胞の機能異常を伴う (Okada, Int J Hematol 2008)。T790M、L858R 変異を有するヒト肺がん細胞株 H1975 を、NOJ マウスに移植しヒト肺がん転移 (**同種**) を再現したモデルマウスを構築し、全身に転移を生ずる事を確認した (図 2)。また、血漿遊離 DNA を用いて上記で述べた MBP-QP 法で T790M、L858R 変異を検出する事も確認した。このマウスモデルを用いて腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA の検出機序を検討し、腫瘍進展との関連について検討する。

図2 NOJマウスを用いた転移モデル



リンパ節転移

2. 研究の目的

本研究の目的は、**腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA が出現する機序**を明らかにし、**血漿遊離 DNA が腫瘍進展の指標となるか**検討することである。また、この動物モデルが、**転移を標的とした新規薬剤のスクリーニング系**として有用であるか明らかにする。

3. 研究の方法

1. ヒト肺がん転移モデルマウスにおける転移巣での heterogeneity の検討

ヒト肺癌細胞株 H1975 を NOJ マウスに皮下移植を行い、体重変化、腫瘍の測定を行い、体重が減少し衰弱してきたマウスは解剖を行い、転移の有無を確認する。腫瘍は原発巣、各臓器転移部位に

わけ、病理組織用・DNA 解析用・RNA 解析用・蛋白質解析用に分け保存する。

リンパ節転移 (リンパ行性) 実質臓器転移 (血行性転移) および原発巣でそれぞれ DNA 解析 (肺癌関連分子 8 種の direct sequencing)・RNA 解析 (cDNA microarray)・蛋白質解析 (リン酸化アレイ) を行い比較検討する。

2. ヒト肺がん転移モデルマウスにおける腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA 量の経時的変化

ヒト肺癌細胞株 H1975 を用い、ルシフェレース発現細胞株を作成する。

NOJ マウスに で得られた細胞株を移植し、肺原発巣、転移巣の推移を *in vivo* イメージングを用いて経過観察する。

腫瘍由来血漿遊離 DNA の存在を、L858R、T790M を指標に同一個体で経時的検討を行う。L858R、T790M は mutation-biased PCR and quenched probe system (MBP-QP) 法を用いて検査する。

3. ヒト肺がん転移モデルマウスにおける転移形式と腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA との関連

2 の検討において、腫瘍由来 DNA が同定された時点で、血漿遊離 DNA を deep sequencing にて網羅的遺伝子解析を行い、1 - で得られた結果と比較し、血漿遊離 DNA の源を検討する。

4. 次世代 EGFR-TKI 阻害剤投与後の腫瘍由来血漿遊離 DNA の変動

H1975 に対して抗腫瘍活性をもつ

次世代 EGFR-TKI を投与し 2 と同様の検討を行い、抗腫瘍活性が血漿遊離 DNA に反映されるか検討する。腫瘍由来血漿遊離 DNA を 2- と同様に T790M, L858R を指標に経時的検討を行い、腫瘍由来血漿遊離 DNA の消失時期と転移抑制時期との関連を検討する。

5. ヒト肺がん転移モデルマウスにおける転移形式と腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA との関連

K-ras 変異株、*BRAF* 変異株を用いて 4 と同様の検討を行う。血漿遊離 DNA より *K-ras* codon12 変異、*BRAF* V600E 変異高感度検出系は企業との共同研究で開発中であり、現在感度確認中である。

5- を用いて、*BRAF*, *MEK* 阻害剤の効果について 4 と同様の検討を行い、*EGFR* 以外の変異がんについても本モデルマウスが適用できるか検討する。

4. 研究成果

1. ヒト肺がん転移マウスの作成と転移の経時的变化

高度免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3 欠損マウス:NOJ マウス)を用いて検討した。NOJ マウスは、熊本大学・岡田誠治教授が樹立した高度免疫不全マウスである。NOD.Cg-Prkdc^{Scid}種と Jak3 欠損マウスを交配して作成され、T 細胞、B 細胞、NKT 細胞の欠損に加えて、NK 細胞欠損、補体低下、マクロファージ・樹状細胞の機能異常を伴う (Okada, Int J Hematol 2008)。T790M、L858R 変異を有するヒト肺がん細胞株 H1975 を、NOJ マウスに移植しヒト肺がん転移 (同種) を再現したモデルマウスを構築し、転移頻度、部位を確認した

(表 3) (Sueoka-Aragane N, et al, PLoS One, 2014)。

表3 Frequency of metastasis and/or dissemination in H1975 xenograft model

Metastatic/disseminated lesions	Frequency (n=14)
Metastasis to lymph nodes	79% (11/14)
Metastasis to organs	64% (9/14)
Dissemination	29% (4/14)
Any of the above	93% (13/14)

2. 腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA 量と腫瘍容量、転移頻度との相関

上記転移モデルマウスを経時的に解剖し、腫瘍容量、転移頻度及び、MBP-QP 法を用いて血漿遊離 DNA 中 T790M、L858R 変異量との相関を検討した。腫瘍容量増加、転移頻度の上昇に伴い、腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA 検出頻度は上昇した。以上の結果より、腫瘍細胞由来遊離 DNA は、腫瘍進展と共に血中に出現する事が明らかになった (Sueoka-Aragane N, et al, PLoS One, 2014)。

図3 総腫瘍量とctDNAの相関

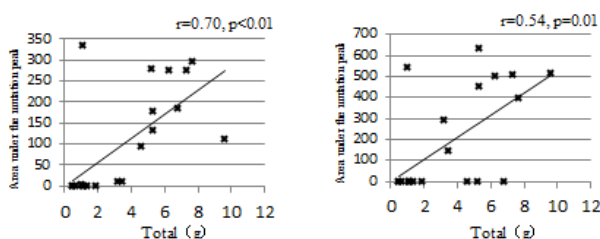
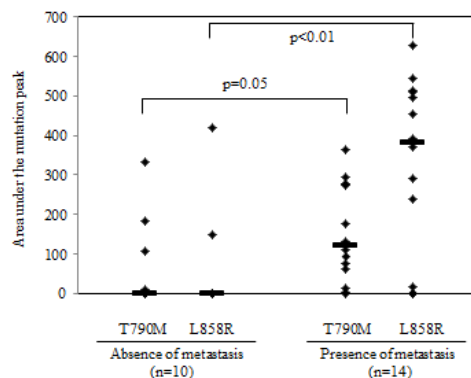


図4 総腫瘍量とctDNAの相関

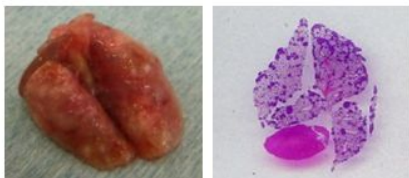


3. ヒト肺がん転移モデルマウスにおける転移形式と腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA との関

連

上皮間質転換(EMT)表現型をスクリーニングとして用い、肺がん細胞株 H1975 と H226B について皮下移植を行い転移形式について検討した。H1975 細胞を皮下移植すると全体の 93%で転移を認めたが、中でもリンパ節に高頻度(79%)に転移した。一方、H226B 細胞を皮下移植すると全例肺転移を認めた(論文投稿中、図 5)。前者をリンパ行転移、後者を血行性転移の系として、現在、原発巣と転移巣との DNA 変異、蛋白リン酸化の比較を行っている。リンパ行性転移については、原発巣と比べ、転移巣でリン酸化を認めた数種の分子を同定し、現在 Western blotting で確認中である。

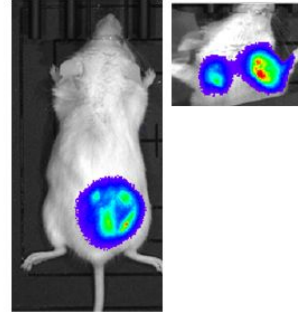
図5 H226B細胞皮下移植による肺転移



4. 第3世代 EGFR-TKI 投与後の腫瘍由来血漿遊離 DNA の変動

上記転移モデルマウスを用いて次世代 EGFR-TKI 処理を行い、原発巣、転移巣のモニタリングを行った。H1975 にルシフェラーゼ発現プラスミドを導入し、H1975-luc を作成した(図 6)。経時的に、腫瘍容量、転移頻度を *in vivo* イメージングシステムで解析可能になった。さらに、血漿遊離 DNA を経時的に採取し、腫瘍由来血漿遊離 DNA の変動解析を行った。また、上記動物モデルを用いて次世代 EGFR-TKI 耐性株を抽出している。耐性株を用いた耐性化機構の解析と、腫瘍細胞由来遊離 DNA への反映について検討中である。

図6 H1975細胞皮下移植によるリンパ節転移
原発巣 リンパ節転移



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6件)

1. Hosoya K, Matsusaka S, Kashiwada T, Suzuki K, Ureshino N, Sato A, Miki Y, Kitera K, Hirai M, Hatake K, Kimura S, Sueoka-Aragane N, Detection of *KRAS* Mutations in plasma DNA using a fully automated rapid detection system in colorectal cancer patients, *Pathol Oncol Res*, 2017 Jan 5. doi: 10.1007/s12253-016-0175-1. [Epub ahead of print]
2. Ide M, Koba K, Sueoka-Aragane N, Sato A, Nagano Y, Inoue T, Misago N, Narisawa Y, Kimura S, Sueoka E, Mutation profile of B-raf gene analyzed by fully automated system and clinical features in Japanese melanoma patients, *Pathol Oncol Res*. 2017;23:181-188.
3. Komiya K, Nakamura T, Nakashima C, Takahashi K, Umeguchi H, Watanabe N, Sato A, Takeda Y, Kimura S, Sueoka-Aragane N, SPARC is a Possible Predictive Marker for

- Albumin-bound Paclitaxel in Non-small Cell Lung Cancer, *Oncology Targets Ther.* 2016;9:6663-6668.
4. Sueoka-Aragane N, Katakami N, Satouchi M, Yokota S, Aoe K, Iwanaga K, Otsuka K, Morita S, Kimura S, Negoro S, For Hanshin-Saga Collaborative Cancer Study Group. Monitoring *EGFR* T790M with plasma DNA from lung cancer patients in a prospective observational study. *2016 Cancer Sci* 107(2):162-7.
 5. Umeguchi H, Sueoka-Aragane N, Kobayashi N, Nakamura T, Sato A, Takeda Y, Hayashi S, Sueoka E, Kimura S. Usefulness of plasma HGF level for monitoring acquired resistance to *EGFR* tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2015;33:391-6.
 6. Sueoka-Aragane N, Sato A, Kobayashi N, Ide M, Yokoo M, Nagano Y, Sueoka E, Kimura S. Correlation between plasma DNA and tumor status in an animal model. *PLoS One.* 2014;9:e111881.

〔学会発表〕（計 17 件）

〔図書〕（計 6 件）

1. 荒金尚子：血漿遊離 DNA の有用性と臨床応用. *呼吸器内科*, 29 (3), 2016
2. 荒金尚子：ctDNA による薬剤耐性遺伝子検出と次治療決定における有用性. *実験医学*, 羊土社 2016
3. 荒金尚子：血漿 DNA を用いた肺がん遺伝子診断. *Annual Review 呼吸器* 2015, 155-161, 2015、中外医学社

4. 荒金尚子：血漿 DNA を用いた *EGFR*-TKI 獲得耐性モニタリング *日本胸部臨床* 74 (6), 659-667, 2015 克誠堂出版
5. 荒金尚子、小林直美、中島千穂、田代宏樹、貞松宏典：呼吸器抄読会 *呼吸* 34, 629, 2015、一般社団法人呼吸研究
6. 小宮一利、荒金尚子：非小細胞肺がんの化学療法. *臨床と研究* 2015 大道学館

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒金 尚子 (ARAGANE NAOKO)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：20321846

(2) 研究分担者

佐藤 明美 (SATO AKEMI)
佐賀大学・医学部・研究員
研究者番号：20568357

中村 朝美 (NAKAMURA TOMOMI)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：90457490

(3) 連携研究者

木村 晋也 (KIMURA SHINYA)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：80359794 研究者番号：