

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04814

研究課題名(和文)Liquid biopsyシーケンスによる肝臓がんの診断とバイオマーカー探索

研究課題名(英文)Liquid biopsy sequencing for liver cancer and pancreatic tumor

研究代表者

中川 英刀(Nakagawa, Hidewaki)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50361621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：37例の膵管内乳頭粘液性腫瘍患者からの膵液cfDNAについてエクソーム解析を行った。その結果、約半数の膵液について、KRASかGNASの変異を検出し、TP53やRNF43の変異も膵液で検出した。17p13や8q24のコピー数異常も検出した。悪性度と関連する膵液ゲノムマーカーを複数同定した。7例の肝臓癌血漿cfDNAについて、分子バーコード付ライブラリーを作成し、約100遺伝子についてシーケンスを行った。コンセンサス配列の取り方やフィルター方法を改善し、変異アレル頻度1%以上の変異は高い精度で同定可能となった。しかし、1%未満についてはノイズとの鑑別が難しくアルゴリズムの改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：Exome sequencing of the cfDNAs (cell-free DNAs) in pancreatic juices from 37 IPMT patients and a half of samples were found to have KRAS or GNAS mutations and some had mutations of TP53 and RNF43. Loss of 17p13 and amplification of 8q24 were found in the pancreatic juice cfDNAs. We identified some genomic markers in pancreatic juices associated with histological grade of IPMT. We also deeply sequenced 100 liver cancer genes of plasma cfDNA from seven liver cancer patients after constructing new NGS libraries installed with molecular barcoding system. We improved the algorithm to obtain the consensus reads and read filtering from these data, and succeed in calling somatic variants with more than 1% of VAF (variant allele frequency) in cfDNA. But less than 1% VAF is still difficult to discriminate from PCR and sequencing errors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Liquid biopsy シーケンス 肝臓がん 膵臓がん IPMT 膵液

1. 研究開始当初の背景

がんゲノムは、高い柔軟性と、個々のがん細胞が異なった変異をもつという不均一性 (heterogeneity) を有している。このがんゲノムの柔軟性に対応していくためには、治療の過程においてがんゲノムを随時モニターしていかなければならないが、固形腫瘍においては病態の変化に伴って経時的生検を行うことは不可能に近い。さらにはゲノムに基づく個別化医療の適応となるのは主に切除不能の進行・再発症例であり、がんゲノム解析・診断のために固形腫瘍の生検を一回でも行うことは多大な侵襲性があり、気管支鏡での生検や肝臓の針生検にて大出血をおこすと、死を招く可能性もある。肺がんの気管支鏡や膵臓腫瘍に対する針生検では、確実にがん細胞を取得できる保証もなく、臨床への展開を考えた場合、がんゲノムへの accessibility が大きな障害となってきた。そこで、血液や体液からの分子プロファイルを作成するという liquid biopsy の概念が今日提唱され、血液中の遊離 DNA (cell-free DNA: cfDNA) や循環腫瘍細胞の解析が最近注目され始めている。それらの単離・抽出技術の進歩も伴って、固形腫瘍においても、liquid biopsy として腫瘍細胞由来のゲノム解析が行われ、治療抵抗性のモニターや非侵襲な検査として用いられるようとしている。さらには、血漿中の cfDNA の解析は、個々のがん細胞ではなく、患者の全身としてがんの状態を反映している可能性もあり、ピンポイントで生検を行うことで診断を行う際に生じるがん不均一性の問題を克服した診断を行える可能性があることにも注目すべきである。進行がんや転移症例において比較的多くの cfDNA が検出されるが、腫瘍由来 (circulating tumor DNA: ctDNA) はその 0.1~10% ほどと、胎児の NIPT と比べると圧倒的に少量で解析が困難であるが、NGS や digital PCR といった超大量に DNA 分子を計測できる技術が発達し、cfDNA のわずかな割合でふくまれる ctDNA においても検出・計測することが可能になりつつある。今後、がんのゲノム変異のカタログの整備に伴い、ホットスポット変異だけにとどまらず、より網羅的なゲノムマーカーを cfDNA から検出していく戦略が求められる。

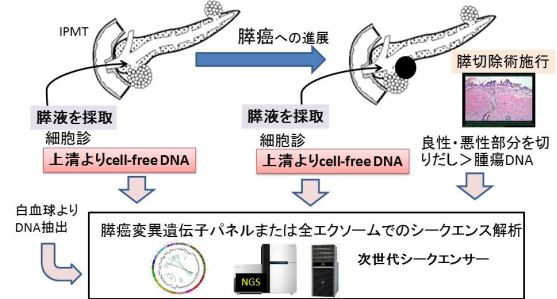
本研究は、生検検査が一般的に容易でない肝臓がんおよび膵臓腫瘍を対象として、網羅性をもった NGS 解析、100 個以上のがん関連遺伝子の全エクソン、または全遺伝子のエクソンでの分子プロファイル、担がん患者さんからの血漿および膵液からの cfDNA を用いて行い、がんゲノムバイオマーカーの探索およびそれらの臨床への真の意味での応用・診断に使用することを最終目的とする。

2. 研究の目的

がんのゲノム解析・診断を行う際に問題となるのは、生検などの侵襲的方法でがん細胞

を採取する点であり、非侵襲な採血によって癌の分子プロファイルを作成するという liquid biopsy が注目されている。本研究は、再発性肝臓と膵臓に進行する IPMT (膵管内乳頭粘液性腫瘍) 患者からの体液 (血漿や膵液) 中の cell-free DNA (cfDNA) の網羅的なゲノムシーケンス解析を行い、がん体細胞変異の検出およびその臨床現場への応用を目的とする。再発性肝臓については、血漿 cfDNA によって転移性 (IM)・多中心性発生 (MC) の判定を行い、また sorafenib や他の分子標的薬の適応を示唆する actionable 変異の探索を行う。IPMT については、膵液 cfDNA と切除標本からの DNA での体細胞変異プロファイルの比較検討を行い、膵臓がんへの進展・合併を示唆するゲノムバイオマーカーの探索を行う。

図2 IPMT (膵管内乳頭粘液性腫瘍) の膵液変異プロファイルによる膵臓がん進展の予測



- ✓ 膵液 cfDNA の変異が、不均一な IPMT の腫瘍細胞のゲノムを反映する
- ✓ 膵液 cfDNA にて腫瘍化に関わる遺伝子の変異 (TP53, SMAD4 など) を検出

3. 研究の方法

和歌山県立大学および山梨大学より IPMT 患者からの膵液を合計 49 例について収集を行い、膵液より cfDNA の抽出を行った。NGS での解析を行える十分な量がとれ、コントロールとなる正常 DNA も確保できたのは 37 例であり、KAPA hyperprep kit (Kapa 社) を用いて、10ng の input にて NGS ライブラリーの作成を行った。DNA-RNA hybrid capture 法による Exome capture を行い、膵液 cfDNA については x200-x150、正常 DNA については x100 を目標に NGS (HiSeq2500) でのシーケンスをおこなった。

肝臓の血漿 cfDNA については、広島大学より 7 例の血漿 cfDNA について入手した。molecular-barcoding のついた NGS ライブラリー (Rubicon 社) の作成を行い、肝臓ターゲット遺伝子 (約 100 遺伝子) について DNA-RNA hybrid capture 法による濃縮を行い、HiSeq2500 による deep sequencing (x8000) を行った。また、対応する肝臓と白血球の DNA についてもターゲットシーケンスを行い、変異を同定し、血漿 cfDNA で検出した変異と比較した。

4. 研究成果

膵液の cfDNA の exome sequencing data が

ら、複数の read のフィルタリングを行い、VarScan2 および GENOMON2 を用いて、変異 call を行った。その結果、32 例の腓液について解析が可能であり 15/32 について KRAS 遺伝子変異、10/32 について GNAS 遺伝子変異を検出できた(図2)。IPMT は、KRAS または GNAS のどちらかの変異がほぼすべての細胞に入っていると考えられており、15/32 (47%) については KRAS/GNAS の変異を検出しておらず、腫瘍細胞由来の DNA が感度以下しか含まれていないものと考えられる。KRAS/GNAS 以外に、TP53 や RNF43 の変異 20-25%の腓液で検出した。

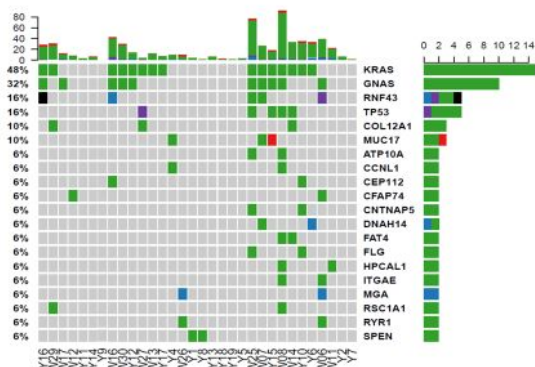


図2 IPMTの腓液cfDNAのエクソーム解析にて検出した遺伝子変異

さらには、これらの exome のデータから新規のフィルター方法を開発し、コピー数異常の検出をおこなった。GISTIC2 にて、TP53 が位置する染色体 17p13 の欠失や MYC 遺伝子が位置する染色体 8q24 の領域の増幅などを IPMT のコピー数異常の領域として検出した。これら腓液 DNA の変異情報と臨床病理情報との関連解析を行い、IPMT の病理学的悪性度(グレード)と関連するゲノムマーカーを複数同定した。

また、TP53 の変異が同定された 2 症例について、FFPE 標本を入手し浸潤癌の部位より DNA を抽出し、浸潤がんの部位に TP53 の変異があることを確認できた。

肝臓がんの血漿 cfDNA からの変異 call の方法について、molecular barcoding 法での NGS ライブラリーに切り替えたこともあり、変異検出のアルゴリズムの大幅な修正を行った。molecular barcoding によるコンセンサス配列の取り方および、cfDNA 特有の短い read のフィルターの方法を改善しており、VAF (variant allele frequency) が 1%程度の変異は高い精度で同定することができるようになった。これら 1%以上の VAF の変異については、同じ腫瘍から抽出した DNA の変異データと多くが一致していた。しかしながら、依然、cfDNA の 1%未満の VAF については、シーケンシングエラーや PCR エラーによるものと考えられるノイズとの鑑別が難しく、molecular barcoding からのコンセンサスの取り方とフィルターや統計学的変異コール

の方法など、さらなるアルゴリズムの改良を行っている。また、1%以上の VAF の変異については、ddPCR での確認作業も行っている。さらには、13 例追加の肝臓がんの TACE 後の血漿から cfDNA を抽出し、molecular barcoding のついたライブラリーの作成を行って、アルゴリズム改良後の精度確認のためのデータセットの産出を行った。

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3件)

Wardell CP, Fujita M, Yamada T, Simbolo M, Fassan M, Karlic R, Polak P, Kim J, Hatanaka Y, Maejima K, Lawlor RT, Nakanishi Y, Mitsuhashi T, Fujimoto A, Furuta M, Ruzzenente A, Conci S, Oosawa A, Sasaki-Oku A, Nakano K, Tanaka H, Yamamoto Y, Kubo M, Kawakami Y, Aikata H, Ueno M, Hayami S, Gotoh K, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Getz G, Scarpa A, Hirano S, Nakamura T, and Nakagawa H. Genomic characterization of biliary tract cancers identifies their driver genes and predisposing mutations. *J Hepatol* 68:959-969 (2018) DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.009 (査読有)

Furuta M, Ueno M, Fujimoto A, Hayami S, Yasukawa S, Kojima F, Arihiro K, Kawakami Y, Wardell CP, Shiraiishi Y, Tanaka H, Nakano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Tokunaga N, Boroevich KA, Abe T, Aikata H, Ohdan H, Gotoh K, Kubo M, Tsunoda T, Miyano S, Chayama K, Yamaue H, and Nakagawa H. Whole genome sequencing discriminates hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis from multi-centric tumors *J Hepatol* 66: 363-373 (2017) DOI: 10.1016/j.jhep.2016.09.021 (査読有)

中川英刀 がんゲノムデータベースから cfDNA クリニカルシーケンスへ 実験医学 35(6): 993-996 (2017) (査読なし)

[学会発表](計2件)

中川英刀 「Cell-free DNA のシーケンシング解析の課題」NGS 現場の会(招待講演) 2017年

中川英刀 “Sequencing analysis of plasma and pancreatic juice cell-free DNAs for cancer diagnosis” 第75回日本癌学会総会 International session (招待講演) 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 英刀 (Nakagawa, Hidewaki)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：50361621

(2)研究分担者

山上 裕機 (Yamagami, Yuki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191190

(3)連携研究者

川上 由育 (Kawakami, Yoshiiku)

広島大学・医学部・講師

研究者番号：70403516

藤本 明洋 (Fujimoto, Akihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：30525853

ワーデル クリス (Wardell, Chris)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医
科学研究センター・研究員

研究者番号：70748805