

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20846

研究課題名（和文）血漿中のcell-free RNAを用いた高感度融合遺伝子解析による新規がん診断

研究課題名（英文）Novel cancer diagnosis by highly sensitive fusion gene analysis using cell-free RNA in plasma

研究代表者

長谷川 延彦（Hasegawa, Nobuhiko）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70909192

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、現在まで困難とされている「がん患者血液検体を用いての融合遺伝子同定」について腫瘍組織診断と同等、またはそれ以上の精度で同定を進めることで、肺がんや骨軟部腫瘍を含む全がん的な予後改善を目的としている。この問題の解決に向けて、血漿中のcell-free RNA (cfRNA)を用いて融合遺伝子解析のプロトコル構築と肺がん、骨軟部腫瘍における臨床的有用性を検討した。一連のプロトコルの検証を行い、cfRNAから簡便な融合遺伝子の同定法を確立した。また、実臨床サンプルから融合遺伝子を同定し、非小細胞肺がん、ユーイング肉腫に対して低侵襲での診断、病勢評価の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cfRNA解析を用いた融合遺伝子同定手法は、現在までに確立されておらず、現状のDNAベースの解析では有効な治療標的、組織診断に用いられる融合遺伝子の同定率は十分ではない。今回のcfRNAを用いた解析手法を用いて、血液検体からの肺がん、骨軟部腫瘍の融合遺伝子高感度解析により低侵襲での早期診断・治療モニタリングの可能性を得た。組織生検が困難な肺がん患者に対して、血液よりALK、ROS1、RET等の融合遺伝子を同定することができれば、適切な分子標的治療薬を用いることができる。また、早期診断、病勢に応じての早期の治療介入によって、肺がんや骨軟部腫瘍患者の予後改善に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to improve the prognosis of all cancers, including lung cancer and bone and soft tissue tumors, by identifying fusion genes using blood samples from cancer patients, which has been difficult to do to date, with an accuracy equal to or greater than that of tumor tissue diagnosis. To solve this problem, we developed a protocol for fusion gene analysis using cell-free RNA (cfRNA) in plasma and examined its clinical usefulness in lung cancer and bone and soft tissue tumors. We verified a series of protocols and established a simple method for identifying fusion genes from cfRNA. We also identified fusion genes from actual clinical samples and found the possibility of minimally invasive diagnosis and disease evaluation for non-small cell lung cancer and Ewing's sarcoma.

研究分野：整形外科学

キーワード：cell free RNA 融合遺伝子 肺がん 骨軟部腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんにおいては ALK, ROS1, RET など治療標的となる Tyrosine kinase(TK)融合遺伝子が多数存在することが次世代シーケンサー(NGS)の開発によって解明され、それらに一致した極めて奏効性の高い TK 阻害剤の開発も伴って、肺がん患者の生命予後は著しく改善されることとなった。また、NGS が検査として臨床応用されたがんクリニカルシーケンス検査の開発により癌種横断的に TK 融合遺伝子 (ALK, ROS1, RET, NTRK 等) が数多く同定され、がん治療のブレークスルーとされている。一方で、「希少がん」の骨軟部腫瘍においては診断の基準となる「組織特異的」な融合遺伝子が約 30%存在し、分子病理学的視点より旧来より注目されているがその役割は未だ判明はされていない。

「融合遺伝子の検査の問題」として、肺がんにおいては肺組織よりの生検におけるサンプル量の少なさより、コンパニオン診断に至らず治療恩恵を得られない症例が多数散見され、また侵襲的な組織生検によりがんの播種リスク(胆管癌、膵癌)も指摘されている事実もある。骨軟部腫瘍においては、その分子病理学的解析の行き詰まりより、その血中動態の観察が大きなブレークスルーの鍵ともされている。腫瘍組織診断と同等またはそれ以上の高感度での融合遺伝子の血液解析検査の開発は待ち望まれているが、「いわゆるリキッドバイオプシー」は血漿中の DNA ベースの検索でありその融合遺伝子よりの同定率は極めて低い。そのために融合遺伝子同定に有利である RNA ベースの解析は待ち望まれるが現在までに確立されていない。「がん患部における特定前に血液でがんを発見する」というがん診断にとって、本研究は、核心的な課題の解決となると同時に癌種横断的かつ迅速な患者救済に大きく貢献する可能性がある。

2. 研究の目的

患者の腫瘍検体から抽出した DNA、RNA では、生検による腫瘍検体が常に NGS 解析に足りうる十分量が得られるわけではない。これまで血漿中の cfDNA (DNA ベース) による探索が大腸がん、肺がんなどで遺伝子変異解析が行われ一定の成果を得ているが、DNA ベースでの探索による融合遺伝子解析に関しては、現在までに分析的妥当性と臨床的有用性は大きく疑問が残っており、その解析方法(高感度法)は確立されていない。本研究は現在まで困難とされている「がん患者血液検体の cell-free-RNA(cfRNA)を用いた融合遺伝子同定」を腫瘍組織診断と同等、またはそれ以上の精度で同定を進め、適切な診断、病勢評価を行うことによる早期治療介入によって、肺がんや骨軟部腫瘍における予後改善を目的とする。

3. 研究の方法

(1)cfRNA を用いた解析プロトコール開発

cfRNA 融合遺伝子解析フローの構築: cfRNA より、効率の良い cDNA 合成方法、核酸抽出方法を比較し、肺がん、肉腫のオリジナルプライマーを使用し、NGS 解析を行う手法を確立する。

cfRNA 融合遺伝子解析の分析的妥当性評価: 全血 10ml に融合遺伝子を含む RNA 標準品を用い、コピー数を 1 桁コピーまで段階希釈・スパイクした検体で、cfRNA 抽出からサンガーシーケンスの一連解析プロトコールを評価する。

(2)肺がん・骨軟部腫瘍患者を用いた融合遺伝子解析の臨床的妥当性評価を行う。

cfRNA 融合遺伝子解析の臨床的妥当性の有用性の評価: 腫瘍部で ALK, ROS1, RET の診断または組織特異的な融合遺伝子をもつ肺がん、骨軟部腫瘍患者の血液検体の融合遺伝子解析を試みる。検体採取は初診時から 3 ヶ月程度に行い、診断時と治療前後での病勢との一致率の評価を行う。

4. 研究成果

(1)cfRNA を用いた解析プロトコール開発

cfRNA を用いた融合遺伝子解析の感度は、cfRNA の収量と cDNA 合成の効率に依存する。感度を最大化するため、cfRNA の抽出から NGS 解析までの全プロセスを最適化した。ライブラリー調製には、特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR のアンプリコンベースの手法を用いた。cDNA 合成には、RT-RamDA (Reverse Transcription with random displacement amplification) を使用。RT-RamDA は逆転写酵素の鎖置換活性を利用した cDNA 増幅方法であり、微量の RNA から poly(A) RNA、non-poly(A)由来の cDNA の高感度な検出が可能であり、今回の cDNA 合成手法として使用した。標準 RNA 品 (EML4-ALK 融合遺伝子を含む) を段階希釈し、一桁コピーの EML4-ALK 融合遺伝子を検出することに成功した(図 1)。次に cfRNA の核酸抽出について検討した。MagMAX Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit (以下、Kit A)(Thermo Fisher Scientific) と Quick-cfRNA Serum and Plasma Kit (以下、Kit B)(Zymo Research) を比較した。キット A は核酸の精製に磁気ビーズを使用し、キット B はスピンカラムを使用する。

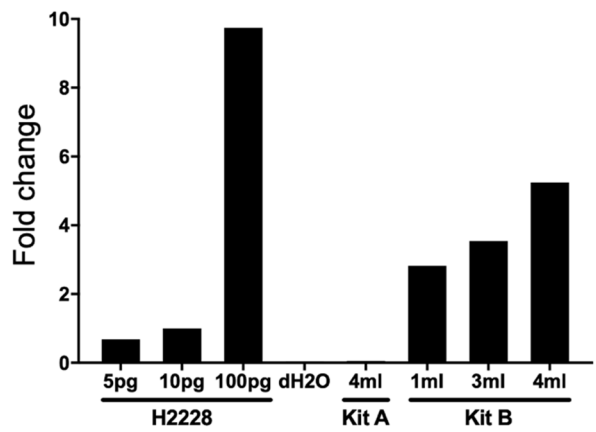
図 1 EML4-ALK 融合遺伝子を増幅する primer を設計。PCR 増幅し、融合遺伝子の cDNA 合成の効率を評価。

- 1: 182 copies
- 2: 91 copies
- 3: 46 copies
- 4: 23 copies
- 5: 12 copies
- 6: 6 copies
- 7: 3 copies
- 8: DDW



健康なボランティアから採取した 4mL の血漿を用いてパイロット試験が行われた。各キットで cfRNA を抽出し、RT-RamDA 法で cDNA に変換した。リアルタイム PCR を用いて、GAPDH の mRNA 発現を定量した (図 2)。コントロールとして、ヒト肺がん H2228 細胞から抽出した RNA を調製した。キット B で抽出した GAPDH mRNA の発現量は、キット A で抽出した量と比較して多かった。キット B を用いて 1ml 血漿から抽出した cfRNA は、H2228 の全 RNA の 10pg 以上に相当した。cfRNA のアンプリコンベースの解析の中心となる、cDNA 合成手法と cfRNA 抽出法を決定した。

図 2 cfRNA の回収方法を比較。



(2) 肺がん・骨軟部腫瘍患者を用いた融合遺伝子解析の臨床的妥当性評価を行う。
 実際の臨床サンプルを用いて、確立したプロトコルを用いて、融合遺伝子を同定できるかの検証を行った。未治療または PD の判定となった融合遺伝子陽性の 9 例の肺がん患者で cfRNA と cfDNA の比較実験を行った。cfRNA で 78%, cfDNA では 33% と cfRNA での融合遺伝子同定が高い精度を示した。ROS1 融合体の検出感度は、cfRNA を用いたアッセイで 100% (2/2)、cfDNA を用いたアッセイで 0% (0/2) であった。cfDNA ベースのアッセイで同定されたすべての融合遺伝子は、cfRNA ベースのアッセイでも同定された。また、治療経過をおった ROS1 陽性肺がん症例にて、クリゾチニブによる一次治療後に PD に進行した際に、cfRNA ベースのアッセイでのみ EZR-ROS1 が検出され、cfDNA と比較し、cfRNA の優位性と病勢に反映した解析手法の可能性が示された。このプロトコルを用いて、未治療のユーイング肉腫においても、ユーイング肉腫に特徴的な EWSR1-FLY1 融合遺伝子を同定することができた。また、治療の奏功、病状の増悪に反映し、cfRNA より融合遺伝子を検出した (図 3)。cfRNA を用いた融合遺伝子解析プロトコルを構築し、非小細胞肺がん、ユーイング肉腫に対して低侵襲での診断、病勢評価の可能性を見出した。

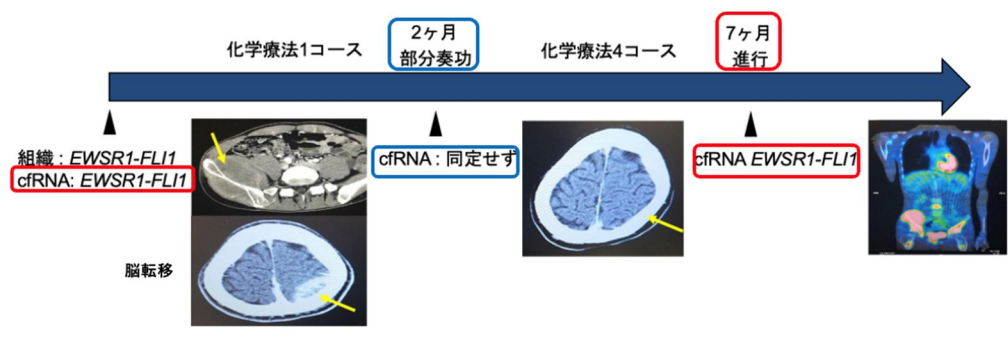


図 3 骨盤内ユーイング肉腫。化学療法にて脳転移縮小も再度増悪。病状の改善、増悪に合わせて血中の融合遺伝子同定も変化。

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 Hasegawa Nobuhiko, Kohsaka Shinji, Kurokawa Kana, Shinno Yuki, Takeda Nakamura Ikuko, Ueno Toshihide, Kojima Shinya, Kawazu Masahito, Suehara Yoshiyuki, Ishijima Muneaki, Goto Yasushi, Kojima Yuki, Yonemori Kan, Hayashi Takuo, Saito Tsuyoshi, Shukuya Takehito, Takahashi Fumiyouki, Takahashi Kazuhisa, Mano Hiroyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Highly sensitive fusion detection using plasma cell free RNA in non small cell lung cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4393 ~ 4403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15084	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 延彦, 高阪 真路, 岩田 慎太郎, 川井 章, 齋藤 剛, 佐々 恵太, 窪田 大介, 末原 義之, 高木 辰哉, 間野 博行, 石島 旨章
2. 発表標題 Ewing肉腫における血漿中のcell-free RNAを用いた高感度融合遺伝子解析
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 延彦, 窪田 大介, 高木 辰哉, 齋藤 剛, 岩田 慎太郎, 川井 章, 高阪 真路, 間野 博行
2. 発表標題 ユーイング肉腫における診断・治療モニタリングツールとしての血漿中のcell-free RNAの可能性
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nobuhiko Hasegawa, Shinji Kohsaka, Ikuko Takeda Nakamura, Toshihide Ueno, Masahito Kawazu, Yoshiyuki Suehara, Yasushi Goto, Kan Yonemori, Takuo Hayashi, Fumiyouki Takahashi, Kazuhisa Takahashi, Hiroyuki Mano
2. 発表標題 Highly sensitive fusion detection using plasma cell-free RNA in non-small-cell lung cancers.
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 長谷川延彦
2. 発表標題 血漿セルフリーRNAを用いた融合遺伝子診断
3. 学会等名 第6回リキッドバイオプシー研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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

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