

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03814

研究課題名(和文) 血中遊離DNA解析を応用した前立腺癌のDNA修復遺伝子異常の生物学的特性の解明

研究課題名(英文) Elucidating biological characteristics of DNA repair gene mutations in prostate cancer utilizing cell-free DNA analysis

研究代表者

赤松 秀輔 (Akamatsu, Shusuke)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20767248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が独自に開発した血中遊離DNA(cfDNA)の高感度捕捉法 eVIDENCEを用いて去勢抵抗性前立腺癌患者のcfDNA100症例を解析した。その結果、腫瘍由来cfDNA割合2%未満の症例においてもATM、BRCA2、TP53の病的変異が同定され、これらの遺伝子異常は予後の予測因子であり、cfDNAの低頻度変異検出の重要性を示した。一方、DNA修復遺伝子異常を反映した細胞株を作成したが増殖能は遅く、細胞株ではBRCA paradoxは克服できなかった。しかしDNA修復遺伝子異常を有する患者検体より患者由来ゼノグラフトを作成することで、臨床像を反映した治療開発に有用な実験モデルを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)患者由来cfDNAにおける低頻度変異検出の臨床的有用性を示したことで、現行のがんゲノム医療においてcfDNA検査を行う場合に低頻度変異にも着目すべきことが判明し、より多くの患者ががんゲノム医療で恩恵を受けられることがわかった。さらにCRPCのDNA修復遺伝子異常を反映した細胞株、患者由来ゼノグラフトを作成した。世界的にも貴重な実験系であり、DNA修復遺伝子異常の中でもPARP阻害薬に抵抗性を示すATMやCDK12変異前立腺癌の治療開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 100 cases of cell-free DNA (cfDNA) derived from patients with castration-resistant prostate cancer by using our innovative technique, eVIDENCE, an analytic pipeline specifically designed for the detection of circulating tumor DNA (ctDNA) using molecular barcodes. The results showed that deleterious ATM, BRCA2, and TP53 variants were identified even in cases with less than 2% ctDNA fraction, and that these genetic abnormalities are prognostic factors, suggesting the importance of detecting low-frequency variants in cfDNA.

We also generated cell lines to replicate DNA repair gene abnormalities, however, their proliferation was suppressed in contrast to clinical behavior. This phenomenon, BRCA paradox, could not be solved. Nevertheless, we successfully established patient-derived xenografts using specimens obtained from patients with DNA repair gene mutations, which mirrored clinical behavior and allowed interrogation of novel therapeutic targets using pre-clinical models.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 血中遊離DNA 相同組み換え修復関連遺伝子 DNA修復遺伝子 BRCA ATM CDK12

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌はアンドロゲン受容体(AR)経路に依存して増殖し、転移性前立腺癌ではアンドロゲン除去療法が標準治療である。しかし大半がいずれ治療抵抗性を獲得し去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)となる。CRPC となっても多様な機序で AR 経路に依存する(Kita Y, Akamatsu S, Cancers. 2018)ため、AR 経路をさらに強力に抑制する新規 AR 経路標的薬(ARAT) や化学療法薬が投与されるが、やがて無効となり診断から平均 6 年程度で死に至る(Akamatsu S, Eur Urol Oncol. 2019)。近年、BRCA1/2 や ATM など、乳癌、卵巣癌、膵癌の発症と関連する DNA 修復遺伝子の生殖細胞系列異常が、前立腺癌患者の 10%程度で見られることが報告された。さらに、前立腺癌では DNA 修復遺伝子異常が体細胞レベルでも生じ、治療経過中に異常が蓄積し、CRPC では生殖細胞系列、体細胞を含めると 25%程度で異常が認められる。

DNA 修復遺伝子異常がある前立腺癌はポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害薬に対して高感受性を示し、PARP 阻害剤は CRPC に対する新規治療として最も注目されている(Mateo J, N Engl J Med. 2015)。DNA 修復遺伝子異常のある状況で PARP 阻害剤が奏功する機序として合成致死が唱えられているが、前立腺癌では臨床的に薬剤が奏功するために DNA 修復遺伝子の片アレルの異常で十分なのか、対立アレル異常によるヘテロ接合性の喪失(LOH)が必要なのか、生殖細胞系列と体細胞の異常で効果が異なるかなどは未解明で(Christenson E, Expert Opin Emerg Drugs. 2018)、治療経過中のどの時期に PARP 阻害剤を投与すべきか全く不明である。また、BRCA2 異常と ATM や CDK12 異常のある患者では PARP 阻害剤の奏成功率が異なる(Mateo J, J Clin Oncol. 2019)が機序は不明である。興味深いことに、細胞株やマウスでは BRCA1/2 の完全な喪失は致死性であるのに対し、臨床的には LOH のある前立腺癌は非常に悪性度が高い(BRCA paradox)。BRCA paradox の一部は p53 経路を含む細胞周期チェックポイント機構の機能不全で説明される(Evers B, Oncogene 2006)が、臨床検体では CRPC のゲノムは治療とともに変化するため、DNA 修復遺伝子異常と TP53 や RB1 を始めとした細胞周期チェックポイント関連遺伝子異常がどのように生じているか詳細は不明である。臨床検体と細胞実験の乖離を埋め、分子生物学的に臨床的課題を解決するには治療中の遺伝子変化をタイムリーに捉え、それを反映した細胞モデルを作成して BRCA paradox を克服する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

我々は DNA 修復遺伝子研究における細胞実験と臨床事象の乖離という障壁を乗り越えるため、患者検体(血中遊離 DNA: cfDNA)の縦断的ゲノム解析と細胞モデルによる分子細胞学的実験を組み合わせた双方向アプローチを発想した。本研究の目的は、独自に開発した最新の cfDNA 解析法による臨床検体の縦断的な体細胞異常の追跡と遺伝子改変技術を用いることで臨床事象を再現できる実験モデルを樹立し、これを用いて前立腺癌における DNA 修復遺伝子異常の生物学的意義を解明し、新たな治療戦略を構築することである。

3. 研究の方法

(1)CRPC 患者 cfDNA の縦断的遺伝子異常の解析

ベースライン解析

まず CRPC に対する一次治療として ARAT または化学療法を開始する 100 症例を対象とし、血球 DNA と cfDNA を採取する。ベースラインで何らかの HDR 関連遺伝子異常(片アレル/両アレル、生殖細胞系列/体細胞を問わない)が検出された患者では、経過中に薬剤抵抗性となる度に cfDNA を採取する。低頻度変異を正確に検出するために cfDNA に分子バーコードを付加し、転移性前立腺癌で異常が報告されている 88 遺伝子からなる独自に作成した前立腺癌専用ターゲットパネルを用いて DNA キャプチャーし、NGS シーケンスを行う。申請者らが構築した cfDNA 低頻度アレル変異検出パイプライン eVIDENCE により変異の同定およびコピー数解析を行う。また、コントロールとして各患者の血球 DNA もシーケンスし、生殖細胞系列の異常を検出する。

経時的解析

治療抵抗性となるたびに経時的に採取した cfDNA を解析し遺伝子変化および遺伝子変異量の評価を行う。遺伝子変異量の有意な増加と関連する遺伝子変化について検討する。

(2)臨床における遺伝子異常を再現した細胞株など実験モデルの作成

BRCA2、ATM、CDK12 をそれぞれノックアウト(KO)した LNCaP 細胞株を CRISPR/Cas9 の手法で作成する。上記細胞株に対して候補とした遺伝子異常を shRNA や CRISPR/Cas9 を用いて導入する。樹立された細胞株に臨床に類似した負荷としてアンドロゲン除去や ARAT の投与のほか、高濃度アンドロゲン投与による AR 経路の活性化を行い、DNA 二重鎖切断の修復に異常が生じるかを H2AX の免疫染色で確認する。FACS で細胞周期、western blotting(WB)で DNA 修復経路を評価し、細胞株の機能的解析を行う。そして in vitro および、樹立細胞株をマウスの皮下に移植した in vivo モデルでも細胞増殖の変化を観察する。細胞株が臨床像を反映しない場合は CRPC 患者由来ゼノグラフト(PDX)を用いる。

(3)樹立した実験モデルによる新規治療開発を目指した投薬実験

上記実験結果の解析を行い、DNA 修復遺伝子異常の治療抵抗性に関わるメカニズムを解明する。解明したメカニズムに基づき、治療抵抗性を克服する可能性のある既存の薬剤を探索し、投薬実験を行う。

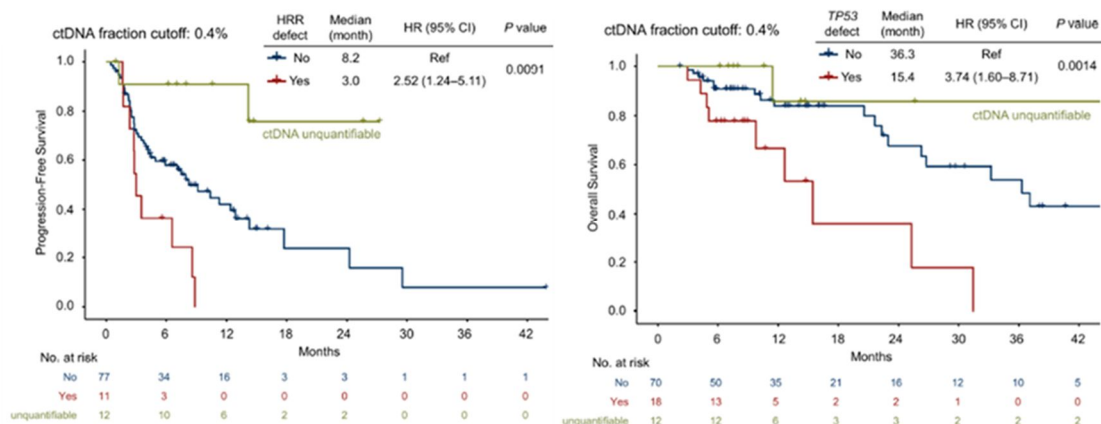
4. 研究成果

(1) CRPC 患者 cfDNA の縦断的遺伝子異常の解析

ベースライン解析

CRPC 患者由来 cfDNA における低頻度変異検出とその臨床的有用性を明らかにするため、CRPC 患者 100 名から採取した cfDNA と白血球 DNA から、VAF 0.1%以上の ctDNA 変異を検出した。その結果、ctDNA 割合 2%未満の症例においても ATM、BRCA2、TP53 の病的変異を認め、これらの遺伝子異常は無増悪生存期間または全生存期間の独立した予後因子であった(図 1)。さらに cfDNA と白血球 DNA で重複する遺伝子変異から clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP)に関連する DNA 修復遺伝子変異を検出し、白血球 DNA の情報を用いなければ誤った PARP 阻害薬投与がなされうる症例を複数同定した。以上から、CRPC において臨床的に有用な ctDNA 変異を同定する上で、cfDNA の低頻度変異検出は重要であることを示した。また、cfDNA と同時に同一患者由来白血球 DNA を解析することは、CHIP 関連変異を除外し不適切な薬剤投与を避けるために必要不可欠であることを示し、以上の成果を論文で報告した(Mizuno K, Clin Cancer Res. 2021)。

図 1



経時的解析

新規 AR 経路阻害剤(ARPI)投与前および ARPI 耐性獲得後の 2 点で経時的に採取した 14 症例の cfDNA の遺伝子変異プロファイルと比較した。結果は変異プロファイルが大きく異なっており、原因として cfDNA 採取の間隔が長く治療過程で腫瘍を構成するクローンが大きく変わってしまった可能性や、1 回目と 2 回目のシーケンスカパレッジの差が比較的大きく、両者間での変異の検出力が異なっていた可能性が考えられた。

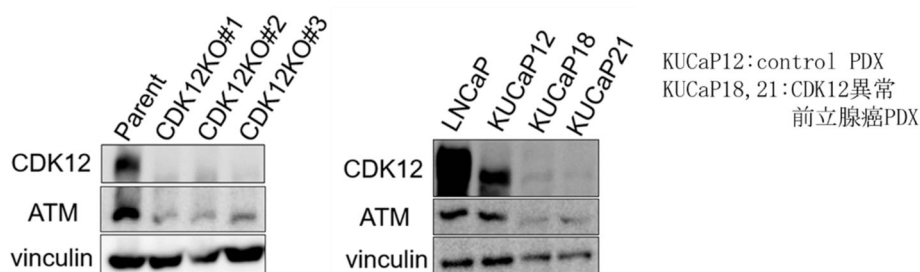
(2)臨床における遺伝子異常を再現した細胞株など実験モデルの作成

BRCA2、ATM、CDK12 をそれぞれノックアウト (KO) した LNCaP 細胞株を CRISPR/Cas9 の手法で作成した。この中でも CDK12 に焦点をあて研究したが増殖能については in vitro, in vivo とともに低下を示し BRCA paradox を示した。続いて細胞周期や DNA 修復経路の機能解析を行ったところ、WB において ATM の発現が低下していた(図 2)。

一方、我々は CDK12 異常前立腺癌から 2 系統の PDX 樹立に成功した。この CDK12 変異を有する PDX2 系統はともに高い増殖能と去勢抵抗性を有し、CDK12 変異 CRPC の臨床像を良く反映していた。さらに PDX でも WB において細胞株と同様に ATM の発現低下を認めた(図 3)。そして ATM 変異がある CRPC で合成致死を示すことが報告されている PARP 阻害剤と ATR 阻害剤の投与実験を行ったところ、CDK12 変異がない PDX では単剤、併用いずれも腫瘍増殖抑制を示さないのに対し、CDK12 変異がある PDX ではいずれも併用にて腫瘍増殖抑制と DNA 二重鎖切断の蓄積を認めた。CDK12 変異がある CRPC に対する新たな治療戦略として PARP 阻害剤、ATR 阻害剤の併用が有用であることが示され特許出願を行った(特願 2022-064803)。

図 2

図 3



今後の展望

- ・ 今後は cfDNA の遺伝子プロファイルの経時的な変化の解析をさらに進めて、cfDNA を用いて CRPC の進展の機序の解明にも応用する。
- ・ 臨床的に CDK12 変異前立腺癌にて PARP 阻害薬と ATR 阻害薬の併用投与が効果を示すか臨床試験を立案する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kei Mizuno	4. 巻 28
2. 論文標題 Clinical Impact of Detecting Low-Frequency Variants in Cell-Free DNA on Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6164-6173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-21-2328.	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上山 裕樹
2. 発表標題 The combination of CDK12 KO and TP53 KD may not mimic aggressive phenotype seen in clinical CDK12 LOF prostate cancer.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上山 裕樹
2. 発表標題 CDK12KO前立腺癌細胞株は増殖能低下を示す
3. 学会等名 第109回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 博子
2. 発表標題 Frequency of cancer-predisposing genes in advance Japanese prostate cancer patients and their clinical implications
3. 学会等名 第109回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野 桂
2. 発表標題 Genomic landscape of metastatic hormone-naive prostate cancer
3. 学会等名 第79回 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上山 裕樹
2. 発表標題 CDK12 null prostate cancer cell line LNCaP shows reduced growth potential
3. 学会等名 第79回 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 博子
2. 発表標題 Analysis of genetic rare variants in Japanese advanced prostate cancer patients.
3. 学会等名 第79回 日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水野 桂
2. 発表標題 eVIDENCE を用いた去勢抵抗性前立腺癌患者由来 cell-free DNA の解析
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野 桂、赤松 秀輔
2. 発表標題 去勢抵抗性前立腺癌患者由来cell-free DNAの経時的解析
3. 学会等名 第7回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 CDK12遺伝子異常を有する前立腺癌の治療薬セット	発明者 赤松秀輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-064803	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	澤田 篤郎 (Sawada Atsuro) (10784796)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	
研究分担者	小川 修 (Ogawa Osamu) (90260611)	京都大学・医学研究科・名誉教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------