

令和 4 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19197

研究課題名(和文) 大腸癌における末梢血中遊離DNAに着目した革新的転移再発診断法の開発

研究課題名(英文) Innovational diagnostic technique of recurrence by using circulating tumor DNA in CRC patients

研究代表者

崎村 正太郎 (Sakimura, Shotaro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60747393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：全エクソームシーケンス、SNP arrayを用いて、原発巣切除後に再発を認めた大腸癌原発巣8ヶ所と転移巣12ヶ所の一塩基置換(SNV)を調べ、両者でclonalityの高いSNVに関して経時的に採取した血漿から採取した末梢血中遊離DNA(ctDNA)を用いてターゲットシーケンスを行なった。その結果、原発巣に認めていた一塩基置換と同一の変異を血漿から検出することが可能であったが、保存していた血漿量が少なかったため検出数は少なく既存の診断方法と比べ優位性を得ることはできなかった。今回の研究により、ctDNAは原発巣切除後の転移再発の診断における有用なツールとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌の切除後は採血での腫瘍マーカーの測定や画像検査により再発の早期発見に努めるが、転移巣のサイズが小さい場合はいずれの検査でも感度が低く、早期発見が困難な場合が多い。本研究では血液中に循環している腫瘍由来のDNAを検出することに成功し、この結果より原発巣切除後の再発診断方法として応用できる可能性が示された。本手法に基づいた検査方法が確立できれば、より低侵襲で感度の高い再発診断検査ツールとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：At first, we identified single nucleotide variants (SNV) in eight primary tumors of early colorectal cancer (CRC) with postoperative relapse and twelve metastatic lesions by using whole exome sequence and SNP array, and main clonal SNVs of both lesions were investigated by targeted deep sequence in circulating tumor DNAs (ctDNA) which were sequentially collected from plasma of CRC patients. As a result, we detected the same SNVs in both primary lesions and ctDNAs, but there was no superiority in ctDNA compared with existing diagnostic techniques because we couldn't collect enough ctDNA. This study suggests the utility of ctDNA in the diagnosis of recurrence after excising primary lesions of CRC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：末梢血中遊離DNA 転移再発 大腸癌 診断法

1. 研究開始当初の背景

固形癌患者の血液中には原発巣癌細胞由来の DNA 断片(circulating tumor DNA: ctDNA)が循環しており診断 マーカーとしての意義が注目されている。このctDNAは、極めて腫瘍特異性が高く、正確な診断・治療方針の決定に今後重要な役割を果たすと考えられる。また、腫瘍1カ所の生検では評価することが困難な腫瘍内の多様性

(intratumor-heterogeneity)を評価することが可能であり、多様性の客観的評価が可能になれば悪性度診断にも応用可能である。

2. 研究の目的

本研究では大腸癌診療上遭遇するいくつかの問題点を掲げ、ctDNAを用いて微量検体から確実な潜在癌細胞の存在診断および悪性度診断を実現することで解決したい。

(1) 大腸癌の外科的切除後の再発診断におけるctDNAの有用性

われわれは大腸癌の外科的切除後に再発した症例の原発巣および経時的に採取した血漿を多数 症例有しており(stageIで再発した 15 例、stageIIで再発した 36 例を含む)、また解析についての倫理上の問題点をクリアしている。再発した大腸癌症例において、原発巣と転移巣の遺伝子 変異を同定し、その変異を経過観察中の血漿中のctDNAで同定することで再発の診断が可能か検証する。

(2) 内視鏡的切除(EMR、ESD)後の外科的追加切除が必要な症例の絞り込み

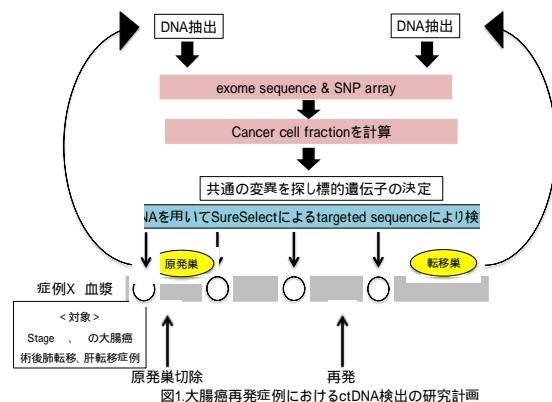
外科的追加切除が必要とされるリンパ節転移が疑われる症例において、ctDNAによる腫瘍細胞の 存在の有無により追加手術の適応を決定することができるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌切除後再発症例における ctDNA の検出

がん研有明病院で採取した Stage 、 の大腸癌再発症例 5 症例ずつにおいて、原発巣お

よび転移巣から採取したゲノム DNA を用いて exome sequence と SNP array を行い、どのような遺伝子変異が腫瘍細胞のどのくらいにあるかを計算し(cancer cell fraction: CCF, 図 3)、原発巣と転移巣に共通する癌細胞のほとんどに存在する遺伝子変異(clonal mutation) 450 個を同定した。この 450 個の遺伝子変異に対して SureSelect (Agilent 社)により遺伝子パネルを作製し、経時的に採取していた保存血漿中から QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen 社)を用いて採取した ctDNA の deep targeted sequence を行い、既存の診断方法よりも ctDNA による再発診断が優れているかを検証する(図 1)。



(2) 内視鏡的切除(EMR、ESD)後の腫瘍細胞の存在診断

大腸癌に対して内視鏡による切除(EMR、ESD)を行い、その後の病理組織診断によって追加切除が必要となった症例を対象とする。外科的切除後の病理組織診断で腫瘍細胞の残存、リンパ節転移を認めた症例と認めなかった症例 5 例ずつに対して、内科的切除前後の保存血漿 2ml から QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen 社)を用いて ctDNA を採取し、targeted sequence を行い変異遺伝子の有無やその変化を比較、解析する。(図 2)

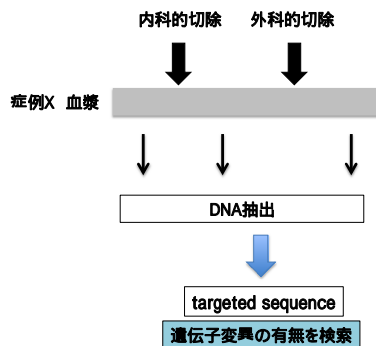


図2. 内視鏡的切除後の腫瘍細胞存在診断の研究計画

4. 研究成果

(1) 大腸癌切除後再発症例における ctDNA の検出

再発をきたした stage I+II の大腸癌 10 症例から採取した血漿サンプル(750 μl 前後)77 検体から、Qiagen 社の QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて ctDNA を採取した。その結果、採取できた ctDNA 量は 3ng 以上の検体が 13 検体、1~3ng の検体が 51 検体、1ng 以下の検体が 13 検体であった(表 1)。

表 1. ctDNA抽出結果

症例	検体数	≥3ng	1~3ng	≤1ng
A	7	2	4	1
B	9	2	7	0
C	8	0	3	5
D	3	0	3	0
E	10	1	9	0
F	4	0	4	0
G	10	4	5	1
H	10	4	6	0
I	13	0	7	6
J	3	0	3	0
合計	77	13	51	13

採取した ctDNA をまず Kapa Biosystems 社の KAPA Library Amplification Kits を用いて DNA の増幅を行い、10 症例において原発巣と転移巣に共通する clonal mutation 450 個の遺伝子候補に対して作製した Agilent 社の SureSelect XT カスタムキャプチャライブラリを用いて targeted sequence を行った。スーパーコンピューターを用いて解析を行ったところ、10 症例中 6 症例において ctDNA から遺伝子変異を検出することが可能であった

(図 2)。

図2. ctDNA 検出数

症例	ctDNA候補数	ctDNA検出数
A	30	26
B	126	0
C	56	0
D	28	0
E	36	7
F	25	1
G	24	0
H	64	64
I	26	24
J	36	13

検出可能であった 6 症例を検討したところ、いずれの症例においても既存の再発診断方法よりも同等、もしくは早期の再発診断の可能性があるが優位性まではわからなかった。

(2) 内視鏡的切除 (EMR、ESD) 後の腫瘍細胞の存在診断

もともとの腫瘍量が少ないために保存している血漿量からでは ctDNA の採取が困難であることが上記の研究から予測されたため、現在は研究が中断している状況である。

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)

Mutated genes on ctDNA detecting postoperative recurrence presented reduced neoantigens in primary tumors in colorectal cancer cases
Satoshi Nagayama, Yuta Kobayashi, Mitsuko Fukunaga, Shotaro Sakimura, Keishi Sugimachi, Shin Sasaki, Takaaki Masuda, Ken-ichi Mafune, Masanobu Oshima, Tatsuhiro Shibata, Yutaka Suzuki, Koshi Mimori
現在、投稿中。

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

崎村 正太郎 他、
大腸癌血液中 ctDNA を用いたリキッドバイオプシー、臨床医学出版、臨床消化器内科、2017、1043
崎村 正太郎 他、

ctDNAによる担がん患者の多様性の評価、
羊土社、実験医学、2017、620

〔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

崎村 正太郎 (SAKIMURA Shotaro)
九州大学病院・手術部・助教
研究者番号：60747393

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

三森 功士 (MIKMORI Koshi)
九州大学病院別府病院・外科・教授
研究者番号：50322748