

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790908

研究課題名（和文） 肺癌患者における末梢血ゲノム異常細胞の解析

研究課題名（英文） Analysis of circulating genetically abnormal cells in lung cancer patients

研究代表者

松本 慎吾（MATSUMOTO SHINGO）

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・医師

研究者番号：10392341

研究成果の概要（和文）：肺癌克服のためには、適切なバイオマーカーを用いた個別化治療の発展が望まれる。進行肺癌における末梢血を用いたバイオマーカー解析の可能性を検討した。末梢血からのがん細胞の検出は困難であったが、末梢血中の腫瘍由来微量ゲノム DNA から分子マーカーの検出は可能と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Personalized medicine based on appropriate molecular biomarkers is hoped to improve prognoses of lung cancer patients. Biomarker analyses with circulating tumor cells or cell-free DNA (i.e., liquid biopsy) are quick, simple and non-invasive for advanced lung cancer patients. I established a rapidly and simultaneously detecting system of multiple genetic alterations from limited amounts of samples for efficiently selecting therapeutic populations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌、末梢血癌細胞、ゲノム異常、遺伝子変異、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍のうち肺癌は死亡率が最も高く、5年生存率が約30%という難治がんである。これまで、肺癌の薬物治療では種々の細胞障害性抗がん剤が使用されてきたが、その治療効果は、奏効率や生存率で見ると他の悪性腫瘍と比較して不十分である。現在、肺癌薬物治療は大きく小細胞肺癌と非小細胞肺癌に分けて行われているが、今後はさらに個々のがんの特性を把握した上で、適切なバイオマーカーに基づいた個別化治療の開発が望まれる。中でも、近年、種々の悪性腫瘍の治療に導入され始めた分子標的薬に対する期待は大きい。現在、有効ながん分子標的治療の開発は、がん細胞の生存あるいは増殖に寄与する活性化がん遺伝子の特異的阻害（oncogene addiction）や、がん抑制遺

伝子の不活化によって活性化された細胞内シグナル伝達経路の抑制（tumor suppressor gene hypersensitivity）などの概念に基づいて行われている。近年、肺癌領域では、上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子変異の存在と EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の感受性との相関が見出され、すでに臨床でその有用性が証明されている。我々は、この EGFR 遺伝子変異が肺腺がん形成の初期である上皮内がんから高率に存在すること、またこの遺伝子変異は肺腺がんの脳転移まで維持されることを初めて見出し、それぞれ報告している。これらのことは、個々の肺癌に対する適切なバイオマーカーと治療薬の選択により肺癌克服の可能性を示唆する結果である。しかしながら、適切なバイオマーカーを同定する際に生じる問題は、解析する検

体の採取である。外科的切除の適応とならない進行肺がんで得られるがん細胞を含む検体は、主に診断の際の生検材料であり、種々のバイオマーカーを解析するにあたり、質的、量的に制限がある。

## 2. 研究の目的

そこで、末梢循環血液中を流れるがん細胞や腫瘍由来の核酸 (DNA, RNA) が検出できれば、より低侵襲で、かつ簡便に分子生物学的解析が可能となる。従来より末梢循環血液中の上皮細胞分画にあるがん細胞が注目されてきたが、末梢血液中にはそれ以外に、より多数のがん細胞が存在する可能性がある。本研究の目的は、末梢血液中からがん細胞や腫瘍由来のゲノム DNA を検出し、それらによる分子バイオマーカー解析の可能性を探索することである。末梢血を用いたバイオマーカーの測定系が確立できれば、患者にとっては侵襲が少なく、医療者にとっては簡便であることから、今後の個別化治療開発のさらなる促進に寄与すると推測され、肺がん克服に向けて非常に意義の高いものと考えられる。

## 3. 研究の方法

同意の得られた肺がん患者より末梢血を採取し、末梢循環血液中のがん細胞を同定し、その数や細胞内のゲノム異常を解析する。同一症例で原発巣のゲノム異常が確認できていればそれらと末梢血中のがん細胞からの結果とを比較する。また微量ゲノムDNAから肺がん関連遺伝子異常の網羅的解析を試みる。

(1) 肺がん患者における末梢循環血液中に存在するがん細胞 (circulating tumor cell: CTC) の検出

同意の得られた切除可能肺がん患者 10 人からそれぞれ末梢血を 30ml 採取する。そのうち 7.5ml の血液、抗 EpiCAM 抗体と磁気ビーズで処理して上皮細胞分画を選択する。白血球分画のコンタミネーションを除去するために抗 CD45 抗体を用いる。また、その他の特異染色を用いてがん細胞を抽出する。得られたがん細胞の数をカウントし、-80 度で保存する。

(2) 肺がん患者における末梢循環血液中のゲノム異常細胞 (circulating genetically abnormal cell: CAC) の検出

上記の血液の残り 22.5ml からフィコール・ハイパーク密度遠心分離法を用いて単核球分画を選択採取する。得られた細胞分画より特異染色を用いてがん細胞と思われる細

胞を抽出する。得られた細胞をカウントし、-80 度で保存する。また得られた一部の細胞で、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) を行い、EGFR, p53 などの既知の遺伝子領域のゲノムコピー数を比較する。切除された肺がん検体でも同様に FISH を行い、末梢血に原発巣と一致したゲノム異常細胞が存在することを確認する。

(3) 肺がん患者 CTC, CAC から EGFR 遺伝子変異解析

上記で得られた CTC, CAC を用いてバイオマーカー解析が可能であるか、まずは既知の EGFR 遺伝子変異から解析する。測定法は高感度測定法である Scorpion-ARMS 法と比較的低感度なダイレクトシーケンス法を用いて、得られた結果の異同を検証する。また、同一症例で原発巣組織での EGFR 遺伝子変異が検出されていれば、その結果との比較を行い、CTC, CAC の妥当性を検討する。

(4) 微量ゲノム DNA から肺がん関連遺伝子異常の網羅的解析

将来的に末梢血液中の微量ゲノム DNA からの分子バイオマーカーとなりうる肺がん関連遺伝子異常を網羅的に解析することをめざし、まずは遺伝子異常が既知の細胞株、臨床検体を用いて微量ゲノム DNA から遺伝子異常を検出する方法を試みる。cRNA プロブを用いて目的のゲノム領域 1.8Mb を選択的に濃縮し、次世代シーケンサーを用いてゲノム配列を解読する。

## 4. 研究成果

(1) CTC 検出の条件検討

肺小細胞癌培養株 N417 を用いて、30ml 血液中に 1 個~1000 個の濃度で希釈し、抗 EpiCAM 抗体と磁気ビーズで処理して上皮細胞分画を選択した。抗 CD45 抗体を用いて白血球分画を除去し、その他の特異染色を用いてがん細胞を抽出したところ、30ml 血液中 5 個の濃度のときにがん細胞が抽出できることが確認できた。

(2) 肺がん患者血液中から CTC, CAC の検出

同意の得られた IV 期肺がん患者症例 (非小細胞がん 5 例、肺小細胞がん 5 例) から末梢血を採取し、CTC, CAC の検出を行ったところ、CTC を検出可能であった症例は 2 例 (非小細胞がん 1 例、肺小細胞がん 1 例)、CAC を検出可能であった症例は 1 例 (肺小細胞がん) であった。

また、これらの細胞からゲノムを DNA の抽出を試みたが、得られた DNA 量は 5~10ng と少なく、予定されたゲノム異常解析に充分で

はない、と判断した。そこで、上記症例の末梢血血漿分画中のゲノム DNA の抽出を試みたところ、100～500ng の DNA を得ること可能であった。

### (3) 微量ゲノム DNA から肺がん関連遺伝子異常の解析

微量 DNA から遺伝子異常を網羅的に解析するために、ターゲットキャプチャー法と次世代シーケンサーを用いた新たな肺がんゲノム診断システムの開発を試みた。まず、133 個の肺がん関連遺伝子のゲノム領域 (約 1.8Mb) を選択的にキャプチャーする独自のカスタムパネル (cRNA プローブセット) を作成した。このパネルには EGFR, KRAS など肺がんで高頻度に変異が知られている遺伝子、また近年発見された EML4-ALK, KIF5B-RET などの融合遺伝子の他、今後の治療標的候補となるチロシンキナーゼ、チロシンホスファターゼをコードする遺伝子や、その他の代表的ながん遺伝子、がん抑制遺伝子が含まれている。このキャプチャー法と高速次世代シーケンサー (MiSeq システム) を組み合わせて、実臨床に適用できるよう、多くの遺伝子の塩基配列解読を、約 1 週間で、複数サンプル同時に行うことを目標とした。

まず、遺伝子変異が既知の細胞株からゲノム DNA を抽出し、このシステムで目的の遺伝子異常が検出可能か確認した。DNA3 $\mu$ g から検討を行い、DNA50ng でもほぼ 97% の一致率で一塩基置換の検出が可能であった。また、ALK, RET, ROS1 の融合遺伝子も DNA50ng から検出可能であった。次に、遺伝子変異が既知の臨床検体 (切除検体、胸水) から得られたゲノム DNA50ng を用いて同様の方法で検出を試みたところ、すべての目的の遺伝子異常の検出が可能であった。

今後は、遺伝子異常が未知の臨床検体を用いて、本システムで解析を行う予定である。さらには末梢循環血液中の微量ゲノム DNA から分子標的治療の薬剤耐性に関わる既知あるいは未知の遺伝子異常を同定できる可能性もある。

## 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 1 件)

Suzuki M, Makinoshima H, Matsumoto S, Suzuki A, Mimaki S, Matsushima K, Yoh K, Goto K, Suzuki Y, Ishii G, Ochiai A, Tsuta K, Shibata T, Kohno T, Esumi H, Tsuchihara K.

Identification of a lung adenocarcinoma cell line with CCDC6-RET fusion gene and the effect of RET inhibitors in vitro and in vivo.

*Cancer Sci* in press 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

Matsumoto S, Mimaki S, Tada S, Suzuki Y, Kohno T, Tsuta K, Goto K, Yoh K, Umemura S, Niho S, Ohmatsu H, Ohe Y, Esumi H and Tsuchihara K

Establishment of a diagnostic system using next generation sequencing for RET rearrangements in non-small cell lung cancer

European Cancer Congress 2013, Sep, 2013, Amsterdam, Nederland

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 慎吾 (MATSUMOTO SHINGO)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・医師

研究者番号：10392341

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：