

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460462

研究課題名(和文) 液状検体の遊離DNAを用いた新しい遺伝子変異検出法の確立

研究課題名(英文) Establish of new detection method of gene mutations using cell-free DNA in supernatant fluids

研究代表者

河原 明彦 (kawahara, akihiko)

久留米大学・大学病院・医療技術員

研究者番号：00469347

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)：気管支および体腔液細胞診検体中の上澄みに遊離しているDNAを用いてEGFR遺伝子変異の検出が可能か否かを調査した。培養細胞は時間依存的に細胞変性とCC3陽性細胞の増加、遊離DNA量が増加した。気管支細胞診51例の遊離DNAにおいて、EGFR遺伝子変異は22例の陽性症例に検出でき高感度を示したが、陰性症例は変異を検出できなかった。体腔液細胞診22例のEGFR遺伝子変異は陽性症例で高陽性率だったが、陰性症例は変異を認めなかった。EGFR遺伝子変異の検出において、上澄み遊離DNAはDNAが十分に確保できない症例を補うことが可能であり、沈査と同様にEGFR遺伝子変異を検出するのに役立つことができる。

研究成果の概要(英文)：We examined whether it was possible to detect EGFR mutations in cytology cell-free DNA (ccfDNA) from the supernatant fluids of bronchial and effusion cytology samples. Quantity and fragmentation of ccfDNA in the supernatant fluid and cell damage and CC3 expression in the sediment gradually increased in a time dependent manner in the cell lines. In the 74 clinical samples, the detection of EGFR mutations using ccfDNA showed a high sensitivity in samples with malignant cells. In contrast, EGFR mutations were not found in negative samples. The twenty-two patients of EGFR mutations were detected in 63.6% of ccfDNA from supernatant fluids. EGFR mutations were found in 81.3% (13/16) of malignant cell patients, whereas EGFR mutations were not found in the negative samples. Our results suggest that ccfDNA might help to compensate for the lack of adequate DNA in EGFR mutation analysis, and ccfDNA supernatant fluids can be used to detect EGFR mutation in the same way as cancer cell sediments.

研究分野：人体病理学

キーワード：分子病理学

### 1. 研究開始当初の背景

EGFR 遺伝子変異を有する肺がん患者はゲフィチニブなどの抗がん剤に効果を示すことが明らかとなっている。一方、ゲフィチニブを服用した患者の再発がん細胞は、2 次的遺伝子変異 (T790M) を獲得することが知られている。このようにがん細胞の遺伝子変異の有無は、がん患者の治療方針の決定に大きく影響を及ぼしている。近年、体内を循環している腫瘍細胞あるいは遊離 DNA の存在が明らかとなり、がん患者血清を用いた研究が進みつつある (図 1)。臨床的にがんの初発あるいは再発が疑われても、サンプル中のがん細胞が死滅/変性している場合、病理学的にがん診断に至らず (陰性) 決して遺伝子変異解析を施行することはない。しかしながら、がん細胞の遊離 DNA は液状検体中の上澄み液に必ず存在しているため、検体を無駄にせず EGFR などの特異的な遺伝子変異の解析が十分可能である (図 2)。また、液状中の遊離 DNA を用いた遺伝子変異解析の確立は、がん細胞が混在していない検体に対するバックアップシステムと成り得る。

### 2. 研究の目的

我々は、原発性肺癌患者の気管支擦過細胞診、気管支洗浄液および体腔液細胞診中に遊離する DNA から EGFR 遺伝子変異検出の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた時間変化におけるがん細胞の死滅/変性と遊離 DNA の関係を検証

培養細胞 PC9 (exon 19 mutation) と H1975 (exon 21 point mutation と exon 20, T790M) を用いて培養液中に数日間放置し、がん細胞を死滅/変性させる。その後、培養液を沈渣と上澄み液に分離する。沈渣は細

胞形態の観察と cleaved caspase 3 抗体を用いた免疫染色を施行し、上澄みからは DNA を抽出し EGFR 遺伝子変異解析を行う (図 3)。

細胞沈査サンプルの免疫染色 (immunostaining)

採取された細胞はサイトリッチ赤 (SurePath™ preservative fluids) で固定後、スミア標本およびセルブロックを作製し、セルブロックは 4 μm の厚さで薄切し、コーティングガラスに切片をのせる。免疫染色は Leica 社の自動免疫染色装置 (BOND III) を使用する。1 次抗体は、EGFR 遺伝子変異特異的抗体の E746-A750del (200 ×, #2085S; Cell Signaling), L858R mutant specific (200 ×, #3197S; Cell Signaling) および cleaved caspase 3 抗体 (400 ×; Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, Mass) を用いる。細胞標本は水洗後、内因性ペルオキシダーゼ処理を 5 分反応させる。pH9.0 のクエン酸緩衝液を用いて熱処理を 99 20 分間行う。1 次抗体は 30 分間反応させ、2 次抗体は Refine polymer detection system (Leica) を用いて室温で 30 分反応させる。DAB にて 5 分間発色し、対比染色はヘマトキシリンで核染色する。

DNA 遺伝子変異解析: TaqMan® mutation detection 法および F-PHFA (fluorescence resonance energy transfer-based preferential homoduplex formation assay) 法  
EGFR 遺伝子変異検索において、高感度である PCR を用いた F-PHFA 法と TaqMan® mutation detection 法を用いる。がん細胞からの DNA 抽出は、QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN, Valencia, CA) を使用する。一方、上澄み液からの DNA 抽出は、Master Pure DNA extractor kit (Wako, Osaka, Japan) を使用し、DNA 量の評価は BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) を用いる。

ターゲット遺伝子変異は EGFR 遺伝子の exon 19 (delE746-A750) と exon 21 (L858R) を中心に解析する。

#### (2) 臨床サンプルにおける遊離 DNA からの EGFR 遺伝子変異検出

気管支擦過および気管支洗浄細胞診 284 検体の中から肺腺癌患者 74 例の細胞診上澄み材料 (サイトリッチ赤と生理食塩水) を用いる。同様に、体腔液細胞診 327 例の中から EGFR 遺伝子変異を伴い且つ体腔液上澄み検体が保存されている肺腺癌患者 22 例を対象に、EGFR 遺伝子変異検出と細胞診断の関係を調査する。

### 4. 研究成果

#### (1) PC9 培養細胞における細胞ダメージと CC3 発現

パパニコロウ染色において、固定初日の核クロマチン形態は明瞭に観察されたが、時間依存的に核クロマチン凝集が顕著になっていった。中にはアポトーシス細胞の混在も認めた。同様に時間依存的に cleaved caspase 3 陽性細胞が増加していき、細胞死の進行を確認できた (図 4)。

#### (2) 培養上澄み液中の遊離 DNA 量と保存時間の関係

培養液中に遊離した DNA 量を調査した結果、遊離 DNA 量は平均で 45.1 ng DNA/μl (32.9-58.9 ng DNA/μl) 抽出することができた。上澄み中に有している DNA は初日 30 ng DNA/μl 抽出されたが、この量は時間依存的、すなわち細胞が崩壊することに伴い増加を示した (図 5)。

#### (3) 培養上澄み液中の遊離 DNA 量を用いた EGFR 遺伝子変異の検出

PCR 反応において、固定初日に採取した遊離 DNA と固定後 6 日 (144 時間後) の遊離 DNA を比較した結果、固定後 6 日 (144 時間後) の遊離 DNA は明らかに断片化を示し、

PCR 反応が偽陰性化した。

#### (4) 呼吸器検体における細胞診遊離 DNA の評価

呼吸器の臨床検体において、32 例のサイトリッチ赤から抽出した遊離 DNA と 42 例の生理食塩水から抽出した遊離 DNA を比較した結果、サイトリッチ赤の方は DNA 断片化がみられず (100% 野生型を検出)、気管支洗浄の方は DNA 断片化が少数みられた (90.4% 野生型を検出)。悪性あるいは異型細胞と診断された 51 例の遊離 DNA において、EGFR 遺伝子変異は 22 例に検出でき、感度 (80%)、特異性 (100%)、陽性的中率 (100%)、陰性的中率 (89.7%) および正確性 (94.1%) を示した。一方、陰性と診断された 19 例の遊離 DNA では、EGFR 遺伝子変異を検出することができなかった感度 (0%)。

#### (5) 体腔液検体における細胞診遊離 DNA の評価

体腔液細胞診 22 例において 16 例が悪性診断、2 例が異型細胞で 4 例が陰性診断であった。体腔液上澄み遊離 DNA を用いた EGFR 遺伝子変異解析において、22 例中 14 例 (63.6%) が EGFR 遺伝子変異陽性であった。細胞診断の関連において、EGFR 遺伝子変異は悪性診断で 81.3%、異型細胞診断で 50.0% の陽性率を認めたが、陰性診断の 4 例において EGFR 遺伝子変異陽性は認めなかった。

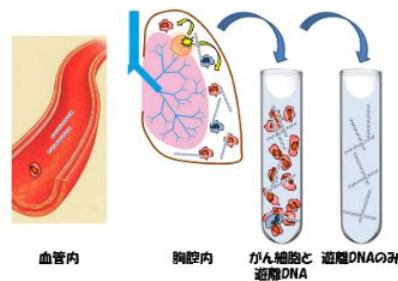


図 1 体腔液中の遊離 DNA

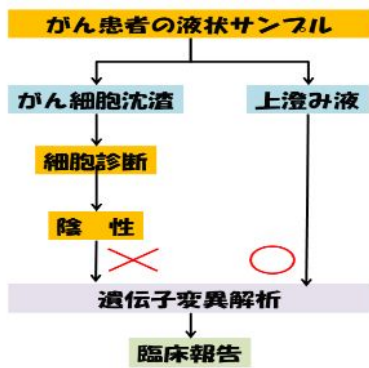


図2 臨床応用のアルゴリズム

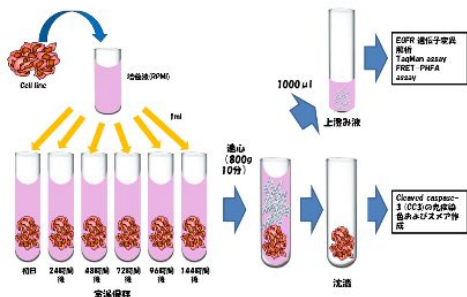


図3 液状検体分離から遺伝子変異解析

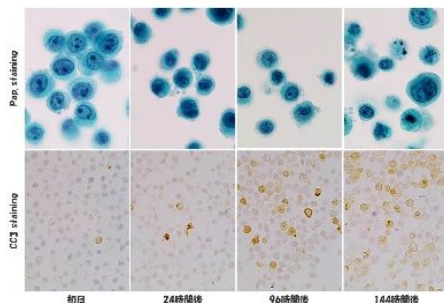


図4 培養細胞を用いた細胞変化

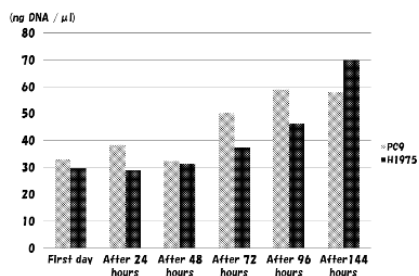


図5 上澄み DNA と時間との関係

## 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2件)

. Kawahara A, Fukumitsu C, Taira T, Abe H, Takase Y, Mutara K, Yamaguchi T, Azuma K, Ishii H, Takamori S, Akiba J, Hoshono T, Kage M. EGFR mutation status in cell-free DNA supernatant of bronchial washings and brushings. *Cancer Cytopathology*. 査読有 2015; 123(10): 620-8.

DOI:10.1002/cncy.21583

. Kawahara A, Taira T, Abe H, Watari K, Murakami Y, Fukumitsu C, Takase Y, Yamaguchi T, Akiba J, Azuma K, Ono M, Kage M. Fixation effect of SurePath preservative fluids using EGFR mutation-specific antibodies for immunocytochemistry. *Cancer Cytopathology*, 査読有, 122, 2014, 145-52.

DOI:10.1002/cncy.21355

[学会発表](計4件)

. 河原明彦. 分子病理診断における細胞診の役割: LBC の応用と可能性. 第58回日本臨床細胞学会総会. 2017年5月27日. 大阪

. Akihiko Kawahara, Chihiro Fukumitsu, Tomoki Taira, Hideyuki Abe, Yorihiro Takase, Kazuya Murata, Tomohiko Yamaguchi, Jun Akiba and Masayoshi Kage. Epidermal growth factor receptor mutation status in cell-free DNA supernatant of

bronchial cytology samples .The 19<sup>th</sup> International Congress of Cytology (ICC2016) . Symposium6 . Sunday, May 29, 2016 . 東京

. Kawahara, A, Fukumitsu, C, Taira, C, Abe, H, Takase, Y, Murata, K, Yamaguchi, T, Naito, Y, Akiba, J. Detection of EGFR mutation status in cell-free DNA supernatant of effusion cytology. 40<sup>th</sup> European Congress of Cytology. October 3, 2016. UK, Liverpool.

. Kawahara Akihiko, Fukumitsu Chihiro, Taira Tomoki, Abe Hideyuki, Takase Yorihiro, Murata Kazuya, Yamaguchi Tomohiko, Tanikawa Ken and Masayoshi Kage. Detection of activating EGFR mutation status using cytology cell-free DNA in supernatant from liquid-based cytology of bronchial washing and bronchial brushing samples. 39<sup>th</sup> European Congress of Cytology. September 21, 2015. Italy, Milan.

〔図書〕(計 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

河原 明彦 (KAWAHARA, Akihiko)  
久留米大学・病院病理部・副技師長  
研究者番号 : 0 0 4 6 9 3 4 7

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし