

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15612

研究課題名(和文)末梢血を用いた腫瘍由来の染色体不安定性の検出:新たなバイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of a novel biomarker using peripheral blood for detection of tumor derived chromosome instability

研究代表者

清水 華子(Shimizu, Hanako)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号:20551203

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):染色体不安定性を持つ腫瘍細胞に由来するDNAが末梢血に放出され、末梢血cell-free DNA中に異常なコピー数CNV(copy number variations)があると報告されている。末梢血 cell-free DNAを解析し担癌状態の染色体レベルのDNA量の変化を検討する。同意を得た婦人科悪性腫瘍に罹患した患者で術前の血清より末梢血cell-free DNA中のCNVを解析する。64例中4例に全ての、19例で部分的に染色体にCNVを検出した。悪性腫瘍を有する患者のcell-free DNAを解析することにより悪性腫瘍を検出することにつながると考えられた。

研究成果の概要(英文):DNA derived from tumor cells with chromosomal instability is released into the peripheral blood. It is reported that abnormal copy number variations (CNV) is present in peripheral blood cell-free DNA. Peripheral blood cell-free DNA is analyzed to investigate the CNV at the chromosomal level in the cancer-bearing state. Cell free DNA was extracted from the plasma of patients with preoperative gynecological malignancies after informed consent. We analyzed CNV in peripheral blood cell-free DNA. The samples were obtained from 64 patients. CNV in all chromosomes were detected in 4cases. CNV in partial chromosomes were detected in 19 patients. It was thought that malignant tumor could be detected by analyzing cell - free DNA of patients with malignant tumor.

研究分野:婦人科腫瘍

キーワード:cell free DNA MPS法 婦人科悪性腫瘍 CNV 染色体不安定性 腫瘍マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

1977年、ヒト癌患者血清中に cfDNA が高濃度に存在することが報告され(Leon SA et al, *Cancer Research*. 1977)、患者血漿中の cfDNA の一部が、固形癌由来であることが報告された(Stroun Met al, *E J Can Clin Oncol*. 1987)。このことにヒントを得て、母体血漿中に胎児由来の cfDNA が循環しているとの着想にいたり、1997年、母体血漿・血清中から cfDNA を抽出し、Y染色体特異的な DNA である DYS14 遺伝子を標的にそれを PCR 増幅することで、母体血漿・血清中に胎児由来 DNA が存在することが証明された(Lo YM et al, *Lancet*. 1997)。そして分子生物学的な分析技術の急速な進歩があり、次世代シーケンサーが開発されたことがこの分野での研究の大きな転換点となり、2008年、次世代シーケンサーを用いて母体血漿中 cfDNA から染色体疾患を検出する新しい検査法が開発された(Chiu RW et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008)。この方法は、Massively parallel sequencing (MPS) 法といい、cfDNA 断片を網羅的にシーケンシングし、個々の断片の由来をヒトゲノム情報と照合して確認し、各染色体由来の断片の量的な変化を評価することで染色体の数的異常を診断するものである。我が国では NIPT コンソーシアムを組織して臨床研究を行っている。その中で、1年半経過した時点で、13,000件程度の検査が実施され、驚くべきことに **3例において児由来であって児が生存しているとは考えられない多発的な染色体の数的異常が検出され、結果的にその由来が母体の腫瘍に由来しており、妊婦の担癌状態を検出した症例が確認された。**この事実は、次世代シーケンサーを用いることで、**ヒト末梢血中の cell-free DNA を解析することで、もしその患者が悪性腫瘍を持っている場合、その中に微量に混ざる腫瘍に由来する DNA 量の変化を検出できる可能性を示唆している。**多くの癌細胞において染色体分配における

異常は共通にみられる性質のひとつであり、**“染色体不安定性”**とよばれる。この染色体不安定性を示す細胞は**染色体の数的異常 “異数性”を持つ**ことになるが、染色体数が増加したり減少したりする。異数性を持つ細胞は、癌遺伝子のコピー数の増加や癌抑制遺伝子のコピー数の減少を介し、細胞の癌化に関与すると考えられる。このような染色体不安定性の増大の結果として起こった細胞レベルでの染色体の数的異常を持つ細胞の存在を、末梢血中の DNA 解析で検出することで、腫瘍検出のバイオマーカーになるかを検討する。

## 2. 研究の目的

ヒト血液中に浮遊する cell-free DNA を次世代シーケンサー (MPS法) で解析することで、**ヒト末梢血中で腫瘍細胞の染色体不安定性に基づく染色体の数的異常を検出することで、無侵襲的に腫瘍の存在をスクリーニングできるバイオマーカーの確立**を目的に検討を行う。今回の検討では婦人科悪性腫瘍を標的に検討を行うが、**全ての悪性腫瘍の検出につながる無侵襲的なバイオマーカー**になる可能性を持っており、がん検診におけるファーストラインのスクリーニング検査としての臨床応用を目指している。多くの固形腫瘍細胞で染色体数や広範囲な染色体構造異常を認めるが、これは染色体不安定性の結果である。この染色体不安定性は細胞分裂時における姉妹染色体の均等分配を保障するメカニズムの破綻によると考えられており、発癌の原因としても重要であるとされている。我々はこれまでに腫瘍細胞の崩壊に由来し、腫瘍細胞に由来する p53 など DNA 変異を患者末梢血中に同定可能なことを報告してきた (Detection of p53 mutations in the plasma DNA of patients with ovarian cancer. Otsuka, J., Sekizawa, A., et al. *Int J Gynecol Cancer* 14 (3), 459-64, 2004)。同様に、悪性腫瘍に由来する

染色体の不安定性に基づく変化が、患者の末梢血中でも検出できる可能性がある。そこで、手術を行う婦人科腫瘍の患者から採血し、その血漿成分から cell-free DNA を抽出して、次世代シーケンサーを用いて MPS 法で解析することで、全染色体領域にわたる DNA 断片量の変化を評価可能なことを利用し、悪性腫瘍における染色体不安定性を無侵襲的に末梢血を用いて検出する方法の確立を目指す。また、この検出は、新たな腫瘍マーカーとしての可能性も有している。

### 3. 研究の方法

染色体不安定性を持つ腫瘍細胞に由来する DNA が細胞崩壊に伴い末梢血中に放出される。末梢血 cell-free DNA を網羅的に次世代シーケンサーで解析する (MPS 法) ことで、担癌状態の患者の染色体レベルでの DNA 量の変化を捉えることが可能かを検討する。婦人科腫瘍で、悪性を疑う患者を対象に、術前に採血し、それを MPS 法で解析する。その結果と、病理所見 (良性、境界悪性、悪性、病期分類) を合わせ、本法がファーストラインの腫瘍スクリーニングマーカーとして利用できるかについて検証する。手術時に腫瘍細胞を採取し、腫瘍から抽出した DNA 上の検討で、染色体不安定性を持つ腫瘍細胞が存在するかも、同様な MPS 法を用いた手法で確認し、どのような症例で染色体不安定性を持つ腫瘍細胞が存在するかを明らかにすることで、腫瘍マーカーとしての応用の可能性も解明する。

### 4. 研究成果

同意を得た婦人科悪性腫瘍に罹患した患者の血清より、出生前検査で使用されている方法を用いて、末梢血 cell-free DNA 中の CNV (copy number variations) を検出する。現在までに 64 名の患者から血清を得た (卵巣癌: 37 例、子宮体癌: 23 例、子宮頸癌: 4 例)、64 例中 4 例に全ての染色体において CNV

を検出することができた (卵巣癌 stage : 2 例、子宮体癌 stage : 1 例、子宮頸癌 stage : 1 例)。64 例中 19 例で部分的に染色体で CNV を検出することができた (卵巣癌: 10 例、子宮体癌: 9 例、子宮頸癌: 0 例)。

婦人科悪性腫瘍患者において cell-free DNA 中の CNV を検出できることが明らかになった。悪性腫瘍を有する患者の cell-free DNA を解析することにより悪性腫瘍を検出することにつながると考えられた。しかしながら、現時点で感度は未だ低く、今後症例の集積及び解析を追加し検討する必要がある。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

公益社団法人日本産科婦人科学会

第 69 回学術講演会

2017 年 4 月 13 日 ~ 16 日

広島

Makoto Nakabayashi,

Akihito Kawashima,

Akihiko Sekizawa

Development of a novel biomarker for neoplasms through analysis of copy number variations in cell free DNA of the blood of patients.

[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

清水 華子 (SHIMIZU, Hanako)  
昭和大学・医学部・助教  
研究者番号：20551203

### (2) 研究分担者

関沢 明彦 (SEKIZAWA, Akihiko)  
昭和大学・医学部・教授  
研究者番号：10245839

### (3) 連携研究者

川嶋 章弘 (KAWASHIMA, Akihiro)  
昭和大学・医学部・助教  
研究者番号：10783376

### (4) 研究協力者

中林 誠 (NAKABAYASHI, Makoto)  
昭和大学・医学部・助教