

令和元年5月30日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07157

研究課題名(和文) DNA分子高精度配列決定及び絶対定量技術による血中遊離DNA解析システムの開発

研究課題名(英文) Development of a cell-free DNA analysis system using a technology for high-fidelity sequencing and absolute quantitation of DNA molecules

研究代表者

久木田 洋児 (KUKITA, Yoji)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・特任准教授

研究者番号：60372744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：高精度塩基配列決定技術NOIR-SeqS法の改良と、8～9癌関連遺伝子の突然変異ホットスポット領域を標的とした解析パネルの設計を行い、膵癌及び肺癌患者の血中循環腫瘍DNAを解析するシステムを開発した。さらに、検出した変異の中から癌に特異的ではないものを除去する情報学的変異除去フィルターを考案した。これらの臨床的有用性は膵癌患者143人の血液検体を解析して確認した。また、一部の肺癌患者に見られるALK融合遺伝子変異の検出に特化した解析方法も開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中遊離DNAは微量かつ生体試料として低品質であるため、信頼できる解析結果を得るのは技術的に困難であった。本研究で開発された解析技術により、癌患者血液検体から癌細胞由来の遺伝子変異を高精度に検出することが可能となった。本法を用いた膵癌患者血液検体の解析から、血中循環腫瘍DNAの検出は治療中の病態把握や効果判定などに有用であることが示唆された。このことは膵癌などの難治癌患者が置かれている状況を確実に改善していくものである。

研究成果の概要(英文)：To develop a system to analyze circulating tumor DNA from blood of pancreatic cancer and lung cancer patients, we improved the high-fidelity sequencing technology, NOIR-SeqS, and designed two gene panels targeting mutation hotspots of 8 to 9 cancer-related genes. Furthermore, we devised a bioinformatic variant filter to remove non-cancer specific mutations among the detected ones. The clinical usefulness of our analysis system was confirmed by analyzing blood samples from 143 pancreatic cancer patients. We also developed an analysis method specialized for the detecting ALK fusion gene mutations found in some lung cancer patients.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：血中遊離DNA 血中循環腫瘍DNA ALK融合遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

癌患者に対して様々な癌分子標的薬を効果的に使用するために、癌組織の遺伝子診断が必須になりつつあった。通常、遺伝子診断には生検や手術で摘出された生体組織が用いられているが、侵襲性の高い針生検などは合併症のリスクを伴う。血液中には細胞崩壊時に放出された遊離 DNA (cell-free DNA / cfDNA) が存在し、癌患者では癌細胞由来の DNA (circulating tumor DNA / ctDNA) も微量に含まれる。それで採血した血液中から体細胞突然変異を指標にして ctDNA を検出すれば、原発巣だけでなく遠隔転移など、全身の体細胞遺伝子異常情報を把握することができる。また、採血は低侵襲性なので複数回の検査による腫瘍負荷や治療経過の詳細なモニタリングも可能である。確定診断が行われるためには癌組織自体の検査が必要であるが、それと併用することで患者と医療提供者の双方に大きなメリットを与え、国内外の機関が最新機器・手法 (次世代シーケンサーや droplet digital PCR) を用いてリキッドバイオ分野に参入しつつあった。しかし、cfDNA は高度に断片化されており (200 bp 以下)、平均して血液 1 mL 中 10 ng (ヒトゲノムのコピー数換算で約 3000 コピー) しか含まれていない。生検や手術検体から DNA を抽出して解析する場合と比べ、使用 DNA の量、質に問題があり、標準となる解析技術・方法が無かった。品質に制限がある DNA 試料を扱うには、核酸に関する高度な知識とそれを扱った豊富な経験、そして問題点への意識が必要であるが、当時の国内外の研究報告を見る限り、試料の問題点を意識して取り組んでいるグループはわずかであり、国内では当グループに限られていた。

我々は、肺癌患者の治療法の決定のために、次世代シーケンサーを使った deep sequencing 法による cfDNA 中の微量 EGFR 遺伝子変異を検出するシステムを開発し、その性能と有用性を後ろ向き及び前向き試験により確認してきた。その一方、次世代シーケンサーの解析では高い読み取りエラー率による偽陽性が微量変異検出の障害になり、解析遺伝子領域を拡張しづらいという問題点があった。それで次世代シーケンシングとバーコード技術を組み合わせ、標的 DNA 配列を高精度に決定する方法を開発した。この方法では最初に標的領域近傍を制限酵素で切断した DNA 断片分子にバーコード配列 (N_{12}) を付加する。12 mer の配列なら理論上 1 千万種類のバーコード配列が存在するので、数千分子の DNA 断片を一分子ずつ識別して標識することが出来る。その後、PCR / シーケンシングにより得られたリード (配列データ) をバーコード配列情報に基づきグループ化し、コンセンサス配列を作る。それにより実験中に挿入されたエラーが除かれるので、標的配列を高精度に決定することが出来る。さらにこの方法では実験中に挿入されたエラーを含んだバーコード配列を除去する。最終的に検出されたバーコード配列の種類を数えることにより、解析に使われた DNA 分子の絶対定量ができる。我々はこの方法を Non-Overlapping Integrated Reads Sequencing System (NOIR-SeqS) と名付けた。

上記背景をもとに本研究では NOIR-SeqS に改良を加え、様々な遺伝子異常を持つ癌症例の ctDNA 解析に対応するために多種類の癌遺伝子領域を同時に解析するシステムの開発を目指した。血液中に含まれる微量な DNA を扱って実験を進めるので、PCR 及びシーケンス反応産物による検体 DNA 及び途中産物の汚染を防止する対策は必須である。本研究を基に将来的には、実験操作部分を閉鎖系状態で自動的に行う機器の作成を予定していたので、実験作業の簡略化にも重点を置くようにした。また、癌患者の血液検体を使い、本研究で開発するシステムの臨床的有用性を検証することも計画した。

2. 研究の目的

癌患者の血液中に含まれている cfDNA から癌細胞由来の ctDNA を検出すれば、侵襲性の高い針生検における合併症のリスクを回避して、腫瘍における異常遺伝子の種類を知ることができ、また治療中に ctDNA 量を測定すれば、治療効果をモニタリングすることも可能である。しかし cfDNA は微量かつ断片化しており、解析時に技術的な困難を伴うので、信頼性の高い結果を産出する解析システムの開発が必須であった。そこで本研究では、多種類の標的癌遺伝子領域に対して、ctDNA の絶対分子数を測定し、その 1 分子ずつの塩基配列を高精度に決定するシステム (改良型 NOIR-SeqS) を開発することと、癌患者由来の血液検体を解析し、癌の診断や治療効果判定において本研究で開発するシステムが臨床的に有用であるかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 改良型 NOIR-SeqS の開発

多遺伝子領域を標的対象とした改良型 NOIR-SeqS の開発

標的領域の選択には英国サンガー研究所が公開している体細胞変異データベース COSMIC の情報や他グループの癌遺伝子ホットスポット解析パネルの情報を利用した。市販のヒトゲノム DNA を NEB 社の Fragmentase (DNA 切断酵素混合試薬) で断片化後、磁気ビーズによる DNA サイズ選別により、疑似 cfDNA を調整し、改良型 NOIR-SeqS の開発実験に用いた。本研究以前の NOIR-SeqS では標的領域近傍の制限酵素部位で DNA を切断し、12 塩基のバーコード配列 (N_{12}) アダプターを付加していた。cfDNA は既に断片化されているので、本研究では標的選択の自由度を上げるために cfDNA の末端平滑化及び 5' リン酸化処理後、バーコード付きアダプターを付加した。その後、標的的特異的プライマーとアダプター内のユニバーサルプライマーで対象領域を増幅した。精製した増幅産物を使ってシーケンシングライブラリーを調整した後、Ion

Torrent シーケンシングシステム (PGM, Proton) にてシーケンシングを行い、DNA 配列データを取得した。バーコード配列情報に基づいてシーケンス読み取りエラーの処理、解析 DNA 分子数の測定を行った。

ALK 融合遺伝子変異検出システムの開発

ALK 融合遺伝子変異を含む DNA 断片を増幅するために、ALK 遺伝子イントロン 19 上にアンチセンスプライマーを約 50 塩基間隔で設計した。システム開発実験用に市販の健常者由来ゲノム DNA と人工的に ALK 融合変異を組み込んだ細胞株由来 DNA (Horizon 社) を断片化、混合し、疑似 cfDNA を調整した。シーケンシングライブラリーの調整はと同様に行ったが、高精度に塩基配列の決定を行う必要が無いので、解析時にはバーコード情報を使わなかった。ALK 融合変異相手側遺伝子として COSMIC に登録されている 21 遺伝子を検索対象とした。

(2) 改良型 NOIR-SeqS による膵癌患者検体の解析

健常者の血液検体、膵癌患者の血液検体及び生検癌組織検体は、大阪府立成人病センター(現大阪国際がんセンター) 医師共同研究者により、生体試料の研究利用に関する承諾を得て収集された。血液は収集後数時間以内に血漿と血球の分離を行い、血漿部分を凍結保存した。キアゲン社 Circulating Nucleic Acid Kit を使って、血漿から cfDNA を抽出した。生検癌組織の DNA はキアゲン社 QIAamp DNA Mini Kit を使って抽出した。(1)で開発した改良型 NOIR-SeqS で抽出した DNA を解析し、変異検出を行った。

4. 研究成果

(1) 改良型 NOIR-SeqS の開発

NOIR-SeqS の原法では、標的配列近傍の制限酵素切断部位に分子バーコードを持つアダプターを付加していたが、改良法では断片化している cfDNA の末端を処理し、それにアダプターを付加するようにした。この改良により、全ゲノム領域由来の cfDNA 断片に分子バーコードを付加することができるため、癌患者検体に対して多標的領域の同時解析が可能になる。本研究では膵癌と肺癌の患者検体を解析対象として想定していたので、膵癌解析用に 8、肺癌解析用に 9 癌関連遺伝子の突然変異ホットスポット領域を標的とした遺伝子パネルを設計した。血液 1 mL 相当の cfDNA を使い、1 反応あたり 20~26 ヶ所のマルチプレックス増幅反応を行うようにした。1 癌患者検体について 2 反応行い、血液 2mL 相当の cfDNA から 2.5 kb~2.8 kb の領域を測定する方法を確立した(図 1)。改良法による検出変異アレルの定量性は、100 人の健常者 DNA の等量混合液を解析した SNP アレル頻度測定により確認した。

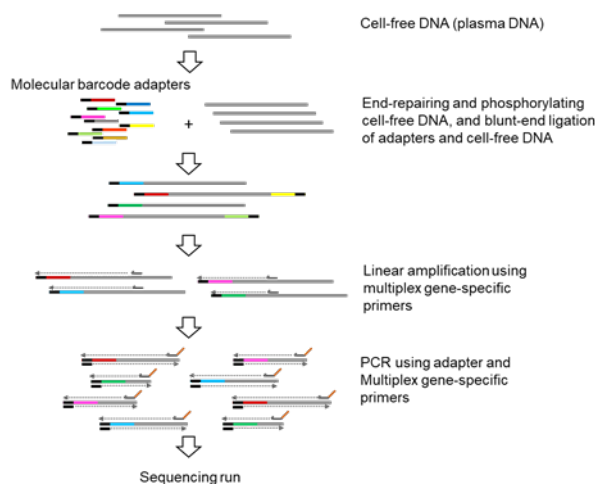


図1 改良型NOIR-SeqSのシーケンスライブラリー調整

(2) 改良型 NOIR-SeqS による膵癌患者検体の解析

改良型 NOIR-SeqS の臨床検体における性能評価を行うため、膵癌検体解析用に設計した遺伝子パネルを用いて、膵癌患者/健常者集団(第 1 コホート: 膵癌 57 人、健常 12 人) から抽出した cfDNA を解析した。その結果、膵癌患者 31 人 (54%)、健常者 5 人 (42%) から変異を検出した(変異アレル頻度 0.3 - 55.1%)。本研究遂行中、試料の保存中に生じた DNA 損傷に由来する塩基変化や正常細胞中に生じた癌に関与しない体細胞変異、即ち、癌とは無関係な変異の存在が指摘されはじめており、健常者で見つかった変異はそれらに該当すると考えられた。癌に関与しない変異は癌患者検体の変異検出解析の障害になるので除く必要があり、それを可能にする情報学的な変異除去フィルターの開発に取り組んだ。第 1 コホートの結果を学習データとして扱い、癌体細胞変異を網羅している COSMIC データベースから独自に設定した基準に従って癌特異的変異を選択し、癌に特異的ではない変異を除く CV78 フィルターを考案した(図 2)。CV78 フィルターを使って再解析すると、変異が検出された人数は、膵癌患者 19 人 (33%)、健常者 0 人となり、癌と関係のない変異を除くことが出来た。検出された変異のアレル頻度範囲に変化は無かった。この結果を検証するために、前出集団とは別の第 2 コホート(膵癌患者 86 人と良性の膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 患者 20 人) を解析した。改良型 NOIR-SeqS 単独解析では、膵癌患者 62 人 (72%)、IPMN 患者 10 人 (50%) で

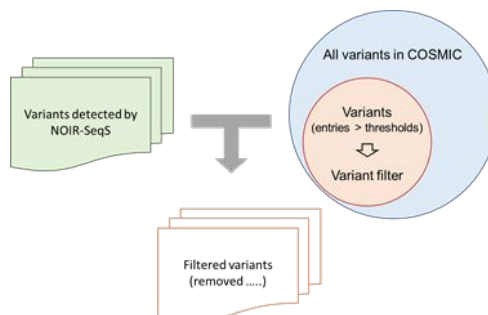


図2 COSMICを利用した情報学的変異除去フィルター

変異が検出されたが、CV78 フィルターを用いると、32 人 (37%)、1 人 (5%) になった。CV78 フィルター後の変異検出率は独立した上記の 2 集団で同様になった (変異アレル頻度 0.3 - 76.1%, 図 3)。また、膵癌患者血液からの KRAS 変異検出率 (37/143, 25.9%) は別方法を用いた他グループからの報告と同等であったことから、今回開発した改良型 NOIR-SeqS と CV78 フィルターを組み合わせた変異検出システムが臨床検体の解析に有用であることを確認することが出来た。これらの結果は学術雑誌 PLoS One に発表している。最近、Stetson (2019)らは癌患者の cfDNA 解析で検出される変異のうち、COSMIC などの公共体細胞変異データベースに載っていないもののほとんど (95-100%) が偽陽性であったことを報告している [1]。この結果は、cfDNA 解析において CV78 フィルターの使用の重要性を示唆しているものである。今回の変異検出解析を受けた患者については、臨床情報を取り入れた解析も行われており、ctDNA 検出と治療後の患者容態に相関が見られている。この結果については医師共同研究者から論文発表される予定である。

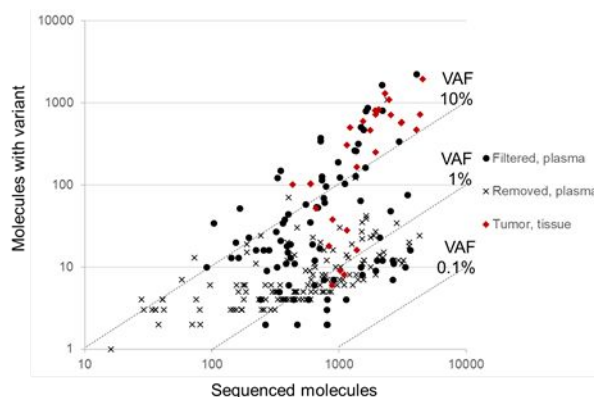


図3 シーケンスしたDNA分子数と検出した変異DNA分子数

(3) ALK 融合遺伝子変異検出システムの開発

ALK 融合遺伝子変異は非小細胞肺癌患者の 3-7%に見られ、その変異の有無は治療選択のバイオマーカーになっている。ALK 融合遺伝子変異では、ALK イントロン 19 内と複数種類の融合相手側遺伝子領域との間でゲノム再構成が生じている。その変異部位は患者ごとに違っているので、イントロン 19 全域 (2kb) を検査する必要がある。改良型 NOIR-SeqS に変更を加え、アダプターと ALK イントロン 19 全域をカバーする一方向のプライマーセットを使用する、ターゲットシーケンシングシステムを構築した。このシステムでは、融合相手側遺伝子の種類に関係なく、融合点を含む DNA 断片を増幅することができる。データ解析パイプラインでは、ALK イントロン 19 と検索対象として設定した 21 遺伝子へシーケンシングデータをアラインメントさせることにより融合点を検出し、その融合点を含む配列とシーケンシングデータを再びアラインメントさせることにより融合変異アレルを定量する。市販のゲノム DNA から調整した疑似 cfDNA を使った定量性実験では、予想値と計測値が非常に良く相関した ($R^2=0.97$)。次に臨床的有用性を確認するために、生検検査で ALK 融合変異陽性とされた肺癌患者群の 20 血液検体と健常者由来の 10 血液検体を検証試料として解析した。融合変異は 10 患者検体から検出され、健常者検体からは検出されなかった (感度と特異度はそれぞれ 50%と 100%)。血中の cfDNA 濃度が 100 ng/10 mL 以上の検体の全てから変異が検出されていた。このことから血中の cfDNA 濃度と融合変異アレルの血中への漏出に相関があることが示唆された。融合変異が検出された検体については定量 PCR の結果と比較し、十分に相関があったことを確認した ($R^2=0.94$, 図 4) (論文投稿中)

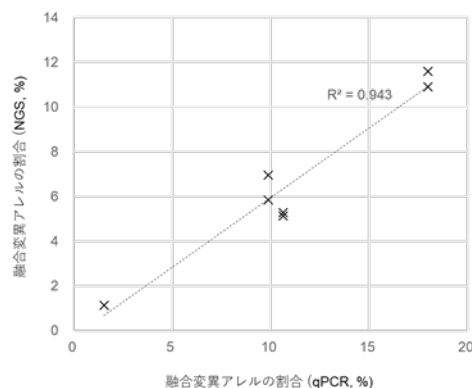


図4 肺癌患者で検出されたALK融合変異アレルの定量

< 引用文献 >

[1] Stetson D et al., JCO Precis Oncol, 2019. doi: 10.1200/P0.18.00408

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

大川和良, 高田良司, 片山和宏, 久木田洋児, 加藤菊也. 膵癌における次世代シーケンサーを用いた血中循環腫瘍 DNA 検出系 - 臨床応用の可能性について (Detection of circulating tumor DNA from pancreatic cancer using next-generation sequencing and possible clinical applications). 膵臓, 2018, 33:937-943, 査読有.

doi: 10.2958/suizo.33.937

Kukita Y, Ohkawa K, Takada R, Uehara H, Katayama K, Kato K. Selective identification of somatic mutations in pancreatic cancer cells through a combination of next-generation sequencing of plasma DNA using molecular barcodes and a bioinformatic variant filter. PLoS One, 2018, 13:e0192611, 査読有.

[学会発表](計4件)

Kukita Y, Takada R, Okawa K, Katayama K, Kato K. Selective detection of somatic mutations in circulating tumor DNA from pancreatic cancer patients by next-generation sequencing and a bioinformatic variant filter. Human Genome Meeting 2018 (第22回国際ヒトゲノム会議), 2018

久木田洋児, 高田良司, 大川和良, 片山和宏, 加藤菊也. Selective detection of somatic mutations in circulating tumor DNA from cancer patients (癌患者由来血漿 DNA 中体細胞変異の選択的検出), 第76回日本癌学会学術総会, 2017

久木田洋児, 内田純二, 高田良司, 今村文生, 片山和宏, 加藤菊也. Non-overlapping integrated reads sequencing system for de novo detection of mutations in circulating tumor DNA (NOIRシーケンスシステムによる癌患者由来血漿 DNA 中の de novo 突然変異検出), 第75回日本癌学会学術総会, 2016

久木田洋児. DNA 分子高精度配列決定及び絶対定量による血中遊離 DNA 中の突然変異検出. NGS 現場の会 血液核酸マーカー分科会 第2回研究会, 2016

[図書](計3件)

久木田洋児. シーエムシー出版, 第1章 分子バーコードの視点から 3 分子バーコード配列タグを使った血中循環腫瘍 DNA 検出法の開発 バイオインフォマティクスに向けて~バイオテクノロジーの新技术からの新しい視点~, 2019年, pp.17-24

久木田洋児. シーエムシー出版, 第 編 血中循環腫瘍 DNA (ctDNA) 第1章 塩基配列決定法 NOIR-SeqS リキッドバイオプシー 体液中腫瘍マーカーの検出・解析技術 (監修: 落谷孝広), 2017年, pp.167-174

久木田洋児, 加藤菊也. 羊土社, 分子バーコード技術を使った低頻度 DNA 断片の配列決定と定量 実験医学, 2016年, pp.2722-2728

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 加藤 菊也

ローマ字氏名: (KATO, kikuya)

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。