

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19952

研究課題名(和文)食道癌テーラード治療に向けた血中遊離DNA中の変異遺伝子診断法の開発

研究課題名(英文)Exploitation of a liquid biopsy system using circulating tumor DNA in esophageal cancer patients

研究代表者

遠藤 史隆(Endo, Fumitaka)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：70714442

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):食道癌において、原発腫瘍組織から抽出したDNAを次世代シーケンス解析を行い、腫瘍特異的な変異遺伝子を同定し、digital PCRを使用して血中遊離DNA中の当該変異遺伝子であるcirculating tumor DNA(ctDNA)を定量・モニタリングすることが可能であった。また、ctDNAは治療前後においてCT検査で見られた腫瘍量の変化を反映する変動をしていた。ctDNA研究に必要な採血管において、BCT採血管、CPT採血管の両方を組み合わせて使用することで、効率よく研究できることが分かった。

研究成果の概要(英文): In this study, we performed and established tumor burden monitoring with ctDNA for esophageal squamous cell carcinoma patients treated with either surgery or chemotherapy, using next generation sequencer for mutation detection in primary tumors and digital PCR for ctDNA monitoring in blood samples. And combinatory procedure of BCT and CPT would be one of the most practical approaches for collection and storage of samples collected during extended follow-up.

研究分野：消化器外科学、分子生物学

キーワード：circulating tumor DNA circulating free DNA 食道癌 digital PCR 次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

食道癌は早期より頸胸腹部におよぶ広範囲リンパ節転移をきたしやすく予後不良な疾患である。手術や放射線治療といったモダリティが大きく異なる侵襲を伴う局所療法や、全身療法である化学療法が治療として用いられるが、CT、PETなどの画像検査では微小転移の診断や炎症性リンパ節腫大が転移かの判断が困難であり、SCC、CYFRA、CEAなどの腫瘍マーカーは陽性率・鋭敏度ともに低く、治療方針決定に難渋する場合も多い。また、完全切除や完全奏効と判断される状態でも1年以内に再発する症例もしばしばである。微小転移や遺残の正確な診断が治療方針決定や再発に対する早期の治療開始に重要であり、既存の診断法よりも微小病変を鋭敏に検出できる検査法の確立が求められているのが食道癌の現状である。

血中には体内で細胞死を起こした細胞から遊離したDNAが循環している(circulating free DNA : cfDNA)。近年、担癌患者ではcfDNA量が増加しており、またcfDNA中には原発腫瘍に存在する変異遺伝子と同じ変異を持つDNA(Circulating tumor DNA : ctDNA)が血中を循環していることが示されている(Schwarzenbach et al, Nat Rev Cancer Res 2011)。癌細胞由来のDNAが血中に存在することは古くから報告されており(Leon SA et al, Cancer Res 1977)、cfDNA中の遺伝子変異は体内に癌細胞が存在する定性的な診断となり、その特異性から優れた癌の存在診断マーカーとなりうる(Shaw et al, Genome Res 2012)。またその変異遺伝子量を定量することができれば体内の癌の存在量を推測できる可能性がある。実際、大腸癌や肺癌などではKRAS、BRAF、EGFRなどの変異部位・パターンがある程度限定されている遺伝子(Hot spot mutations)を用い、このような解析が試みられている。しかし、近年の次世代シーケンサー(Next generation sequencer : NGS)を用いた癌ゲノム解析により、いずれの癌種でも10%以上の症例で変異の見られる遺伝子はごく少数に限られ、5%前後の頻度の低い変異が1つの病巣に多数集積していることが明らかとなっている(Vogelstein et al, Science 2013)。したがって、NGSを用いたcfDNA中でのこれら多様な変異の解析が注目されている。

現在、ctDNA解析にはNGSあるいはdigital PCR(dPCR)が用いられている。NGSでは複数の遺伝子領域を検索可能であるが、解析にコストや時間を要する欠点がある。逆にdPCRは解析は数時間で低コストでモニタリングすることに向いているが、1解析で解析可能な変異が1~数個に限定される欠点がある。

当研究室の先行研究においても、NGSを用いStage I-III大腸癌患者のctDNA検出を試みたが、cfDNA中の変異アレル頻度はきわめて低頻度(先行研究では0.1~1%以下)で、

NGSを用いたctDNAの定性・定量は不可能であった。大腸癌 cell line 由来DNAの健常者DNAによる限界希釈実験では、NGSによる変異アレル検出限界は1%程度であった。この問題を克服するために当教室では、『原発巣腫瘍組織におけるNGSを用いた遺伝子変異スクリーニング 血中遊離DNAにおける当該遺伝子変異のdigital PCRによる定量・モニタリングシステム』を構築した。dPCRを用いたctDNA解析はKRAS、BRAF、EGFRなどのhot spot変異に関する報告が多いが、われわれが先行研究で確立したこのシステムは症例特異的な変異についてProbeをデザインするものであるため汎用性が高いものである。

Digital PCRは対象サンプルを多数の小区間(1区画1分子)に分割し、それぞれの区画でPCR反応による増幅の有無をカウントし定量を行う技術で、微量なtargetの定量を可能とする第3世代のPCRシステムである。先行研究では内視鏡切除の可能な早期癌を含めた切除可能大腸癌を対象とし、原発巣切除検体における遺伝子変異をNGSにて解析後、同定された遺伝子変異について腫瘍切除前後での血漿中の変異遺伝子量の変化をdigital PCRで定量可能かを検討した。本システムにより、大腸癌患者での血漿中の変異遺伝子量が原発巣切除後では切除前に比べて減少していることが複数の症例で確認された(Sato et al, PLoS One 2016)。

食道癌においては、前述したHot spot mutationは現在のところ知られたものはない。そこで、先行研究で構築した方法で、原発腫瘍組織をNGSすることで、腫瘍特異的な変異遺伝子を同定でき、digital PCRを使用してcfDNA中の当該変異遺伝子であるctDNAを定量・モニタリングすることが可能であると考えられた。

### 2. 研究の目的

食道癌に対する種々の治療の前後、follow upにおける微小な再発・転移や遺残の正確な診断や、治療による体内癌細胞量の変動について、ctDNA定量モニタリングによる体内腫瘍量予測診断と腫瘍マーカーや画像診断などの既存の検査法との精度の差を検証し、ctDNA診断を用いたテーラーメイド医療の可能性について考察する。ctDNAのモニタリングにより、既存の診断法よりも正確かつ早く転移・再発を診断することが可能と証明できれば、適切な治療をより迅速に行うことができ予後改善に繋がる。

### 3. 研究の方法

食道扁平上皮癌患者を対象とした。手術・放射線・化学療法などの治療内容・治療順は問わずStage I-IVで解析を行った。内視鏡的あるいは手術にて採取した原発巣切除検体の一部から抽出したDNAをNGS解析し、腫瘍特異的な遺伝子変異を同定した。NGS

解析には先行研究と同様、半導体型次世代シーケンサー (Ion PGM/Proton, Life Technologies 社)を用いた。変異検出にはヒトがん関連 50 遺伝子上の Hotspot 領域を標的とした PCR プライマーセット (Cancer Hotspot Panel v2 : CHPv2)、と TP53 Panel を研究開始当初は使用した。NGS で同定された腫瘍特異的な変異遺伝子に対して digital PCR 用に、Hypercool Primer&Probe™ method (日本遺伝子研究所)を用いて、Primer/Probe セットを作製した。血液サンプルは、各治療前後および follow up 中は3か月ごとのCT/腫瘍マーカー採取に合わせて採取した。血液検体は各 time point で 16mL 採取し、血漿を遠心分離し digital PCR 施行まで凍結保存した。末梢血単核細胞(PBMC)も NGS 解析の際、原発巣の腫瘍特異的な変異の対照として PBMC を使用するため、冷凍保存した。DNA 抽出時に凍結検体を解凍して、血漿からは QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit(Qiagen 社)を使用し、PBMC からは QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen 社)を使用して DNA を抽出した。Digital PCR は、QuantStudio 3D dPCR System(Thermo Fisher Scientific 社)を使用した。血中遊離 DNA 中に存在する微量の変異遺伝子(ctDNA)量の治療前後、経時的变化を digital PCR を用いて定量モニタリングを行った。

癌患者 ctDNA モニタリングに先立ち、作業効率を向上させるため新規採血管を採用した。PBMC/血漿分離を目的とした Vacutainer 採血管(CPT 採血管)は採血後2時間以内に遠心分離する必要があり、時間的制約が大きかった。cfDNA 保存を目的とした Cell-Free DNA BCT® (BCT 採血管) (Streck 社)は、試験管内の細胞安定化試薬により、検体保存期間中の血中有核細胞の genome DNA が血漿内へ流出することを防止することで、採血後室温で14日間保存でも cfDNA の上昇が少ないとされている。保存期間中の血漿中の正常細胞由来 DNA の増加は、癌患者における ctDNA 解析で変異アレルの相対的割合を減少させるため、予備実験として BCT 採血管および CPT 採血管それぞれの保存期間による cfDNA 量の経時的变化、操作性を比較検討した。7人の健康成人を対象とした。96mL 採血して BCT 採血管6本、CPT 採血管6本に分注し、各タイムポイント(採血直後、3、6、9、12、14日後)で血漿を遠心分離採取した。血漿から DNA (cfDNA) を抽出し、cfDNA 量と LINE-1 の copy 数の経時的变化を調べた。

また、BCT 採血管では PBMC の分離採取は困難であるが、BCT 採血管で長期保存し、遠心分離作業の直前に CPT 採血管に血液を移しかえることで、血漿と PBMC を分けて採取することが可能ではないかと考え、その場合に採取できる DNA 量に影響はないかどうか調査した。1)CPT 採血管に採血直後に

PBMC を分離したもの、2)BCT 採血管に採取した直後に CPT 採血管に血液を移しかえて PBMC を分離したもの、3)BCT 採血管に採取し7日間室温保存した後に CPT 採血管に血液を移しかえて PBMC を分離したもの、の3つで比較検討を行った。この採血した血液を BCT 採血管から CPT 採血管に移しかえる手法を用いて、実際の食道癌患者の手術・化学療法などの治療前後における ctDNA 量を計測し、CT でモニタリングする腫瘍量と比較検討した。

#### 4. 研究成果

食道癌5症例の原発巣で、がん関連遺伝子上の Hotspot 領域を標的とした Cancer Hotspot Panel v2(CHPv2)を用いたターゲットシーケンスを行ったが、同定された遺伝子変異は TP53(6個)、FBXW7(1個)のみであった。食道癌では、CHPv2 の有用性は低いことが示唆されたため、効率的変異同定には組織・癌種特異的なターゲットシーケンスが必要と考えられた。そこで、食道癌症例で5%以上の頻度で変異が報告されている31遺伝子を標的とした Ion Torrent プラットフォーム用のカスタムパネル(食道癌カスタムパネル)を作製した。

次に、採血管の研究結果を述べる。両採血管ともに保存時間が長くなるほど、血漿の色調が赤色、混濁してきていた。採血後6日経過すると、血漿と PBMC 層の境目が不明瞭になってきており、血漿と PBMC を分離する手技が安定しなくなってくる可能性があった。CPT 採血管は BCT 採血管と比較すると、3日目以降から著明に cfDNA 量、LINE-1 の copy 数とともに増加してきていた(図 1a, 1c)。PBMC 層の血中有核細胞が破碎され、血漿中に genome DNA が流出していき、cfDNA 量が増加しているものと考えられた。

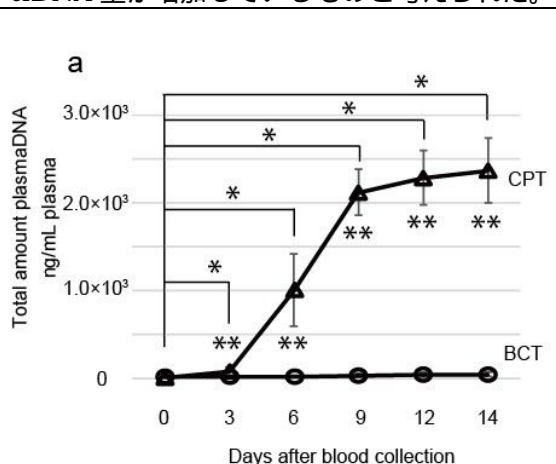


図 1a : CPT は BCT と比較すると、3日目以降から著明に cfDNA 量が増加する。

BCT 採血管においては、cfDNA 量と LINE-1 の copy 数の経時的变化は9日目までは採血直後と比べて有意差がない状態であった(図 1b, 1d)。

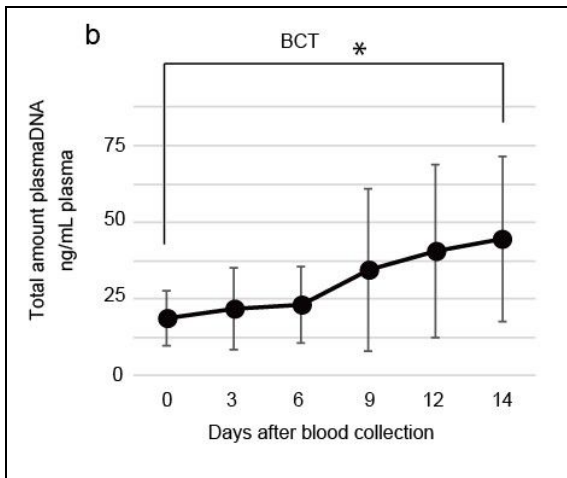


図 1b : BCT においては、6 日目以降で徐々に cfDNA が増加傾向になり、14 日目に有意差が生じた。

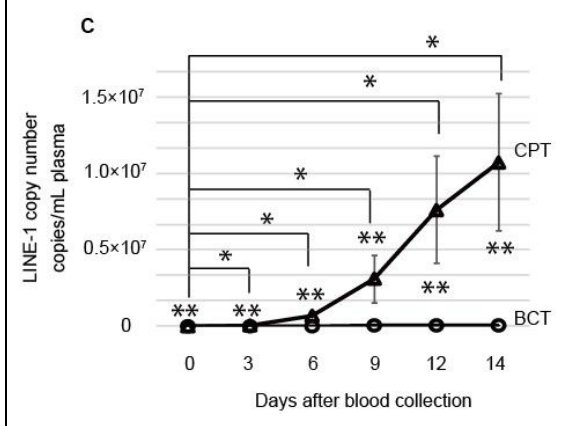


図 1c : CPT は BCT と比較すると、3 日目以降から著明に LINE1 の copy 数が増加する。

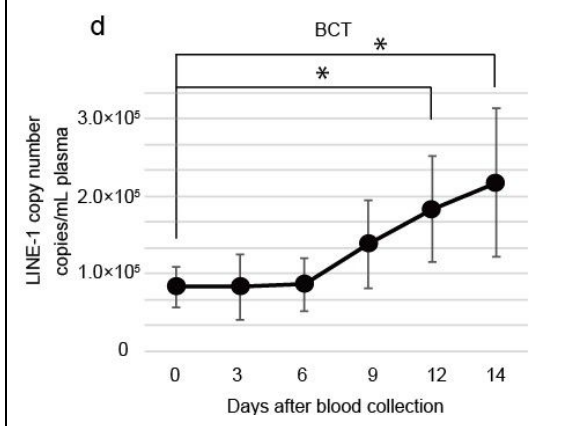


図 1d: BCT においては、6 日目以降で徐々に LINE1 copy 数が増加傾向になり、12 日目から有意差が生じた。

このことから、BCT 採血管においては、採血して 9 日目までは cfDNA を安定して保存可能であると考えられた。BCT 採血管で保存した後、CPT 採血管に血液を移しかえて PBMC を採取しても、採取できる DNA 量に影響はないかどうかを調べたところ、少なくとも調査した 7 日目までは、DNA 量に影響なく採取可能であった (図 2)。BCT 採血管で長期保存後に CPT 採血管に入れかえることでも、PBMC を採取可能であることを証明できたので、この手技を使って本研究を進めること

とした。

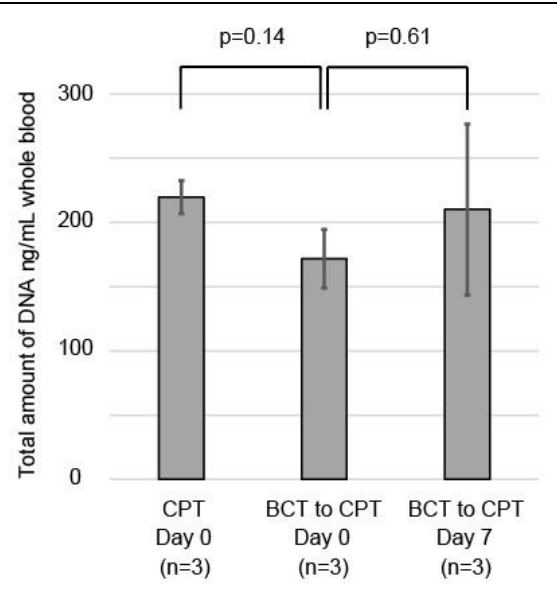


図 2 : 採血直後(day0)に CPT から PBMC を採取し抽出した DNA 量と、BCT から CPT に血液を移し替えて PBMC 採取し抽出した DNA 量には有意差はなかった。BCT に採血後すぐに CPT に移し替えて PBMC を採取し抽出した DNA 量(day0)と、day7 まで BCT で保存後に CPT に血液を移し替えて PBMC 採取し抽出した DNA 量(day7)の間には有意差はなかった。

最初に、食道扁平上皮癌患者 5 人において、原発巣から抽出した DNA を TP53 panel を使用して NGS を施行して各症例の腫瘍特異的な変異遺伝子を同定した。5 症例全てにおいて、TP53 の mutation を認めた。同定された各 mutation に対応した Primer/Probe セットを作成し、各治療前後において ctDNA のモニタリングを行った。Stage IA などの腫瘍量の小さい症例では治療前後で ctDNA を検出できなかった。腫瘍量の多い進行癌の症例では、治療前に ctDNA を検出することが可能であった。治療後においては、CT 検査で見られた腫瘍量変化と同様に ctDNA が変動している結果が得られた (図 3a, 3b)。

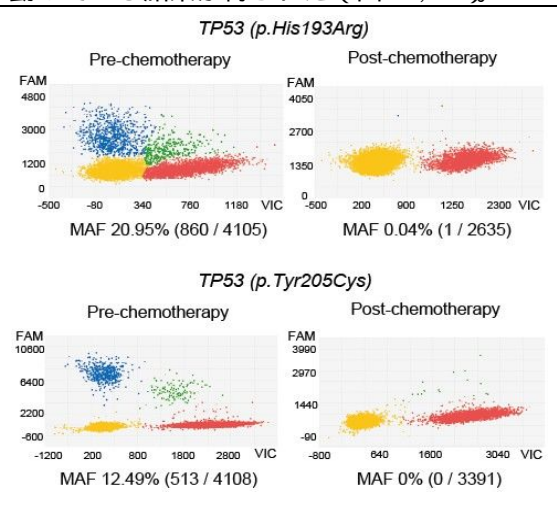


図 3a : 腫瘍量の多い患者では、化学療法施行前には ctDNA を計測可能であった。化学療法後には下記 CT 結果と同じ傾向に ctDNA も減少していた。



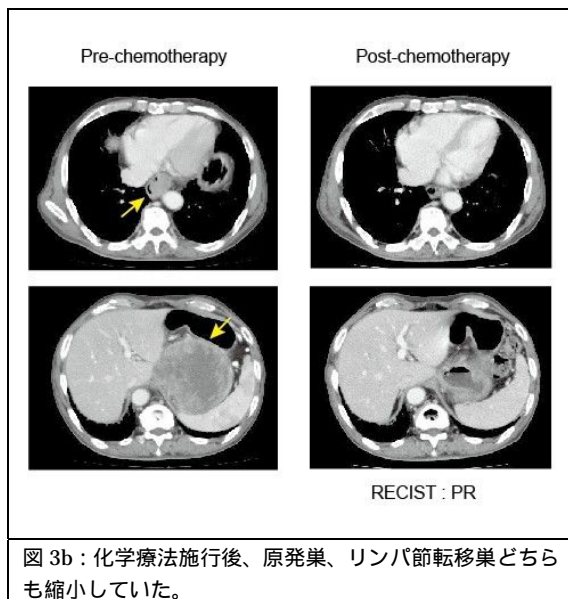


図 3b : 化学療法施行後、原発巣、リンパ節転移巣どちらも縮小していた。

採血管の研究についての結果を論文にまとめた(投稿中)

これらの結果を元に、現在、食道癌患者の治療前から治療後の follow において、ctDNA を経時的にモニタリングすることで、既存の検査よりも早く、確実に再発・転移を診断できることが可能かを追跡研究中である。

#### 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)

[学会発表](計 8 件)

#### 1. 第 118 回日本外科学会定期学術総会 2018 年

食道癌患者における Circulating tumor DNA モニタリングシステムの検討

岩谷 岳、遠藤 史隆、秋山 有史、千葉 丈広、馬場 誠朗、梅邑 晃、二階 春香、佐藤 慧、八重樫 瑞典、川岸 涼子、松尾 鉄平、木村 聡元、高原 武志、大塚 幸喜、新田 浩幸、水野 大、肥田 圭介、西塚 哲、佐々木 章

#### 2. アメリカ癌学会(国際学会)2017 年 Evaluation of the utilization of blood collection tubes for cell-free DNA research

Fumitaka Endo, Takeshi Iwaya, Takehiro Chiba, Mizunori Yaegashi, Kohei Kume, Kei Sato, Atsuhiko Arisue, Yutaka Nishinari, Ryoko Kawagishi, Takenori Segawa, Satoshi Nishizuka, Akira Sasaki

#### 3. 第 117 回日本外科学会定期学術総会 2017 年

食道扁平上皮癌治療経過における血液腫瘍マーカーの有用性

遠藤 史隆、岩谷 岳、秋山 有史、塩井 義裕、天野 総、高原 武志、西塚 哲、新田 浩幸、大塚 幸喜、肥田 圭介、水野 大、

佐々木 章

#### 4. JDDW(日本消化器関連学会週間)第 59 回消化器病学会大会 2017 年

遺伝子変異情報を用いた食道扁平上皮癌診療システムの開発

遠藤 史隆、岩谷 岳、秋山 有史、梅邑 晃、二階 春香、烏谷 洋右、高原 武志、新田 浩幸、大塚 幸喜、肥田 圭介、水野 大、松本 主之、西塚 哲、佐々木 章

#### 5. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 Exploitation of a liquid biopsy system using circulating tumor DNA in esophageal cancer patients

Takeshi Iwaya, Fumitaka Endo, Yasushi Sasaki, Mizunori Yaegashi, Takehiro Chiba, Yuji Akiyama, Mari Masuda, Tesshi Yamada, Takashi Tokino, Satoshi Nishizuka

#### 6. 第 72 回消化器外科学会総会 2017 年 食道扁平上皮癌パネルを用いた変異解析の有用性の検討

岩谷 岳、遠藤 史隆、西塚 哲、秋山 有史、高原 武志、大塚 幸喜、新田 浩幸、肥田 圭介、水野 大、佐々木 章

#### 7. アメリカ癌学会(国際学会)2017 年 Mutation detection by target sequence analyses using tissue-specific panels in esophageal squamous cell carcinoma

Takeshi Iwaya, Fumitaka Endo, Kohei Kume, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino, Satoshi Nishizuka

#### 8. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 Evaluation of the utility of blood collection tubes for cell-free DNA research

Fumitaka Endo, Takeshi Iwaya, Takehiro Chiba, Mizunori Yaegashi, Kei Sato, Kohei Kume, Satoshi Nishizuka

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 史隆(Fumitaka Endo)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号: 70714442