

令和元年9月5日現在

機関番号：94313

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05400

研究課題名(和文) エピジェネティクスによる乳癌血中循環DNAの由来プロファイリングとその臨床応用

研究課題名(英文) Epigenetic profiling of cfDNA in breast cancer samples

研究代表者

佐藤 史顕 (SATO, FUMIAKI)

株式会社関西メディカルネット(関西電力医学研究所)・外科(神経内分泌腫瘍・乳癌)研究部・上級特別研究員

研究者番号：20467426

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)：本研究の目的は血中浮遊DNAの由来をエピジェネティックに分類し、がん診断・治療効果予測に応用する事である。網羅的メチル化データより、種々の細胞に特異的なエピゲノムマーカーを同定し、cfDNA由来プロファイリング法をデジタルPCR機器を用いて確立し、臨床応用する。乳癌細胞の同定として乳癌に高率で遺伝子変異をしているPIK3CAやESR1のHot spot変異を識別する検出系を確立した。また、それぞれの細胞種のエピゲノムマーカーを、公的データベースから正常細胞、癌細胞の網羅的エピゲノムデータから特異性の高いマーカーの同定が困難で、各胚葉由来マーカーの組み合わせによるモデルが必要であると判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌症例のcfDNAの由来が判明することで、腫瘍組織内構成細胞のターンオーバーを推測することができると思われる。特に免疫細胞由来DNAの割合は腫瘍組織内の免疫活動の状況を反映していると考えられる。抗がん剤や抗体医薬で腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)に対する研究が近年盛んになっている。更に、抗PD-1抗体薬等の免疫チェックポイント阻害剤の臨床応用が始まっているが、その効果予測因子の探求が盛んに行われている。既存の抗がん剤・抗体医薬による薬物療法だけでなく、この新規の免疫チェックポイント阻害療法の効果予測に重要な情報を提供することで、癌薬物療法の個別最適化に大きく寄与する可能性がある

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to profile the origin of cfDNA epigenetically and to utilize the profile for cancer diagnosis and therapeutic response prediction. The epigenetic markers for the profiling were identified from comprehensive epigenetic array data, and primer-probe sets were established for digital PCR machine. To detect breast cancer-origin cfDNA, primer probe sets specific to hot spot mutations in PIK3CA and ESR1 were made. To identify epigenetic markers for each cell type was difficult, and combination of markers for different germ-layer cells will be necessary

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 cfDNA エピジェネティクス 由来

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

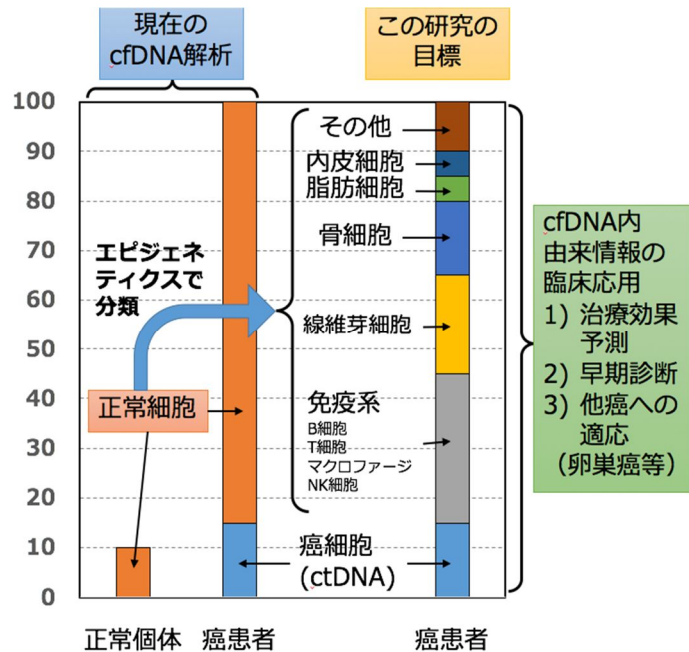
### 1. 研究開始当初の背景

近年、**血中循環腫瘍 DNA(ctDNA)**が癌診断への臨床応用という点で注目を浴びている。Dawson ら (NEJM, 2013)は、古典的血清腫瘍マーカー(CEA, CA15-3 等)や血中循環腫瘍細胞(CTC)と比較して、転移性乳癌のモニタリングに対する ctDNA の有用性を示した。ctDNA が注目される理由として、1)ゲノムレベルで癌組織内に不均一性があるので一部の癌組織生検標本の解析結果が患者体内の腫瘍の全体像を反映しているわけではないが、血中 ctDNA は全体像を反映していると考えられている。2)遺伝子変異が癌細胞に対して非常に特異度が高いこと、3)DNA は RNA や蛋白質に比べ安定で臨床検査の材料として扱いやすい、4)微量の変異 DNA を検出する技術(デジタル PCR や分子 barcode 化 sequencing 等)が確立してきたこと、5)「患者に優しい」診断技術として **Liquid biopsy 標本**を用いた診断法の開発が望まれている、などが挙げられる。乳癌においても ctDNA 解析が行われつつあるが、問題点もある。乳癌のサブタイプによって遺伝子変異のパターンが異なるため、遺伝子変異が未知の標本では、高価な網羅的ゲノム解析をすれば感度は上がるが、安価であるが既知の変異しか検出できない PCR 系アッセイでは、少数の標的変異を絞り込んで解析すると感度が下がる。

癌患者の**血中浮遊 DNA (cfDNA)**濃度が上昇していることは少なくとも 1970 年代には報告されている (Leon Cancer Research, 1977)。しかし、**実はその DNA がどこから来ているかは知られていない**。遺伝子変異の検出によって癌細胞由来 DNA の割合は測定できる。最近の研究によると、**癌転移再発症例でも多くが 1~30%の範囲にあり 50%を超えることは殆どない**(Spindler 2015 PlosOne の図より推定)。一方、我々は 2013 年より ctDNA の epigenetics 解析で乳癌を早期診断する方法・アルゴリズムを開発してきた(ページ 10)。その中で内部標準のプライマーによる血中 DNA アレル数に比べ、乳癌マーカー陽性のアレル数の頻度は低く、cfDNA の多くが癌細胞以外の細胞種から由来するであろうという同様の現象を見出していた。

### 2. 研究の目的

一般的に血中循環 DNA(cfDNA)濃度は癌症例で上昇している。が、癌細胞由来血中循環 DNA(ctDNA)はその上昇分の一部(転移症例でも多くが 30%程度まで)にしからず、その他の上昇分の由来はわかっていない。当研究では、epigenetics を用いて cfDNA の由来を検出する手法を確立する。この cfDNA の由来プロファイリング情報は癌組織の微小環境状態を反映していると考えられ、癌組織病態のより正確な把握を促すと期待される。この cfDNA 由来プロファイリングを乳癌の治療効果予測、早期診断などに応用することをこの研究の最終目標とする。



### 3. 研究の方法

#### 1) デジタル PCR を用いた cfDNA の由来プロファイリング法の開発

B/T 細胞由来 cfDNA の検出法の開発

他の細胞由来 cfDNA の検出法の開発

ゲノム組換えのない正常細胞は DNA 配列は同一なので通常 PCR では区別がつかない。体内の 200 以上あると言われている異なる細胞種の分化は epigenetic が制御していると考えられている。腫瘍組織内の構成細胞のそれぞれに、特異的 epigenetic パターンを同定しマーカーにすることで、cfDNA の由来細胞のパターンを推測することができる。他の細胞種のメチル化プロファイルは、公的 database GEO (Gene Expression Omnibus) から可及的に入手する(例、GSE40699: 種々の細胞腫、GSE68851: 線維芽細胞、GSE67024: 脂肪細胞、GSE59796: 樹状細胞、GSE46648: 破骨細胞、GSE34486: リンパ管内皮、GSE68456, GSE54671: 種々の白血球分画、等)。腫瘍組織内の非癌細胞も、正常組織内とは性格が変化していることが知られている。これらの epigenetics データを統合解析し、それぞれの細胞種に特異的な DNA メチル化領域を同定する。そしてこれらに対してメチル化特異的 PCR のプライマー・プローブを複数設計し、実際の細胞由来 DNA を使ってスクリーニングを行う。同定した各種細胞のマーカーと既に構築してる癌細胞

のマーカーを合わせて cfDNA の由来プロファイリングのアッセイ法とアルゴリズムを開発する。

## 2) cfDNA 由来プロファイルと乳癌組織構成細胞比率との相関。

3) 局所進行・転移再発乳癌における薬物療法の治療応答性予測とそのモニタリング：京都大学乳腺外科とその関連施設で、エリブリンを中心とする観察研究(「HER2 陰性ホルモン療法耐性転移乳癌患者における 1 次または 2 次化学療法としてのエリブリン療法の効果を探索する観察研究」E-SPEC 試験、UMIN:UMIN00018178)での標本を用い、「転移性乳癌の薬物治療応答性を治療開始前または治療開始早期に予測」モデルを開発する。

4) これらのモデルを術前補助療法の効果予測、乳癌早期診断の精度改善、他癌への応用と進めていく。

## 4. 研究成果

本研究は、血中浮遊 DNA の由来を epigenetic で分類し、がん診断・治療効果予測に応用しようというものである。網羅的メチル化アレイデータより、種々の細胞種に特異的な epigenetic マーカーを同定し、それを活用した cfDNA 由来プロファイリング法をデジタル PCR 機器を用いて確立し、その後、この由来プロファイリング法が、乳癌転移再発症例、術前補助療法症例の効果予測、原発巣や術後再発の診断、他癌の診断に応用できるかを検証する予定である。乳癌細胞そのものの同定としてゲノム変異に対する PCR を用いる。乳癌に高率で遺伝子変異をしている PIK3CA の exon9, 20 にある Hot spot に対する mutation (1624G>A, 1633G>A, 3140A>G, 3140A>T) を識別する PCR primer probe セットをデザイン。また、ルミナル型乳がんの再発症例で変異率が上昇している ESR1 遺伝子の変異 Hot spot であるリガンド結合ドメインの変異(1609T>A, 1610A>G, 1610A>C, 1613A>G)を検出する PCR もデザインした。また、それぞれの細胞種の epigenetics marker を、公的データベースから正常細胞、癌細胞の網羅的 epigenetics データを入手しマーカーの同定を試みた。目的の細胞種以外で完全に無メチル化でその細胞種のみメチル化しているという特異性の高い marker の同定が困難であることが判明。内・外・中胚葉由来マーカーなどとの組み合わせで、計算で由来細胞のプロファイリングをする方向性が必要であると思われる。このプロファイリング方が確立した後、使用する標本は、収集を継続している。また、以前の乳癌マーカーの陽性率を、1024 種の癌細胞株のメチル化アレイデータみると、特異度が高いマーカーと、汎腫瘍マーカーとにわけられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- 1) In silico analysis-based identification of the target residue of integrin  $\alpha 6$  for metastasis inhibition of basal-like breast cancer.  
Tanaka S, Senda N, Iida A, Sehara-Fujisawa A, Ishii T, Sato F, Toi M, Ito J.  
Genes Cells. 2019 Jul 11. doi: 10.1111/gtc.12714.
- 2) Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRP1/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network.  
Kiso M, Tanaka S, Saji S, Toi M, Sato F.  
Int J Cancer. 2018 Dec 1;143(11):2905-2918. doi: 10.1002/ijc.31645.
- 3) Real-time navigation system for sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients using projection mapping with indocyanine green fluorescence.  
Takada M, Takeuchi M, Suzuki E, Sato F, Matsumoto Y, Torii M, Kawaguchi-Sakita N, Nishino H, Seo S, Hatano E, Toi M.  
Breast Cancer. 2018 Nov;25(6):650-655. doi: 10.1007/s12282-018-0868-2.
- 4) Sal-like 4 protein levels in breast cancer cells are post-translationally down-regulated by tripartite motif-containing 21.  
Ito J, Li W, Ito S, Tanaka S, Matsumoto Y, Sato F, Toi M.  
J Biol Chem. 2018 Apr 27;293(17):6556-6564. doi: 10.1074/jbc.RA117.000245.
- 5) SALL4 - KHDRBS3 network enhances stemness by modulating CD44 splicing in basal-like breast cancer.  
Matsumoto Y, Ito J, Sato F, Toi M.  
Cancer Med. 2018 Feb;7(2):454-462. doi: 10.1002/cam4.1296.
- 6) Circulating cell-free DNA-based epigenetic assay can detect early breast cancer.  
Uehiro N, Sato F, Pu F, Tanaka S, Kawashima M, Kawaguchi K, Sugimoto M, Saji S, Toi M.  
Breast Cancer Res. 2016 Dec 19;18(1):129.
- 7) The Sal-like 4 - integrin  $\alpha 6 \beta 1$  network promotes cell migration for metastasis via

activation of focal adhesion dynamics in basal-like breast cancer cells.

Itou J, Tanaka S, Li W, Iida A, Sehara-Fujisawa A, Sato F, Toi M.

Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2017 Jan;1864(1):76-88. doi: 10.1016/j.bbancr.2016.10.012.

- 8) A homeobox protein, NKX6.1, up-regulates interleukin-6 expression for cell growth in basal-like breast cancer cells.

Li W, Itou J, Tanaka S, Nishimura T, Sato F, Toi M.

Exp Cell Res. 2016 May 1;343(2):177-189. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.03.023.

〔学会発表〕(計10件)

- 1) Uehiro N, **Sato F**, Saji S, Toi M.

Twelve epigenetic marker panel for circulating DNA in plasma can detect early breast cancer.

米国癌学会 2016, New Orleans. 2016/4/20

- 2) Kiso M, Sato F, Sunao Tanaka, Masakazu Toi

VEGFA/NRP1 signal contributes to cell adhesion and motility in breast cancer cells.

米国癌学会 2016, New Orleans. 2016/4/17

- 3) Marina Kiso, Sunao Tanaka, Masakazu Toi, Fumiaki Sato

VEGFA/NRP1 signal contributes to filopodia formation in breast cancer cells

米国癌学会 2017, Washington DC. 2017/4/1-5

- 4) 山口絢音、石黒洋、鳥井雅恵、松本純明、川口展子、高田正泰、鈴木栄治、竹内恵、佐藤史顕、戸井雅和

Basal-like 乳がん症例におけるシスプラチン含む術前化学療法 の予後への影響に関する後向き解析

第25回乳癌学会(福岡) 2017.7.13-15

- 5) 西村友美、石黒洋、眞鍋恵理子、河口浩介、木曾末厘乃、鳥井雅恵、松本純明、川口展子、高田正泰、竹内恵、鈴木栄治、佐藤史顕、戸井雅和

日本人乳癌患者におけるオランザピン(アプレピタント非併用) の化学療法誘発性悪心嘔吐抑制効果

第25回乳癌学会(福岡) 2017.7.13-15

- 6) 平田希美子、小野幸果、戸井雅和、佐藤史顕、鈴木栄治、竹内恵、高田正泰、吉村通央

乳癌における乳房切除術後胸壁・所属リンパ節再発に対する 放射線療法成績の遡及的検討

第25回乳癌学会(福岡) 2017.7.13-15

- 7) 佐藤史顕、植弘奈津江、佐治重衡、戸井雅和

Circulating DNA に対するエピジェネティック解析の乳癌診断への応用

第26回乳癌学会(京都) 2018.5.16-18

- 8) 高田正泰、竹内恵、鈴木栄治、佐藤史顕、松本純明、鳥井雅恵、川口展子、西野裕人、瀬尾智、波多野悦郎、戸井雅和

蛍光色素法センチネルリンパ節生検におけるプロジェクション マッピングを用いたリアルタイムナビゲーション

第26回乳癌学会(京都) 2018.5.16-18

- 9) 木下貴之、福岡英祐、井口雅史、佐藤史顕、中山貴寛、山崎直也、神野浩光、菊池真理、淡河恵津世、戸井雅和

化学療法中乳癌患者の脱毛に対する PAX-15 の群間比較試験の 第1報(HOPE 試験)

第26回乳癌学会(京都) 2018.5.16-18

- 10) 小野幸果、平田希美子、戸井雅和、佐藤史顕、鈴木栄治、竹内恵、高田正泰、吉村通央

乳房温存手術後断端陰性例に対する腫瘍床ブースト照射の必要 な対象について

第26回乳癌学会(京都) 2018.5.16-18



〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://kepmri.org/divisions/外科\(神経内分泌腫瘍\)研究部2017/](http://kepmri.org/divisions/外科(神経内分泌腫瘍)研究部2017/)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：戸井雅和

ローマ字氏名：Masakazu Toi

所属研究機関名：京都大学大学院医学研究科

部局名：乳腺外科学

職名：教授

研究者番号(8桁)：10207516

研究分担者氏名：鈴木栄治

ローマ字氏名：Eiji Suzuki

所属研究機関名：京都大学大学院医学研究科

部局名：乳腺外科学

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00612897

### (2)研究協力者

なし