

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04329

研究課題名(和文)腎細胞癌患者の組織・血液を用いた包括的病態解明による新規統合的治療戦略の創生

研究課題名(英文)Establishment of treatment strategy for renal cancer with comprehensive approach

研究代表者

植村 元秀 (Uemura, Motohide)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：40631015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌組織特異的に分泌されるエクソソームタンパクおよび癌の変異のみならず、血液中バイオマーカーとしてctDNA、エクソソームにおける発現のプロファイルにつき包括的に解析を進めてきた。現在は血清のエクソソームの解析途中であり、血液バイオマーカーとしての妥当性を検討する。一方、cfDNAががん患者において短小断片化していることを見出した。現在はそのメカニズムの解明につき研究も進めている。cfDNAのターゲットシーケンスによる次世代シーケンサーを用いた解析を行った。現時点では同定した変異につき、デジタルPCRを用いた検証を終え、その定量値を用いて病勢のモニタリングが可能であることを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において同定し得た候補標的に対して、独自に開発した患者由来腫瘍を用いた動物実験および細胞実験による検証を行い、コンパニオン診断を実現可能にするための、動物モデルを構築する計画をしている。さらに血液バイオマーカーおよび新規治療標的治療法を開発し臨床応用することを目指しており、個別化医療の実現により社会的に還元できるように期待している。

研究成果の概要(英文)：We have comprehensively analyzed not only the exosome protein secreted from kidney cancer tissue and mutation of cancer, but also the expression profile of ctDNA and exosome as biomarkers in blood. Currently, we are in the process of analyzing serum exosomes, and we will examine its validity as a blood biomarker. On the other hand, we have found that cfDNA is fragmented into small fragments in cancer patients. Next, our research is being conducted to elucidate its mechanism. With respect to the mutations, verification using digital PCR was completed, and it was confirmed that the disease state could be monitored using the quantitative value.

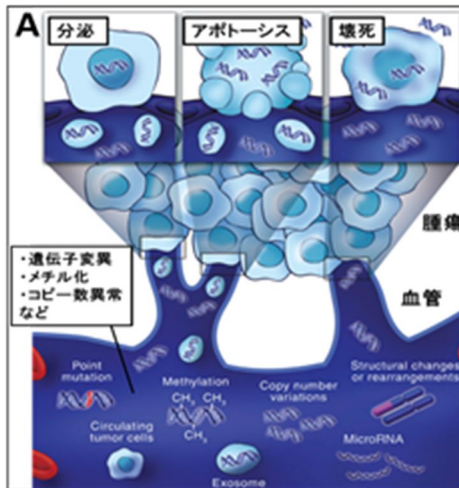
研究分野：腎がん

キーワード：腎がん エクソソーム cfDNA 次世代シーケンサー

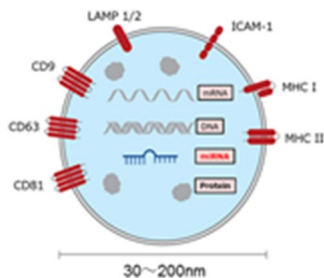
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに腎細胞癌組織を用いてタンパク、miRNA、mRNAなどを網羅的な手法を用いてプロファイルを作成し、特異的に高発現する分子の探索を行ない、いくつも同定してきた。しかし高発現する分子が必ずしも血液中に豊富に分泌されるわけではなく、血液バイオマーカーおよび治療標的としての臨床応用に至っていない。また多くの癌種で heterogeneity の存在が報告されており、腎細胞癌はその典型であるため、原発巣や生検で採取した組織のみから癌の全体像を把握することはできない。治療経過のモニタリングのために繰り返し組織採取を行うことは患者への侵襲が比較的大きく困難でもある。近年、これらの問題を解決する手法として、腫瘍組織ではなく体液を採取することで低侵襲的にバイオマーカーを測定し診断を行うリキッドバイオプシーが注目されている。血中遊離DNA (cell free DNA; 以下 cfDNA) の1つである循環腫瘍DNA (circulating tumor DNA; 以下 ctDNA) や循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) がリキッドバイオプシーの解析対象として有力であり、血清中のエクソソームも注目されている。これら血液中の分子は全身に存在する癌に由来するため、癌の全体像を反映し、heterogeneity の問題を克服し得ると考えられている。また、血液は繰り返し採取することも容易であり治療経過のモニタリングに最適である。われわれは早くから特に ctDNA およびエクソソームに着目し研究を続けてきた。ctDNA は腫瘍細胞の壊死、アポトーシス、分泌によって産生され、遺伝子変異、メチル化、コピー数異常などを伴う(図 A) (cfDNA の抽出には成功し、腎細胞癌の病期の進行に伴い、cfDNA コピー量が増加することを証明した。また癌細胞は自らのタンパク質および miRNA などをエクソソームと呼ばれる細胞外小胞体に封入して周囲および血液、尿中に分泌し(図 BC)、周囲の細胞をより浸潤、増殖しやすい環境に変化させたり(B)、血管などを通して転移先に到達し転移、進展しやすい環境へと変化させる(C)ことによって癌の微小環境を制御していることが明らかになっている。これらのがん細胞から放出され体内を循環する分子に着目することで、モニタリングが可能であり、その情報に基づいた新規治療法を開発することができれば、コンパニオン診断としての臨床応用が期待され、現在の新規治療薬開発、承認の流れに沿った極めて先進的かつ革新的であると考えた本研究を開始するに至った。



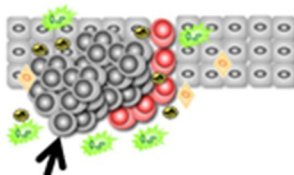
図A ctDNAの産生と遺伝子異常
ctDNAは腫瘍細胞の壊死、アポトーシス、分泌によって血中に産生され、遺伝子の変異・メチル化、コピー数異常などを伴う。



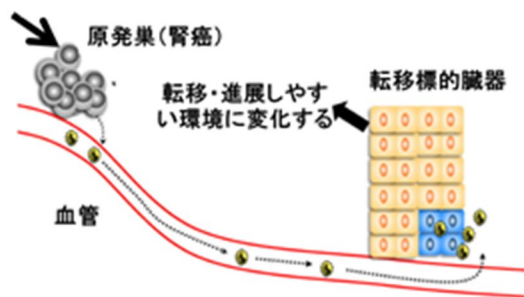
エクソソームは内部にタンパク質や miRNA などを含み、膜によって分解から免れている

腫瘍 DNA (circulating tumor DNA; 以下 ctDNA) や循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell; CTC) がリキッドバイオプシーの解析対象として有力であり、血清中のエクソソームも注目されている。これら血液中の分子は全身に存在する癌に由来するため、癌の全体像を反映し、heterogeneity の問題を克服し得ると考えられている。また、血液は繰り返し採取することも容易であり治療経過のモニタリングに最適である。われわれは早くから特に ctDNA およびエクソソームに着目し研究を続けてきた。ctDNA は腫瘍細胞の壊死、アポトーシス、分泌によって産生され、遺伝子変異、メチル化、コピー数異常などを伴う(図 A) (cfDNA の抽出には成功し、腎細胞癌の病期の進行に伴い、cfDNA コピー量が増加することを証明した。また癌細胞は自らのタンパク質および miRNA などをエクソソームと呼ばれる細胞外小胞体に封入して周囲および血液、尿中に分泌し(図 BC)、周囲の細胞をより浸潤、増殖しやすい環境に変化させたり(B)、血管などを通して転移先に到達し転移、進展しやすい環境へと変化させる(C)ことによって癌の微小環境を制御していることが明らかになっている。これらのがん細胞から放出され体内を循環する分子に着目することで、モニタリングが可能であり、その情報に基づいた新規治療法を開発することができれば、コンパニオン診断としての臨床応用が期待され、現在の新規治療薬開発、承認の流れに沿った極めて先進的かつ革新的であると考えた本研究を開始するに至った。

B 癌細胞(↑)はタンパク質、miRNAなどをエクソソームに封入した形で分泌し周囲の細胞をより浸潤、増殖しやすい環境に変化させる。



C 原発巣にある癌細胞(↑)は血液(体液)中にタンパク質、miRNAを含むエクソソームを分泌し、血管などを通して離れた臓器に到達し転移、進展しやすい環境へと変化させる。



2. 研究の目的

予後不良の転移性腎癌の新規治療標的および血液バイオマーカーを同定するため腎癌組織特異的発現および免疫プロファイルのみならず、血液中バイオマーカーとして ctDNA、エクソソーム、免疫担当細胞のプロファイルを包括的に解析するプラットフォームを構築し、コンパニオン診断を実現可能にする血液バイオマーカーおよび新規治療標的治療法を開発し臨床応用することを目的とした。

3. 研究の方法

[1]腎がん組織特異的エクソソームタンパクの同定
われわれの開発した方法「バイオマーカーの探索方法、及び腎がんマーカー(特願 2016-211239)」によって得た癌組織培養由来エクソソームに特異的なタンパク質を液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いて網羅的に比較解析し、候補タンパク質の同定を行う。

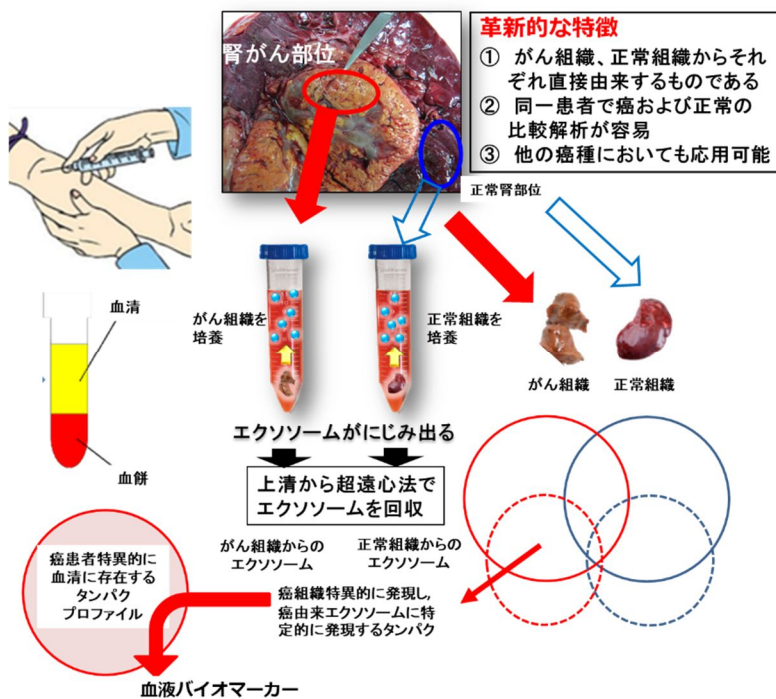
[2]腎がん患者血清エクソソームを用いた標的プロテオミクス解析による定量
 定量化の方法としては SRM/MRM による標的プロテオミクス解析を行う。組織由来エクソソームの抽出方法と同じく、超遠心法を用い患者血清よりエクソソーム分画を分離する。血清の網羅的タンパク解析においては多量の夾雑物としてのアルブミンの含有が問題となるが、これについても除去されていること、また網羅的タンパク解析に適したサンプルが調整されていることはいままでの自身の研究の結果により確認されている。標的タンパク質をトリプシンで分解し、そのペプチド断片の中から標的タンパク質に特異的であり、かつ強いシグナルを与えるペプチドを定量対象ペプチドとする。非標識ペプチド及び内部標準としての安定同位体標識ペプチドを化学合成によって作製し、検出条件を最適化した後に定量のための検量線を作成する。この方法では抗体を用いる必要がないため、どのような候補タンパクでも定量が可能となる。

[3]ゲノムワイドエクソソーム解析による腎がん組織遺伝子変異の同定
 当院にて手術を施行し新鮮凍結保存された腎細胞癌組織より QIAamp DNA mini kit を用いて DNA を抽出し、同患者血液の白血球より採取したゲノム DNA を、次世代シーケンサーにて比較解析を行い、患者固有の腎細胞癌特異的遺伝子変異を同定する。

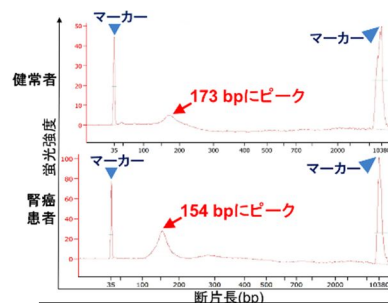
[4]腎がん患者 cfDNA を用いた標的シーケンスによる ctDNA の同定
 腎がん患者血漿から DNA QIAamp circulating nucleic acid kit を用いて cfDNA を抽出する。前ページの如く、cfDNA の抽出には成功し、腎細胞癌の病期の進行に伴い、cfDNA コピー量が増加することを証明した（未公表）。微量な cfDNA のうち、腫瘍由来の ctDNA は 1% 以下ともいわれ、ctDNA を直接シーケンスを行うことは容易ではないと予想される。そのため特定の領域を重点的に深くシーケンスする必要がある。[3]において変異の検出を認めた遺伝子の中からターゲット遺伝子の候補を絞る。遺伝子変異パネルは、Agilent 社の SureSelect のカスタムパネルを使用する。これにより標的遺伝子を増幅した上で次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いてアンプリコンシーケンスを行う。本キットは、微量な DNA のシーケンスライブラリー作成に適しており、膵癌の cfDNA のシーケンスに成功した報告もあり、信頼性があるものを用いた。

4. 研究成果

[1][2] 癌組織、正常腎組織、癌組織からの培養エクソソーム、正常腎組織からの培養エクソソーム、術前に採取した血清エクソソームをセットとして、5 検体セット、18 組につき、網羅的タンパク質解析を行った。これにより、組織を用いた比較解析を終了し、もっともらしい血液バイオマーカーの候補タンパクを絞ることができた（未公表）。現在は血清のエクソソームの解析を進めている。さらにその妥当性を検討するために、保管してあるまたは継続して収集している腎がん患者血清を用いた検証を予定しており、そのバンキングも順調に進んでいる。



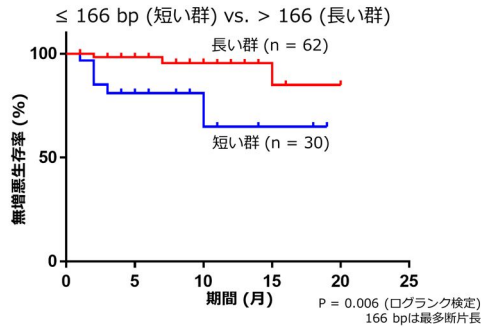
[3][4] cfDNA は分解されやすいと考えられていたため、採血から血漿の分離までは 2-3 時間以内に終わるよう心掛けた。キットを用いて抽出することのできた 1 ml あたりの cfDNA 量と cfDNA の断片長をマイクロチップ型自動解析電気泳動装置 (Agilent 2100 バイオアナライザ) により厳密に評価した。すると、腎癌患者では健常者よりも cfDNA 量が多く、また平均断片長が短小化しているように思われた (右図)。そこで腎癌患者における cfDNA の DNA 量と断片長の血液バイオマーカーとしての有用性を検証することにした。淡明細胞型腎細胞癌患者 92 例ならびに健常者 41 例から以上のプロトコールに従って、血漿を採取し cfDNA を抽出した。cfDNA 量としては定量的リアルタイム PCR 法にて ACTB の絶対コピー数を測定し、断片長はバイオアナライザにて評価した。絶対コピー数に関しては臨床病期に従って増加し、また小径腎癌患者 (cT1aNOMO) においても健常者よりも多かった



バイオアナライザによる cfDNA 断片長の測定

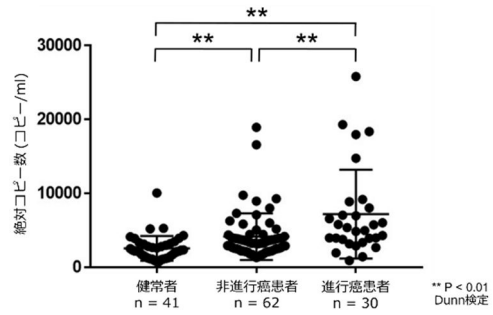
ことが明らかとなった(右図)。

また、cfDNA の断片長については健常者よりも腎癌患者において短い傾向にあることがわかった。高悪性度腎癌患者におけるcfDNA断片長は低悪性度患者のものより有意に短くなっていることも明らかにした。さらにcfDNAの絶対コピー数の腎癌診断予測マーカーとしての有用性を検討した。cfDNAの断片長が短い群では無増悪生存率が有意に不良であることを報告した(下図)。



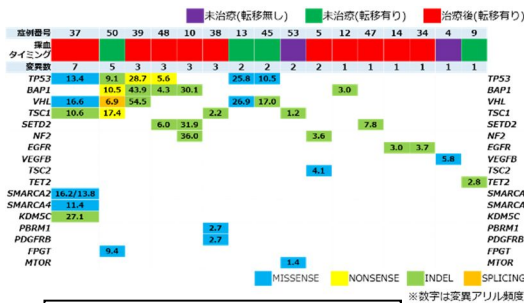
まとめると、腎癌患者において健常者と比較し

cfDNA量は増加し、cfDNAの断片長は短小化し、予後とも関連することが明らかとなった。がん患者におけるcfDNAの断片長の短小化のメカニズムについては、解明を試みたがいまのところ新たな示唆のある結果は得られていない。



cfDNAの絶対コピー数は腎癌患者で多かった

続いて、cfDNA中の腎癌特異的遺伝子変異が血液バイオマーカーとして有用であるかを検討することにした。対象とする遺伝子は公共データベースの変異頻度情報などから選択することにした。公共データベースから、淡明型腎細胞がんccRCCで1%以上の変異が報告されている1316遺伝子を抽出し、最初にその中で2.5%以上の変異が報告されている18遺伝子を選択した。さらにコピー数増幅が報告されている15遺伝子や癌の発生に重要なDriver遺伝子35個を選択し、最終的に48遺伝子を抽出した48遺伝子をターゲットとしたカスタムパネルを作成した。cfDNAや

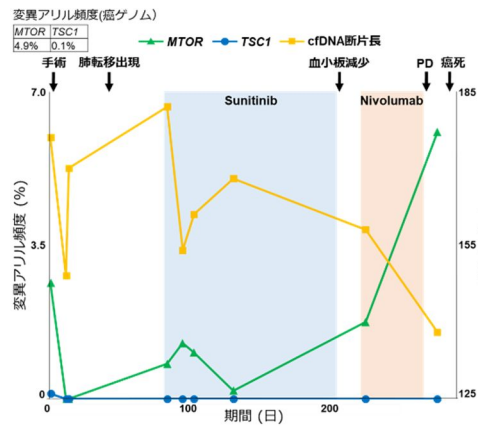


腎癌cfDNAのシーケンス結果 (n = 53)

断片化したゲノムDNAからシーケンスライブラリを作成し、次世代シーケンサーHiSeq2500により、cfDNAは1サンプルあたり約4000万リード、ゲノムDNAは約200万リードのシーケンスを行った。東京大学医科学研究所のスーパーコンピューターにデータを格納し、Genomon2と呼ばれる解析pipelineを用いて変異を検出した。腎癌患者53例におけるcfDNAとゲノムDNAの変異比較解析の結果、16例でcfDNA中に変異を認めた(左図)。変異遺伝子数は1-7個(中央値2個)で、変異遺伝子は多いものから順にTP53が6例、BAP1・VHLが各5

例ずつ、TSC1が4例、SETD2が3例であった。また変異アリル頻度は1.2-54.5%(中央値10.0%)であった。

さらに次世代シーケンスで同定したこれらの変異が真のものであり、また簡便に定量化することでモニタリングを可能にするため、デジタルPCRによって評価した。8症例12変異について評価を行ったところ、変異アリル頻度は0.1-19.1%であり、評価した12変異全てをcfDNA中に検出し、シーケンス解析が正しかったことを確認した。



ctDNAの変化と臨床経過の関係(症例53)

一部の症例においては腎癌組織ゲノムも合わせて変異を評価したが、その一例を左図に示す。本例では手術前のcfDNA中にMTORとTSC1変異を認め、緑色のMTORの変異アリル頻度は概ね臨床経過と同様の変化を示した。一方、青色のTSC1の変異アリル頻度は、手術前にのみ認め、術後は一度も検出できず、cfDNA中の変異にも、heterogeneityが存在することが示唆された。黄色のcfDNA断片長は、病勢が増悪にするにつれて、短くなっていると考えられた。

本研究によって、腎癌のctDNAの変異アリル頻度は臨床経過を反映して変化し、デジタルPCRを用いたctDNAの変異の定量モニタリングの可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamamoto Yoshiyuki, Uemura Motohide, et al.	4. 巻 110
2. 論文標題 Clinical significance of the mutational landscape and fragmentation of circulating tumor DNA in renal cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 617 ~ 628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jingushi Kentaro, Uemura Motohide, Nakano Kosuke, Hayashi Yujiro, Wang Cong, Ishizuya Yu, Yamamoto Yoshiyuki, Hayashi Takuji, Kinouchi Toshiro, Matsuzaki Kyosuke, Kato Taigo, Kawashima Atsunari, Ujike Takeshi, Nagahara Akira, Fujita Kazutoshi, Ueda Koji, Tsujikawa Kazutake, Nonomura Norio	4. 巻 41
2. 論文標題 Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor1 promotes tumorigenesis in RCC	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1293-1303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Yoshiyuki, Uemura Motohide, Nakano Kosuke, Hayashi Yujiro, Wang Cong, Ishizuya Yu, Kinouchi Toshiro, Hayashi Takuji, Matsuzaki Kyosuke, Jingushi Kentaro, Kato Taigo, Kawashima Atsunari, Ujike Takeshi, Nagahara Akira, Fujita Kazutoshi, Imamura Ryoichi, Nonomura Norio	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 20467 ~ 20475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24943	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jingushi Kentaro, Uemura Motohide, Ohnishi Naomi, Nakata Wataru, Fujita Kazutoshi, Naito Takuya, Fujii Risa, Saichi Naomi, Nonomura Norio, Tsujikawa Kazutake, Ueda Koji	4. 巻 142
2. 論文標題 Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 607 ~ 617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Motohide Uemura, et.al.
2. 発表標題 Clinical utility of the mutational landscape and fragment size of circulating-tumor DNA in renal cell carcinoma
3. 学会等名 第34回 ヨーロッパ泌尿器科学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	辻川 和丈 (Tsujikawa Kazutake) (10207376)	大阪大学・薬学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	植田 幸嗣 (Ueda Koji) (10509110)	公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・プロジェクトリーダー (72602)	
研究分担者	中川 英刀 (Nakagawa Hidewaki) (50361621)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー (82401)	
研究分担者	朝長 毅 (Tomonaga Takeshi) (80227644)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・上級研究員 (84420)	