

令和元年5月20日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10150

研究課題名(和文)メラノーマ患者の血液循環腫瘍由来RNAを用いた病勢モニタリング法の確立

研究課題名(英文) Establishment of monitoring by circulating tumour RNA in patients with metastatic melanoma

研究代表者

宇原 久 (UHARA, Hisashi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：40201355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞を用いた基礎実験を経て、進行期患者2名と、健常人2名の血漿中のMART-1-mRNA定量解析をDroplet digital PCR法で試みた。血漿中のMART-1-mRNA濃度は健常人に比べて患者が有意に高かったが、その量は極めて微量であった。腫瘍量が多い患者であっても血漿中のMART-1-mRNA量は少なかったことより、MART-1以外のより最適なマーカーの選出が患者毎に必要と考えた。そこで、シングルセルRNAシークエンスで個々の患者の原発巣で高発現しているmRNAから腫瘍細胞群をクラスター化して、病勢モニタリングに適した分子群の選択法の確立を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤の効果は3ヵ月ごとの画像検査(CTなど)が用いられているが、治療効果をよりリアルタイムにモニターできる検査法が必要である。本研究はメラノーマ細胞に高発現している4つの分子について、患者末梢血中からのRNAの定量的検出を試みた。正常人に比べて患者ではMART-1値が高かった。しかし、現在最も高感度の検出法を用いても末梢血中から検出てきたRNA量は微量であり、モニタリングに使用できる量ではなかった。本研究では現在最も高感度の検出法を確立できた。さらに、末梢血のモニタリングに適した候補分子を患者毎に選別する必要があることを示唆した点より、次の段階の検査法の開発につながったと考える。

研究成果の概要(英文)：Monitoring markers are emerging with which we can frequently and easily evaluate the efficacy of systemic therapy. We established high sensitive quantitative analysis of the mRNA of Tyrosinase, MART-1, gp100 and Tyrosinase related protein in vitro. Because MART-1-mRNA showed the highest sensitivity among the examines molecules, we performed the analysis in the peripheral blood samples of 2 patients with advanced melanoma and 2 normal individuals. The concentration of MART-1-mRNA (Reference gene: GAPDH) was significantly higher in the melanoma patients than normal individuals. However the amount of MART-1 mRNA is not enough to use for monitoring. The result suggested that more suitable candidates as monitoring marker are required, probably in each patient. So, we try now to establish the analytic system to detect individualized candidates for suitable biomarkers by using single-cell RNA sequencing.

研究分野：皮膚科

キーワード：メラノーマ リキッドバイオプシー 血液循環腫瘍RNA モニタリング MART-1

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

1. 研究開始当初の背景

これまで治療が困難であった転移性メラノーマに対する新薬が 2014 年より次々と登場し始めた。現在喫緊の課題は、最も有効性が期待できる薬剤の選択、使用の順番、耐性の早期発見である。つまりがん治療において薬剤の効果を最大限に引き出すためには、腫瘍の状態をリアルタイムに正確に評価するバイオマーカーが必要不可欠である。

血液循環腫瘍由来 DNA (ctDNA: circulating tumor DNA) は癌細胞が崩壊することによって、末梢血に現れる。生体内の腫瘍の状態をリアルタイムに反映する新しいバイオマーカーとして注目されている。私たちはこれまでに BRAF 変異を有する進行期メラノーマ患者の血漿を用いて ctDNA の解析を行ってきた。そして、ctDNA の変化が乳酸脱水素酵素 (LDH) や CT 画像の評価と相関することを見出している。しかし、ctDNA による解析は、特定の遺伝子異常がわかっている患者にしか使えない (日本人では BRAF 変異: 約 30%、NRAS 変異: 10 数%)。癌患者の末梢血中には DNA の他にも RNA やエクソソーム、microRNA など様々な Circulating tumor products が流れている。メラノーマはメラノサイトの悪性腫瘍なのでその進行にしたがい、血液中のメラニン関連蛋白由来の mRNA 量も増加することが予測された。本研究では、末梢血中に流れるメラニン関連蛋白 (Tyrosinase, MART-1, gp100, Tyrosinase related protein: TRP) の mRNA を定量解析し、すべてのメラノーマ患者に使える新規のバイオマーカーとなりうるかを検証する。血液循環腫瘍 RNA についてはこれまで関連する論文はきわめて少なく、検出や解析方法は確立されていない。したがって、サンプリングから RNA の抽出、逆転写反応、検出まで基礎的な検証が必要であると考えられる。また、ctDNA についてもさらに解析を進め、薬剤による効果と耐性化の早期発見に有効なバイオマーカーとなるかを検証する。

2. 研究の目的

本研究では、患者の末梢血から腫瘍由来 DNA (ctDNA) と RNA (ctRNA) を抽出し、治療効果のモニタリングや、耐性化の早期発見に有用なバイオマーカーを見出すことを目指す。DNA に関しては、治療薬の標的となる BRAF、NRAS、KIT に焦点を当てる。RNA についてはメラノサイト関連蛋白である Tyrosinase, MART-1, gp100, Tyrosinase related protein (TRP) の発現量を定量する。治療薬の投与時期と関連づけて、腫瘍に関連する DNA や RNA の変化を解析することで、末梢血のバイオマーカーとして有用であることを明らかにする。特に、ctRNA については検出法や解析方法が確立していないため、新規のマーカーとなりうるかを検証する。

3. 研究の方法

ctDNA の抽出法や解析方法は私たちが以前に発表した論文のとおり行った (文献 X)。ctRNA について抽出法や検出感度、解析方法を検討した。

(1) 血漿から RNA の抽出

Plasma/Serum RNA Purification Maxi Kit (Norgen Biotek 社) を用いて健常人血漿サンプル 2ml から 50ul の RNA 溶液を抽出し、蛍光測定法で定量した。

(2) cDNA 合成

微量の RNA から効率よく cDNA を合成するために iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad 社) を用いた。

(3) mRNA 発現の検出感度の検討

5 つのメラノーマ細胞株を用いて Tyrosinase, MART-1, gp100, TRP について Droplet digital PCR (ddPCR) により解析した。Reference として GAPDH を用いた。

(4) 対象患者の選別

転移巣を有するメラノーマ患者を対象とした。手術や生検による腫瘍組織を用いて、Sanger 法にて BRAF, NRAS, KIT の遺伝子変異を解析した。また、免疫染色にて Tyrosinase, MART-1 の発現の有無を調べた。

(5) 患者の血漿サンプルを用いた定量解析

ddPCR 法により、ctDNA, ctRNA (MART-1-mRNA) を定量した。

4. 研究成果

(1) ctDNA による治療前後のモニタリング

BRAF や NRAS 変異を有する進行期メラノーマ患者について、抗 PD-1 抗体や BRAF/MEK 阻害薬治療前後の ctDNA をモニタリングした。ctDNA は薬剤開始後早期に変化し、その後の画像評価と治療効果が一致していた。また、画像検査の前に ctDNA が上昇し、早期に病勢の悪化を把握できた症例もみられた。

(2) mRNA の検出感度

メラノーマ細胞により発現量は様々だったが、低濃度 RNA であってもメラノーマ関連蛋白の mRNA の定量が可能であった。

(3) 患者血漿中の MART-1-mRNA 発現

血漿中の RNA 濃度は、健常人に比べ患者の方が有意に高かった。患者 1 名の血漿から MART-1 が検出された。しかし検出された MART-1 発現量は微量であった。このように微量にしか検出されない場合、偽陽性と陽性との判別が難しい。これらの結果から、かなり進行期で腫瘍量が多い患者であっても血漿中の MART-1-mRNA 発現量は少なかったため、解析できる症例が限定されることがわかった。

以上より、ctDNA を用いた病勢のモニタリングは早期の治療効果判定や薬剤耐性の発見に有用であることがわかった。次に、メラノーマ細胞に高発現している代表的な 4 つの分子 (Tyrosinase, MART-1, gp100, TRP) について培養細胞を用いて検出感度を検討した。次に、患者末梢血中からの RNA の定量的検出を試みた。正常人に比べて患者では MART-1 値が高かったが、現在最も高感度の検出法を用いても末梢血中から検出てきた RNA 量は微量であり、モニタリングに使用できる量ではなかった。最適なマーカーとなりうる発現分子の種類やその組み合わせを患者毎に探すシステムの構築が必要と考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Ashida A, Sakaizawa K, Uhara H, Okuyama R: Circulating Tumour DNA for Monitoring Treatment Response to Anti-PD-1 Immunotherapy in Melanoma Patients. Acta Derm Venereol 97:1212-1218, 2017

(2) Sakaizawa K, Ashida A, Uhara H, Okuyama R: Detection of BRAFV600K mutant tumor-derived DNA in the pleural effusion from a patient with metastatic melanoma. Clin Chem Lab Med 55:e92-e95, 2017

(3) Ashida A, Uhara H, Mikoshiba A, Sakaizawa K, Kumagai N, Koga H, Okuyama R: Melanoma with BRAF Mutation in Circulating Cell-free DNA despite no Mutation in the Primary Lesion: A Case Report. Acta Derm Venereol 96:128-9, 2016

(4) Ashida A, Sakaizawa K, Mikoshiba A, Uhara H, Okuyama R: Quantitative analysis of the BRAF V600E mutation in circulating tumor-derived DNA in melanoma patients using competitive allele-specific TaqMan PCR. Int J Clin Oncol, 2016

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Atsuko Ashida, Kaori Sakaizawa, Hisashi Uhara, Ryuhei Okuyama
Circulating tumour DNA for monitoring treatment response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. 47th ESDR 2017 9/27-9/30 ザルツブルグ

(2) 芦田敦子、境澤香里、宇原久、奥山隆平. Quantitative analysis of the BRAFV600E in circulating tumor-derived DNA using competitive allele-specific TaqMan PCR in melanoma patients. 30 回表皮細胞研究会. 2016/11/12 弘前

(3) 境澤香里、芦田敦子、宇原久、奥山隆平. 胸水中の cell-free DNA より BRAFV600K を検出できた進行期悪性黒色腫の 1 例. 80 回東部支部学術大会 2016/10/29-30 浜松

(4) 芦田敦子、境澤香里、宇原久、奥山隆平. Evaluation of response to nivolumab treatment in patients with metastatic melanoma using circulating tumor DNA. 75 回日本癌学会学術総会. 2016/10/6-8 横浜

〔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:

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：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：芦田 敦子
ローマ字氏名：ashida atsuko
所属研究機関名：信州大学
部局名：学術研究院医学系皮膚科
職名：助教

(2) 研究者番号（8桁）：00596786

研究分担者氏名：奥山 隆平
ローマ字氏名：okuyama ryuhei
所属研究機関名：信州大学
部局名：学術研究院医学系皮膚科
職名：教授
研究者番号（8桁）：80292332

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。