

平成 30 年 4 月 11 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21647

研究課題名(和文) 血漿遊離DNAの高感度シーケンス解析による悪性黒色腫病態モニタリング法の開発

研究課題名(英文) Monitoring of therapeutic response by targeted sequencing of cell-free DNA in melanoma patients

研究代表者

高井 英里奈(Takai, Erina)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・外来研究員

研究者番号：90723891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、悪性黒色腫患者から経時的に採取した血漿サンプルを用いて血中遊離DNAの高感度なターゲットシーケンス解析を行い、悪性黒色腫の病態モニタリングにおけるLiquid biopsyの可能性を明らかにすることを目的として検討を行った。その結果、がんの増悪時にctDNA量が上昇するなど、多くの症例で患者の病態を反映したような変化が認められた。さらにがんのクローン進化やがんゲノムの多様性が血漿cfDNAの解析から捉えられる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the utility of targeted deep sequencing of cell-free DNA (cfDNA) for monitoring of therapeutic response in melanoma patients. Plasma was obtained from melanoma patients across several time points during treatment and plasma cfDNA samples were subjected to targeted sequencing. We found that the changes of mutant cfDNA levels were associated with the treatment response or progression. Furthermore, it was suggested that tumor heterogeneity or clonal evolution might be reflected in cfDNA.

研究分野：腫瘍学

キーワード：悪性黒色腫 次世代シーケンス 血中遊離DNA

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は最も悪性度の高い皮膚がんとして知られている。日本における患者数は欧米と比較すると少ないが、近年増加傾向にある。限局性の悪性黒色腫に対しては根治目的に外科的切除が行われるが、一部の症例では再発をきたし、予後不良となる。一方、切除不能悪性黒色腫に対しては化学療法や放射線療法が行われる。特に近年、免疫チェックポイント阻害剤の抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体は優れた治療効果が期待され、盛んに用いられるようになってきている。しかしこれらの薬剤は年間の薬剤費が極めて高額である一方で、その奏功率は決して高くないため、その治療効果を早く見極めることのできる検査が求められている。

がん患者の血漿遊離 DNA (cell-free DNA; cfDNA) の中にはごく微量にがん細胞由来 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) が含まれている。次世代シーケンス技術などによる cfDNA を用いた遺伝子診断は "Liquid biopsy" と呼ばれ、侵襲性の低いがんの診断法として期待されている。Liquid biopsy は患者の負担が少なく、繰り返しの検査が容易であることから、がんの病態モニタリングに有用と考えられる。しかし、悪性黒色腫において、高感度に複数の遺伝子異常を解析可能なターゲットシーケンスを用いた、cfDNA 解析による病態モニタリングの有用性についてはほとんど検討されていなかった。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では悪性黒色腫の治療に伴う体内の腫瘍量の変化や、治療方針の決定に役立つ情報を得るための病態モニタリングにおける、cfDNA と独自の遺伝子パネルを用いた高感度なターゲットシーケンス解析の有用性を明らかにすることを目的として検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 血液検体の採取および血漿分離

国立がん研究センター中央病院において、インフォームドコンセントを行なった悪性黒色腫患者から、治療開始前および治療期間中に経時的に 14 mL の採血を行った。採血後は直ちに血漿を分離し、凍結保存した。同時に生殖細胞系列 DNA 解析のためのリンパ球も回収し、凍結保存した。

(2) 血漿 cfDNA の抽出

およそ 5 mL の血漿サンプルから、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN 社) を用いて cfDNA の抽出を行なった。抽出した cfDNA 溶液は real-time PCR 法により定量を行なった。

(3) ターゲットシーケンスライブラリの作製

少量の cfDNA についてシーケンス解析を行うため、シーケンスライブラリ作製には KAPA Hyper Prep Kit (KAPA Biosystems 社) の試薬と SureSelect Target Enrichment System (Agilent Technologies 社) の試薬を組み合わせ用いた。ターゲット濃縮には、悪性黒色腫で高頻度に変異が生じる遺伝子に加え、治療に対する感受性や抵抗性に関連することが報告されている遺伝子などを搭載した独自の遺伝子パネルのプローブを使用した。

(4) 次世代シーケンス解析

シーケンス解析には、Illumina 社の HiSeq 2500 を使用し、リード長 100 bp, paired-end でデータを取得した。

4. 研究成果

45 例の悪性黒色腫患者から、合計 210 の血漿サンプルを採取、保存した。手術症例については、腫瘍組織サンプル（凍結もしくはパラフィン包埋）も収集することができた。各血漿サンプルから cfDNA を抽出し、定量を行なった結果、同一患者由来のサンプルで

も血漿に含まれる遊離 DNA 量は治療経過とともに大きく変動していることが明らかとなった。

長期間にわたりサンプル収集を行うことができた症例を中心に、病態モニタリングの有用性の検討に特に適していると考えられた 27 症例の cfDNA サンプルについて、ターゲットシーケンスライブラリを作製してシーケンス解析を行った。重複リード除去後の値として、平均 1775.18x のシーケンスカバレッジが得られた。それぞれのサンプルについて in-house の解析パイプラインを用いて体細胞変異を検出した。同一患者由来のサンプルであっても、血中 cfDNA の全体量が大きく異なっていたことから、変異アリル頻度ではなく検出された体細胞変異を持つ ctDNA 量を算出し、経時的変化を検討した。その結果、がんの増悪時に ctDNA 量が上昇するなど、多くの症例で患者の病態を反映したような変化が認められた。特に一部の患者においては、画像診断上で増悪が認められる前に ctDNA 量の上昇が見られた。また、悪性黒色腫で用いられる血清腫瘍マーカーである乳酸脱水素酵素 (LDH) の値と比較すると ctDNA 量の方が値の変化が大きく、病態をより鋭敏に捉えられる可能性が示唆された。さらに、複数の体細胞変異が検出された症例においては、治療の過程で新たに検出される変異や、異なる変動パターンを示す変異グループも認められており、cfDNA の高感度なシーケンス解析からがんのクローン進化やがんゲノムの多様性を捉えることができる可能性が示唆された。

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 2 件)

1. Erina Takai, Shinichi Yachida.

Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer.

World Journal of Gastroenterology (2016) 14:22(38):8480-8488.

2. Erina Takai, Yasushi Totoki, Hiromi Nakamura, Mamoru Kato, Tatsuhiro Shibata, Shinichi Yachida
Clinical Utility of Circulating Tumor DNA for Molecular Assessment and Precision Medicine in Pancreatic Cancer.
Advances in Experimental Medicine and Biology (2016) 924:13-17.

[学会発表] (計 1 件)

1. Erina Takai, Daichi Maeda, Yasushi Totoki, Hiromi Nakamura, Mamoru Kato, Takamitsu Inoue, Tomonori Habuchi, Akiteru Goto, Tatsuhiro Shibata, Shinichi Yachida
The mutational status of plasma cell-free DNA and their relevance to mutations in metastatic sites in an autopsy case of prostate cancer
The 10th Congress of Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum, September 20-22, 2017. Montpellier
Poster Presentation

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.ncc.go.jp/jp/ri/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高井 英里奈 (TAKAI, Erina)

国立がん研究センター研究所・外来研究員

研究者番号：90723891

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし