

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07197

研究課題名(和文) 担がん患者における血漿遊離DNAの特性についての基礎的検討

研究課題名(英文) Basic analysis of characteristics of circulating free DNA on cancer patients

研究代表者

荒金 尚子 (Aragane, Naoko)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：20321846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：進行肺癌患者血漿より抽出したcirculating free DNA (cfDNA)では、2峰性ピーク(5Kb, 170 bp)を認め、遠隔転移例ではlong fragment cfDNA (5Kb)が多くみられた。long fragment cfDNAはextracellular vesicles (EVs)と同じ分画に存在し、short fragment cfDNA (170 bp)は100,000g遠心後の上清に認め、circulating tumor DNAが多く含まれていた。long fragment cfDNAはEVsと共存する事により分解から回避してい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

circulating tumor DNA (ctDNA)を用いたliquid biopsyは世界中で注目され2016年9月米国ではFDAで承認された。しかし、薬剤耐性化後の組織は腫瘍不均一性が高く、再生検との耐性化遺伝子変異一致率は60-70%前後である。また、遠隔転移を伴い局所進行がんでは、liquid biopsyによるctDNA検出率は依然として低い。至適治療を行うためにはliquid biopsyの診断精度の向上が望まれる。本研究の成果のより、ctDNAをより効率的に分離できればliquid biopsyの精度改善につながる。

研究成果の概要(英文)：We reported bimodal peaks of long fragment circulating free DNA (cfDNA) of 5 kb and short fragment cfDNA of 170 bp in patients with advanced lung cancer, and the amount of long fragment cfDNA is significantly higher in patients with distant metastasis. Long fragment cfDNA was found concomitant with extracellular vesicles (EVs). In human plasma samples, long fragment cfDNA was observed in the same fraction as long fraction detected from conditioned media, and short fragment cfDNA existed in the supernatant after centrifugation at 100,000g. Concentration of ctDNA in the supernatant was two times higher than that in plasma isolated by the conventional procedure. Long fragment cfDNA associated with tumor progression might therefore be released into peripheral blood, and it is possible that the long fragment cfDNA escapes degradation by co-existing with EVs. Examination of the biological characteristics of long fragment cfDNA is a logical subject of further investigation.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：circulating free DNA EGFR extracellular vesicle circulating tumor DNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 血漿遊離 DNA を用いたこれまでの研究で明らかになった事

我々はこれまで、末梢血より分離した腫瘍細胞由来血漿遊離 DNA (ctDNA) の遺伝子検索、いわゆる liquid biopsy を用いて以下のような臨床的検討を行ってきた。

- 1) 血液中に微量に存在する ctDNA を検出するため全自動高感度遺伝子変異検出系 mutation-biased PCR and quenched probe system (MBP-QP) 法を開発した (Nakamura, J Thorac Oncol, 2011, 2012)。
- 2) MBP-QP 法を用いて EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) 耐性肺がん患者血漿遊離 DNA の後方視的研究を行い、耐性化遺伝子変異 *EGFR* T790M は 53% で検出され、既報のがん組織で得られた検出頻度と同等だった (Nakamura, J Thorac Oncol, 2011)。
- 3) 多施設前向き研究を行い、EGFR-TKI 耐性化肺がん症例中 40% で ctDNA T790M 陽性であり、遠隔転移例で検出頻度が高く、検出例では予後不良であった (Sueoka-Aragane, Cancer Sci, 2015)。
- 4) 高度免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3 欠損マウス: NOJ マウス) を用いた全身転移マウスモデルを樹立し、ctDNA 量を継時的に定量した結果、総腫瘍量、転移形成と関連していた (Sueoka-Aragane, PLoS One, 2014)。

以上の結果より、**ctDNA は腫瘍進展と関連する**ことが明らかとなった。ctDNA 出現が、がん進展の結果として起こっているのか、何らかの生物活性を持ちがんの進行に参与しているのか、どちらの可能性も考えられるが、我々は後者の可能性について検討を行ってきた。そこで、まず、健常人と担がん患者の血漿遊離 DNA (正常細胞由来 DNA+ctDNA) の性状について比較検討した。

(2) 健常人と担がん状態での血漿遊離 DNA の相違

健常人でも血漿遊離 DNA は検出されるが、担がん状態でみられる血漿遊離 DNA (正常細胞由来 DNA+ctDNA) とどのような相違があるのか検討し、これまで以下の結果を得た。

- 1) 担がん状態では血漿遊離 DNA 全体量は増加する。

Quantus[®]、real-time PCR を用いて、血漿遊離 DNA 量を測定した結果、健常者と比較し担がん状態では、約 5 倍量の血漿遊離 DNA が検出された。

- 2) 担がん状態では血漿遊離 DNA サイズが健常者と比べ大きく、5Kb の DNA を認めた。170 bp 前後の DNA は健常人、担がん状態で共通に認めた。全身転移マウスモデルを用いた検討でも同様の結果であり、転移を認めたマウスでは、5Kb の DNA を検出した。

2. 研究の目的

本研究では、担がん状態で特徴的にみられるサイズの大きい DNA の臨床的意義、ctDNA 含有率を明らかにし、この DNA の単離により**検査精度が向上するか**検討する。さらに、この塩基配列、会合分子の有無など基礎的検討を行い、何らかの生物活性をもつのか、**がん進展機構に関与**しているか明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

1. 担がん患者血漿遊離 DNA で認めた 2 峰性ピークの臨床的意義 (安部、中村)

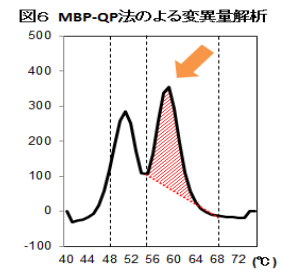
EGFR 変異を有する肺がん患者血漿遊離 DNA をバイオアナライザ[®]で解析し、2 峰性ピーク (5Kb, 170 bp) を確認する。

2 峰性ピークを各々面積解析する事により、各ピークの DNA 量を検討する。

の DNA 量が臨床病期、転移形式、EGFR-TKI 耐性化などの臨床情報と相関するか検討し、どちらのピークががん進展に関与しているか検討する。

2. 担がん患者血漿遊離 DNA で認めた 2 峰性ピークの DNA 単離と ctDNA 含有率の比較 (中島、佐藤)

1. の DNA を Blue Pippin[®] で fractionation し、各ピークの DNA を単離する。EGFR 変異量を MBP-QP 法で面積解析し (図網掛け) 腫瘍由来 DNA (ctDNA) の含有量を比較し、どちらのピークに多く含まれているか検討する。



3. 単ピーク DNA の解析により、ctDNA 変異解析精度が向上するか (中村、中島)

治療前組織で EGFR 活性型変異が確認された症例を対象に、2. の解析で ctDNA 含有量の多いピークを抽出する。抽出した DNA を用いて MBP-QP 法により EGFR 変異の検出率を解析し、血漿遊離 DNA 全量を用いた検出率と比較する。

第 1 世代、第 2 世代 EGFR-TKI 耐性化症例での EGFR T790M、第 3 世代耐性化例での EGFR C797S, BRAF V600E, KRAS 変異を MBP-QP 法で同定し、と同様に単ピークより単離した DNA と全血漿 DNA とで検出率を比較する。

4. 2 峰性ピークの各 DNA の塩基配列、会合分子の同定 (佐藤、中島、松井)

各ピークの DNA を用いてライブラリーを作成し、Exon targeting new generation sequencing で各ピークの塩基配列の解析を行う。

上記で示した 2 峰性ピークのうち 170 bp の DNA は apoptosis 由来である事が推測されるが、5-7 Kb の DNA については分解を回避する会合分子の存在の可能性を考えた。

で検索した各ピークの DNA 配列を元に、会合分子を単離する。FG ビーズ[®] に各 DNA を連結し、肺がん患者血漿、健常人血漿を混和し、結合蛋白を電気泳動で比較する。患者血漿で特異的に認める蛋白を切り出し、アミノ酸配列を決定する。

5. 2 峰性ピークの各 DNA および会合分子ががん進展に関与するか (佐藤、中島)

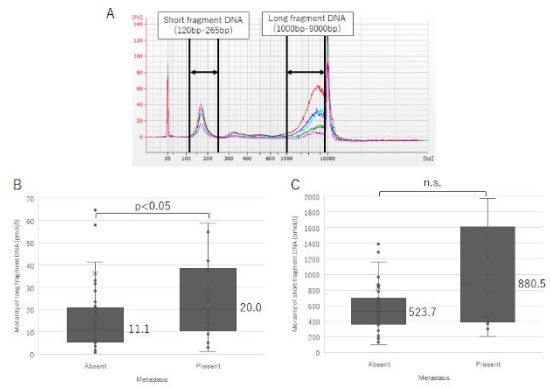
ヒト肺がん細胞株 H1975 (EGFR 変異有) H226B (EGFR 変異無) に 2, 4 で単離した 2 峰性ピークの DNA、会合分子をそれぞれ添加しがん細胞浸潤能に対する効果を *in vitro* invasion assay を用いて検討する。

と同様に 2 峰性ピークの DNA、会合分子の転移に及ぼす効果を、全身転移マウスモデルを用いて検討する。これまでの検討で、NOJ マウスに の肺がん細胞株を皮下に移植すると、H1975 はリンパ節優位に、H226B は肺内優位に転移を及ぼす事を明らかにしているため、それぞれの転移に対する効果を検討する。

4. 研究成果

1. 担がん患者 ctDNA で認めた二峰性ピークの臨床的意義

肺がん患者 ctDNA は、long fragment (5 Kb) short fragment (170 bp) の二峰性ピークが見られた。治療前肺がん症例 92 名、呼吸器良性疾病症例 18 名、健常人 20 名の血漿遊離 DNA について検討した。全 DNA 濃度は肺がん患者で優位に高く、病期の進行に従い上昇傾向だった。特に遠隔転移を有する症例で優位に高値を示した。腫瘍由来 DNA が両方の fragment で存在する事を確認した。

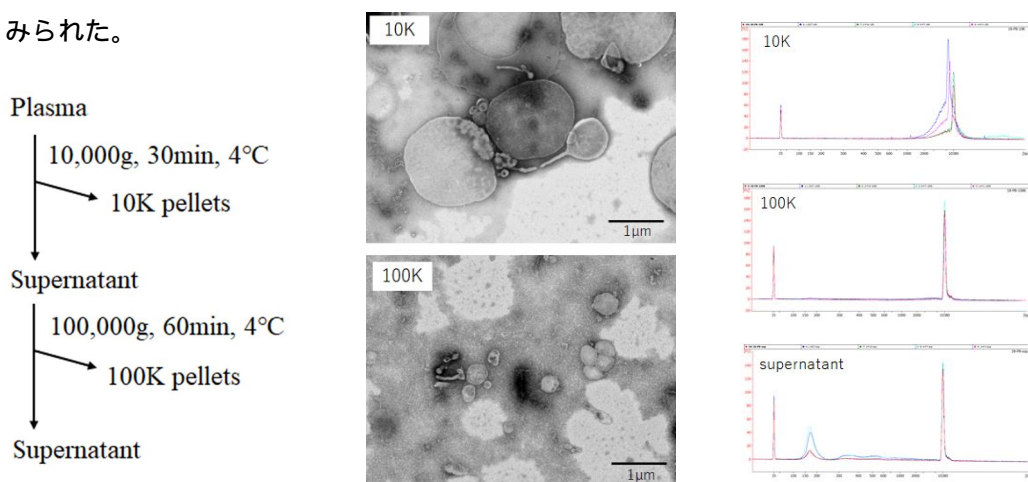


2 . 2 峰性ピークの各 DNA の塩基配列、会合分子の同定

long fragment、short fragment の DNA を各々抽出し、次世代シーケンス解析の外注解析を行った。進行肺がん患者と共にコントロールとして健常人血漿遊離 DNA も同時に検査に供した。long fragment、short fragment の塩基配列は、各々の fragment 特異性はみられなかった。

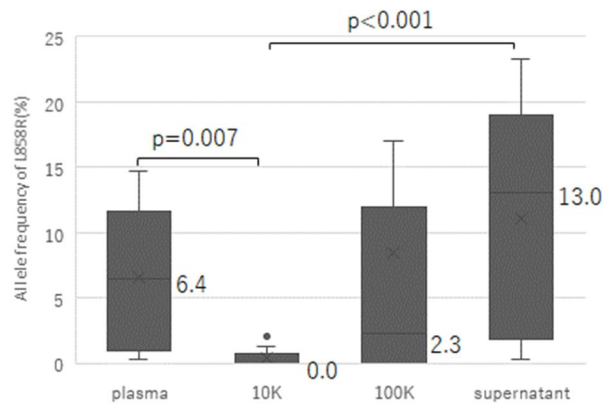
3 . Long fragment の存在部位、extracellular vesicle(EV) との関連について

long fragment、short fragment 両方から ctDNA を検出する事が明らかになったため、単ピーク DNA 検出により変異解析精度の向上は見込めないと考え、この 2 つのサイズの異なる ctDNA の起源、生物学的活性の有無について検討する事とした。始めに Long fragment の存在機序について、DNaseI、DNase1L3 の量と long fragment の相関について検討したが、相関は見られなかった。次に、EV に内包ないしは結合により long fragment が保護されている可能性について検討した。段階的遠心分離により肺癌患者血漿から long fragment、short fragment 分画を同定する事ができた。同様の遠心条件により肺癌細胞株上清を遠心分離し long fragment が存在する分画を透過電子顕微鏡で観察すると extracellular vesicle (EV) を認めた。この分画で認めた EV はと 1μm 前後の large EV であり、WB での所見と合わせ oncosome と考えた。一方、exosome と考えられる small EV 分画では long fragment はほとんど同定できなかった。short fragment は超遠心後の上清に多くみられた。



4 . ctDNA の分布

上記の分離方法により得られた画分中、circulating tumor DNA (ctDNA)がどの画分に多く存在するか検討した。ctDNAはEGFR L858Rの存在により判定した。EGFR L858Rを有する肺癌症例から血漿を採取し、遠心分離により上記に分画しL858Rアレル頻度を測定した。L858Rはoncosome分画にはほとんど認めず、small EV分画、さらに最終上清成分に多く含まれていた。最終上清成分にはshort fragmentが多く含まれていた。以上の検討より、long fragmentはoncosomeと共存する事によりDNAの分解を回避しており、がんの進展、転移に何等かの貴構でかかわっている。一方、高純度のctDNA抽出にはEV分画を除いたshort fragmentが多く含む最終上清成分を抽出する必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 1.Nakamura T, Nakashima C, Komiya K, Kitera K, Hirai M, Kimura S, Aragane N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanisms of acquired resistance to afatinib clarified with liquid biopsy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0209384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pone.0209384.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 2.Uchibori K, Satouchi M, Sueoka-Aragane N, Urata Y, Sato A, Imamura F, Inoue T, Tachihara M, Kobayashi K, Katakami N, Kokan C, Hirashima T, Iwanaga K, Mori M, Aoe K, Morita S, Negoro S	4. 巻 124
2. 論文標題 Phase II trial of gefitinib plus pemetrexed after relapse using first-line gefitinib in patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR gene mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 65-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.lungcan.2018.07.031.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 3.Sato A, Nakashima C, Abe T, Kato J, Hirai M, Nakamura T, Komiya K, Kimura S, Sueoka E, Sueoka-Aragane N	4. 巻 9
2. 論文標題 Investigation of appropriate pre-analytical procedure for circulating free DNA from liquid biopsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31904-31914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.18632/oncotarget.25881.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 4.Nakashima C, Sato A, Abe T, Kato J, Hirai M, Nakamura T, Komiya K, Sueoka E, Kimura S, Sueoka-Aragane N	4. 巻 9
2. 論文標題 Automated DNA extraction using cellulose magnetic beads can improve EGFR point mutation detection with liquid biopsy by efficiently recovering short and long DNA fragments	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 25181-25192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.18632/oncotarget.25388.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 5.Komiya K, Nakashima C, Nakamura T, Hirakawa H, Abe T, Ogusu S, Takahashi K, Takeda Y, Egashira Y, Kimura S, Sueoka-Aragane N	4. 巻 38
2. 論文標題 Current Status and Problems of T790M Detection, a Molecular Biomarker of Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors, with Liquid Biopsy and Re-biopsy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 3559-3566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.21873/anticancerres.12628.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計18件(うち招待講演 5件/うち国際学会 8件)

1. 発表者名 1.Tomonori Abe, Chiho Nakashima, Akemi Sato, Eisaburo Sueoka, Shinya Kimura, Naoko Aragane.
2. 発表標題 Characteristics of cell free DNA in lung cancer patients.
3. 学会等名 IASLC 18th WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 2.安部友範、中島千穂、渡邊直美、佐藤明美、木村晋也、荒金尚子
2. 発表標題 肺がん患者における血漿遊離DNAの特性.
3. 学会等名 第58回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 3.中島千穂、安部友範、木村晋也、荒金尚子
2. 発表標題 Liquid biopsyにおける適切なpre-analytical procedureとは何か.
3. 学会等名 第58回日本肺癌学会学術集会.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 4. 荒金尚子
2. 発表標題 Liquid biopsyの課題と展望
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会九州地区セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 5. Nakashima C, Abe T, Sato A, Nakamura T, Komiya K, Sueoka E, Kimura K, Sueoka-Aragane N.
2. 発表標題 Investigation of origin of circulating free DNA: Is exosomal DNA the carrier?
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 7. 中島千穂、安部友範、木村晋也、荒金尚子
2. 発表標題 Liquid biopsyにおける適切なpre-analytical procedureとは何か
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 8. Aragane N
2. 発表標題 Circulating tumor DNA and tumor progression
3. 学会等名 Anti-Cancer Treatment Japan,（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 9.Aragane N
2. 発表標題 Circulating tumor DNA and tumor progression
3. 学会等名 The 14th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 10.Tomonori Abe, Chiho Nakashima, Naomi Watanabe, Akemi Sato, Eisaburo Sueoka, Shinya Kimura, Naoko Aragane.
2. 発表標題 Characteristics of cell free DNA in lung cancer patients.
3. 学会等名 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 11.Chiho Nakashima, Tomonori Abe, Akemi Sato, Eisaburo Sueoka, Shinya Kimura, Naoko Aragane.
2. 発表標題 DNA extraction method using cellulose magnetic beads can improve the EGFR mutation detection rate.
3. 学会等名 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 12.安部友範、中島千穂、渡邊直美、佐藤明美、木村晋也、荒金尚子
2. 発表標題 肺がん患者における血漿遊離DNAの特性
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 13. 中島千穂、安部友範、木村晋也、荒金尚子.
2. 発表標題 Liquid biopsyにおける適切なpre-analytical procedureとは何か
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 14. 荒金尚子
2. 発表標題 肺癌診断におけるリキッドバイオプシーupdate
3. 学会等名 日本臨床生理学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 15. 安部友範、中島千穂、荒金尚子
2. 発表標題 肺がん患者における血漿遊離DNAの特性
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 16. Abe T, Nakashima C, Sato A, Harada Y, Sueoka E, Kimura K, Sueoka-Aragane N.
2. 発表標題 Characteristics of circulating tumor DNA in lung cancer patients
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 17. 荒金尚子
2. 発表標題 リキッドバイオプシーにおける検体保管とパネル検査
3. 学会等名 第5回クリニカルバイオバンク学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 18. Abe T, Nakashima C, Sato A, Harada Y, Sueoka E, Kimura K, Sueoka-Aragane N.
2. 発表標題 How does circulating tumor DNA exist in peripheral blood?
3. 学会等名 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 19. 安部友範、中島千穂、佐藤明美、末岡栄三朗、木村晋也、荒金尚子
2. 発表標題 肺がん患者における血漿遊離DNAの生物学的特性の検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 荒金尚子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 5
3. 書名 呼吸器疾患 診断治療アプローチ	

1. 著者名 荒金尚子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 呼吸器内科	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 明美 (Sato Akemi) (20568357)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	
研究分担者	中村 朝美 (Nakamura Tomomi) (90457490)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	
研究協力者	中島 千穂 (Nakasima Chiho)	佐賀大学 (17201)	
研究協力者	安部 友範 (Abe Tomonori)	佐賀大学 (17201)	