

令和 元年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：16KK0204

研究課題名（和文）単一乳癌細胞全ゲノムシーケンス解析技術を応用した腫瘍内不均一性の解析とその克服（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Analysis of intra-tumoral heterogeneity of breast cancer using single-cell whole-genome sequencing techniques(Fostering Joint International Research)

研究代表者

及川 将弘 (OIKAWA, Masahiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・客員研究員

研究者番号：90612416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 7,500,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：末梢血単核球分画より循環腫瘍細胞を一細胞として単離する手技を習得した。一つの乳癌細胞より、NGS用のバーコードライブラリを作成し、whole genome copy number analysis, whole exome mutation analysis を行う手技 (HM-SNS, SNES) を習得した。さらに本技術を応用して、微量な血漿循環腫瘍DNA (ctDNA) より、原発巣・転移巣の変異情報を用いることなく、whole genome copy number analysis, whole exome mutation analysis を行う手技 (PEGASUS) を習得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

帰国後も習得した技術を用いて、乳がん癌性髄膜炎症例におけるCSFと血漿中のctDNAのゲノムプロファイル解析、抗がん剤治療中の腫瘍内不均一性と治療抵抗性に関わる因子を解析するための前向き観察研究、HER2陽性乳がん患者の治療前後のctDNA中のHER2 amplificationの検出について、海外研究者とも連携して研究を継続しており、その成果の一部は国際学会にて発表した。これらのNext-generation sequencingを基盤とした技術はがんのゲノム研究に関して汎用性が高く、上記以外の課題についても応用することが可能である。

研究成果の概要（英文）：I studied at Nick Navin's Lab at Dep. of Genetics for one year and learned cutting-edge technologies for translational study, such as liquid biopsy and single cell genomic analysis.

We applied novel liquid biopsy technology named PEGASUS to sequence matched blood samples and central system fluid (CSF) from 10 breast cancer patients with leptomeningeal disease. Our data identified aneuploid copy number aberrations and somatic mutations (range: 11-25) in the CSF of 7 patients, including mutations in known driver genes such as BRCA2, TP53 and amplifications of MYC and ERBB2.

Thanks to the great experience there, I continue translational research with the technologies in Japan and keep in touch with great researchers at MDACC.

研究分野：外科学

キーワード：乳がん 一解析 リキッドバイオプシー 腫瘍内不均一性 次世代シーケンサー がんゲノム コピーナンバ

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム不安定性は癌の重要な生物学的特徴である。ゲノム不安定性の高い腫瘍は、発達の過程で腫瘍内不均一性 (**Intra-tumoral heterogeneity**) を獲得し、治療抵抗性の原因となる。特に、最近の癌治療の主流となりつつある標的治療は、標的を持つ癌にはきわめて有効であるが、持たない癌については全く効果がないという特性があり、腫瘍内不均一性および治療中のクローン交替 (**Clonal change**) にどの様に対処するかが大きな課題となっている。

これまでに癌の腫瘍内不均一性は免疫化学染色 (**IHC**)、**in situ hybridization (DISH** や **FISH**)、アレイ **CGH**、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム/エクソームシーケンス (いわゆる **bulk sequence**) で行われてきたが、近年の分子遺伝学的技術の進歩は単一細胞全ゲノム/エクソームシーケンスを可能とした。具体的には、セルソーターもしくは **LCM** による単一細胞の単離、ゲノム DNA の抽出 **whole genome amplification** ライブラリの作成、次世代シーケンサーによるシーケンスというステップが必要であり、解析には **Bioinformatics** の高度な技術も必要とされる。

海外共同研究者の **Nicholas Navin** 先生は乳癌の単一癌細胞シーケンス分野の先駆者であり、**2011** 年の **Nature** 誌での発表以来、精力的に乳癌ゲノム解析に取り組んでいる。これまでに、乳癌のゲノム構造変異が比較的早期にまとめて起こっていること (**punctual burst**)、塩基置換はその後クローンごとに積み重なっていくこと、それぞれの症例ごとに腫瘍内不均一性の程度と発展様式が異なることを明らかにしてきたが、これらの成果は単一癌細胞シーケンス技術の実用化によりもたらされたものである。

基課題では乳癌における腫瘍内不均一性と治療に伴うクローン交替を解析の対象としているが、単一乳癌細胞全ゲノムシーケンス解析技術を導入することにより、腫瘍内不均一性及び治療によるクローン交替が治療効果に与える影響をより精密に解析して臨床応用に繋げることが可能となり、基課題における目標達成を加速・深化させることができる。また、本邦ではほとんど行われていない癌細胞全ゲノムシーケンス解析技術を習得し、国内に持ち帰ることは、我が国の乳癌ゲノム解析研究およびトランスレーショナルリサーチの発展に大きく資するものと確信し、本国際共同研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本国際共同研究の目的は、基課題に単一乳癌細胞全ゲノムシーケンス解析技術を導入することにより、腫瘍内不均一性及び治療によるクローン交替が治療効果に与える影響をより精密に解析して臨床応用に繋げることである。具体的には、これまでの研究において明らかになった技術的な課題を、単一乳癌細胞全ゲノムシーケンス解析技術により解決し、基課題における目標達成を加速・深化させる。

### (1) 単一乳癌細胞全ゲノムシーケンスによる乳腺扁平上皮癌の腫瘍内不均一性の解析

我々はこれまでに、乳腺扁平上皮癌 (**SCC**) と通常型乳癌 (**NST**) に関してアレイ **CGH** を用いて **cytogenetic profile** を明らかにし、その腫瘍間不均一性及び腫瘍内不均一性の大きさを明らかにした。また、**SCC** 部の発生母地が **NST** 部であることを示唆する結果を得た。しかし、**SCC** 部で共有されたゲノム構造変化を同定することは出来なかった。すなわち、扁平上皮癌という特徴的な形態学的変化を引き起こす原因遺伝子は、アレイ **CGH** によるゲノム構造変化では同定できず、シーケンス等で発見される塩基置換によって引き起こされている可能性が高い。

本国際共同研究では、これまでの研究を基に **SCC** 部、**NST** 部から癌細胞を **laser capture microdissection (LCM)** にて回収し、それぞれの癌細胞より単一乳癌細胞全ゲノムシーケンスを行う。これにより、同一腫瘍内でのゲノム変化の過程を明らかにするとともに (**phylogenetic tree**)、扁平上皮癌を引き起こす原因遺伝子を同定したい。扁平上皮癌はその特徴的な形態学的変化だけでなく、高い転移能と増殖能・抗がん剤抵抗性が特徴であり、その原因遺伝子は新規標的治療の有望な候補となるものと思われる。

### (2) 単一乳癌細胞全ゲノムシーケンス技術を応用した ctDNA 中の **HER2 amplification** の検出

**HER2 gene amplification** は正常組織では起こり得ない変化であるため、**cell free DNA (cfDNA)** 中の **HER2 amplification** の検出は、**circulating tumor DNA (ctDNA)** を捉えていると考えられる。我々は術前化学療法前後の **ctDNA** 中の **HER2 amplification** の検出と治療効果・予後との関連を調べるため、前向き観察研究を計画した。術前化学療法症例だけでなく進行再発症例についても、**HER2** 陽性乳がん症例の血漿サンプルを集積してきた。基課題では **ctDNA** 中の **HER2 amplification** を検出する手段としてアレイ **CGH** を採用していたが、早期癌症例では **cfDNA** 濃度が検出限界以下のため **whole genome amplification (WGA)** が必要となる。しかし、**WGA** で増幅される領域は全ゲノムの数%であるため、通常のアレイ **CGH** ではノイズが大きくなり、ゲノム構造変化の検出が困難であることが課題であった。一方で、単一癌細胞全ゲノムシーケンスでは、同様に微量な試料であるため **WGA** のステップが必須となるが、次世代シーケンサーによって得られる各領域のリードの数を解析することにより、**WGA** 後であっても、ア

レイ CGH よりも高精細なゲノム構造変化の解析が可能である。

本国際共同研究では、我々のストックしている血漿サンプルより **QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen 社)** を用いて **cfDNA** を抽出し、**WGA** 後に次世代シーケンサーをかけて **HER2 amplification** の有無を検出、治療効果と予後との関連を解析する。**ctDNA** の検出に単一乳癌細胞全ゲノムシーケンス技術を応用することにより、より早期の症例でも **ctDNA** を検出することが可能になると考えられ、新規治療法・治療薬を探索する臨床研究において有用な **Biomarker** になると考えられる。

### (3) 単一乳癌細胞全ゲノムシーケンスによる乳癌術前化学療法中のクローン交替と治療効果・予後との関連

基課題では術前化学療法開始前および化学療法施行中の乳癌組織より、穿刺吸引細胞診の手技にて癌細胞の採取を行い、**tumor DNA** を抽出する。**SNP** マイクロアレイを用いたアレイ **CGH** を行い、治療に伴うクローン交替を定量的に評価し、治療効果・予後との関連を解析する予定である。本手技により数百個の癌細胞が採取されるが、全体から **tumor DNA** を抽出するため、マイナーなクローン交替は検出できない可能性がある。本国際共同研究では、同様の手技にて癌細胞を採取するが、これをフローサイトメトリーで分離し、単一癌細胞ゲノムシーケンスを行う。これにより、抗癌剤治療に伴うクローン交替をより精密に解析が可能になり、治療抵抗性に関わる原因遺伝子の発見にも資するものと考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) Single cell genomic analysis について

腫瘍検体及び血液検体からの **single cell** の単離は **RARECYTE** システム (**RareCyte Inc.** 社)を用いた。血液検体の場合、全血 **8mL** より **AccuCyte system** によって赤血球、血漿と細胞成分を含む **Buffy coat** を分離する。この **Buffy coat** を用いて **8-16** 枚のスミアスライドを作成、**DAPI, Cytokeratin, CD45, EpCAM** にて染色する。**CytoFinder system** 上で **Cytokeratin/EpCAM(+)/CD45(-)**細胞の位置情報を基に、極微細な **micro needle** で単一細胞を回収する。**Vimentin** 等の染色を行うことにより、**EMT** 細胞も対象とすることが可能である。

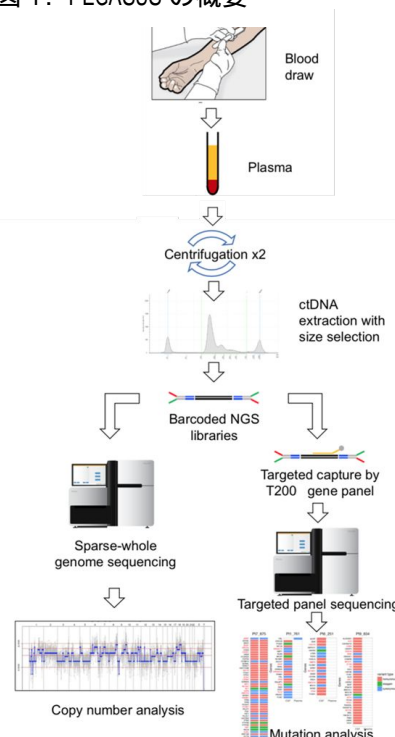
全ゲノムコピーナンバー解析は **Highly multiplexed single-nucleus sequencing (HM-SNS)**で行った。単離した細胞核より **DOP-PCR** にて **WGA** を行い、バーコードライブラリを作成、**sparse-whole genome sequence** を行う(**0.1x depth**)。 **BWA** にてアライメント後、**verbin program** にて得られた **read count** を基に **copy number profile** を描出する。

全エクソン変異解析では **Single nucleus exome sequencing (SNES)**で行った。 **WGA** を行う際により **fidelity** の高い **limited MDA** 法を用いた。バーコードライブラリ作成後、**exome capture** を行い、およそ **x150 depth** での **exome sequence** を行った。アライメントおよびアノテーションは **GATK4, annovar** にて行った。

### (2) Liquid Biopsy について

**ctDNA** は循環腫瘍細胞 (**Circulating Tumor Cells: CTC**) よりも感度が高く、画像所見より早く病勢を反映するが、血漿中には正常組織由来とがん組織由来の血漿遊離 **DNA** が混在しているため、がん特有の変化を同定しなければ **ctDNA** として検出されない。即ち、原発巣または転移巣のがん特有のゲノム変化、または乳がんでは一般的な **Hot spot mutation** の情報が無ければ **ctDNA** として検出ができないことが大きな課題であった。これを解決する方法として、**Nicholas Navin** らは事前に変異情報を用いることなく **ctDNA** を高感度に検出可能な新規リキッドバイオプシー法 (**Plasma Exome and Genome Analysis by Size-Selection and Unbiased Sequencing: PEGASUS**) を開発した。本法ではキット製品により抽出された **ctDNA** を **magnetic beads** による **size-selection** にか、NGS 用の **barcoded library** を作成した。**MiSeq** による **sparse whole-genome sequence** を行い、**bowtie2** にて **hg19** にアライメントさせ自家製スクリプトにより **Whole-genome copy number profile** を得た。変異解析については同一のライブラリより **exon capture** を行い、およそ **x150 depth** での **exome sequence** を行った。ア

図 1. PEGASUS の概要



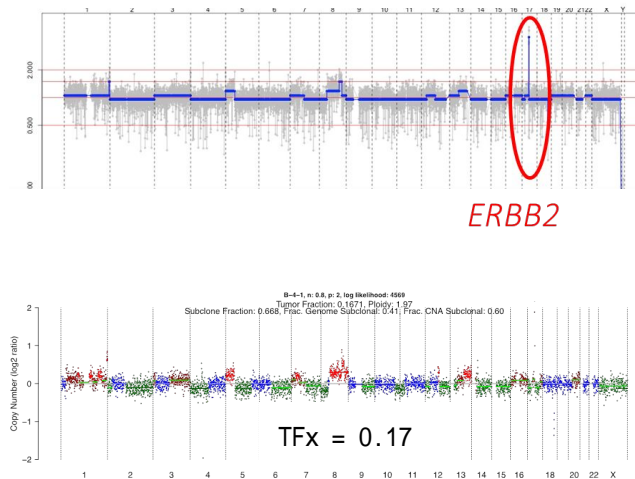
ライメントおよびアノテーションは **GATK4, annovar** にて行った。

#### 4. 研究成果

(1) 単一乳癌細胞全ゲノムシーケンスによる乳腺扁平上皮癌の腫瘍内不均一性の解析  
基課題で解析した通常型乳癌と扁平上皮癌が混在した症例について、LCM に適した検体を収集中である。

(2) 単一乳癌細胞全ゲノムシーケンス技術を応用した ctDNA 中の HER2 amplification の検出  
これまでに初期治療症例 16 例、転移再発治療例 7 例の血漿サンプルを経時的に収集している。キット製品により抽出された ctDNA を magnetic beads による size-selection につけ、NGS 用の barcoded library を作成した。MiSeq による sparse whole-genome sequence を行い、bowtie2 にて hg19 にアライメントさせ自家製スクリプトにより Whole-genome copy number profile を得た。これまでに解析した転移再発治療中の 3 例においてはいずれも HER2 遺伝子 (ERBB2 遺伝子) の増幅を認め、ctDNA を検出可能であった。また、copy 数変化から計算される tumor fraction (TFx) の経過を追跡することが可能であった。初期治療の 7 例中、高度の腋窩リンパ節転移を認めた 1 例で HER2 遺伝子の増幅を検出し、術前化学療法後に非検出となっていた。本手法を HER2 陽性乳癌患者の診療に応用することにより、治療効果予測やハイリスク症例の層別化等に活用できる可能性が示唆された。今後もサンプル収集及び解析を続行する予定である。

図2. ctDNA からの whole-genome copy number profile と TFx



(3) 単一乳癌細胞全ゲノムシーケンスによる乳癌術前化学療法中のクローン交替と治療効果・予後との関連

転移・再発トリプルネガティブ乳がん患者における、抗がん剤治療中の腫瘍内不均一性と治療抵抗性に関わる因子を解析するための前向き観察研究 (Genomic Profiling of Therapy Resistance in Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Using Liquid Biopsies-PA17-0437) を Department of Breast Medical Oncology と共同で企画立案し、開始した。帰国後、国内の施設でも IRB への申請を行い、サンプルの収集を開始した。サンプルの保管方法についての基礎実験は終了しており、CTC, ctDNA とともに冷凍での保存・輸送が可能であった。これまでに 4 症例 22 サンプルを回収し Deep freezer で保管中である。集まったサンプルは国内で処理したのちに Navin Lab, MD Anderson Cancer Center へ送付し、共同で解析を行う予定である。

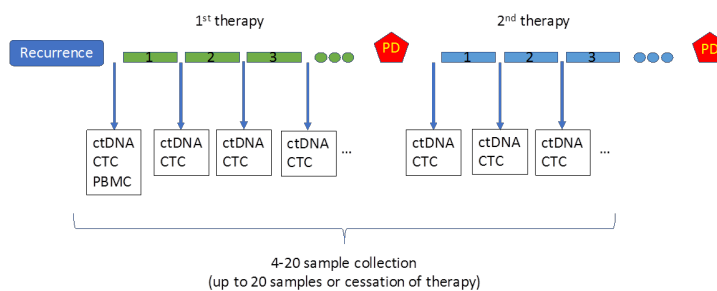


図3. 本臨床研究のデザイン

(4) 癌性髄膜炎を来した転移性乳癌症例における脳脊髄液を用いた非侵襲的ゲノムプロファイリング

画像又は細胞診断学的に癌性髄膜炎と診断された 7 症例より脳脊髄液を採取し、ctDNA を抽出した。4 症例ではペアとなる血漿より同様の手法で ctDNA を抽出した。マルチプレックスバーコードライブラリを作成し、コピーナンバー解析のために Illumina MiSeq または HiSeq にて全ゲノムシーケンスを行った。一塩基置換解析については、癌関連の 2000 の遺伝子を含むカスタムパネルによりエクソンキャプチャを行い、HiSeq にてターゲットシーケンスを行った。参照ゲノム (hg19) に対してアライメントを行った後、コピーナンバー及び一塩基置換プロファイルを作成した。脳脊髄液 6 サンプルと血漿 4 サンプルにおいて、遊離 DNA を抽出可能であった。1 例の脳脊髄液サンプルは diploid

profile を示したが、残りの 5 サンプルでは ERBB2 や MYC を含む多くの領域にコピーナンバー変化を認めた。一方で、血漿サンプルでは 1 例を除き、全て diploid profile であった。多数の頭蓋外転移病巣を伴った 1 例では、脳脊髄液・血漿サンプル共に多くのコピーナンバー変化を有し、そのプロファイルは高い相関を示した ( $R=0.75$ )。一塩基置換解析を行った 4 例では全ての脳脊髄液サンプルで TP53, RB1 を含むがん関連遺伝子に変異を認めたが、1 例を除くペア血漿サンプルには認めなかった。多数の頭蓋外転移病巣を伴った 1 例では、脳脊髄液・血漿サンプル共に多く変異を認め、その多くは (59.5%) 共有されていた。転移性乳癌の癌性髄膜炎では多くのゲノム変化が血漿からの ctDNA では検出できず、脳脊髄液を用いたゲノムプロファイリングが有用である。

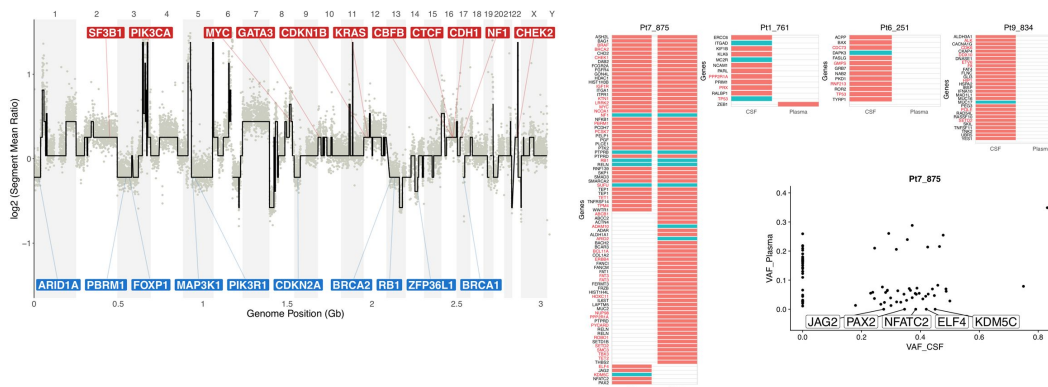


図 4. CSF 中の ctDNA からの whole-genome copy number profile (左) と mutation profile (右)。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者は下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 3 件 )

**Otsubo R, Matsuda K, Mussazhanova Z, Sato A, Matsumoto M, Yano H, Oikawa M, Kondo H, Ito M, Miyauchi A, Hirokawa M, Nagayasu T, Nakashima M. A novel diagnostic method for thyroid follicular tumors based on immunofluorescence analysis of p53-binding protein 1 expression: detection of genomic instability. *Thyroid*. 2019 Mar 30. doi: 10.1089/thy.2018.0548. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30929573. 査読あり**

**Otsubo R, Hirakawa H, Oikawa M, Baba M, Inamasu E, Shibata K, Hatachi T, Matsumoto M, Yano H, Abe K, Taniguchi H, Nakashima M, Nagayasu T. Validation of a Novel Diagnostic Kit Using the Semidry Dot-Blot Method to Detect Metastatic Lymph Nodes in Breast Cancer: Distinguishing Macrometastases From Nonmacrometastases. *Clin Breast Cancer*. 2018 Jun;18(3):e345-e351. doi: 10.1016/j.clbc.2017.07.009. Epub 2017 Jul 15. PubMed PMID: 28778378. 査読あり**

**Oikawa M, Igawa A, Taguchi K, Baba K, Ishida M, Akiyoshi S, Yano H, Nagayasu T, Ohno S, Tokunaga E. Cytogenetic analysis of metaplastic squamous cell carcinoma of the breast inter- and intratumoral heterogeneity. *Breast Cancer*. 2017 Nov;24(6):733-741. doi: 10.1007/s12282-017-0768-x. Epub 2017 Mar 18. PubMed PMID: 28316008. 査読あり**

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

**Noninvasive genomic profiling of cerebral spinal fluid in breast cancer patient with leptomeningeal disease. Masahiro Oikawa, Naveen Ramesh, Emi Sei, Shanshan Bai, Min Hu, John de Groot, Rashmi K Murthy, Barbara O'Brien and Nicholas E. Navin. AACR2018 (Chicago, USA)**

[ 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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名：**Nicholas Navin**

ローマ字氏名：**Nicholas Navin**

所属研究機関名：**The University of Texas MD Anderson Cancer Center.**

部局名：**The Department of Genetics.**

職名：**Associate Professor**

〔その他の研究協力者〕

なし

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。