

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461977

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた胃癌・GIST患者末梢血中腫瘍由来浮遊DNAの検出

研究課題名(英文)Detection of circulating tumor DNA in cell-free DNA in gastric cancer patients and imatinib-resistant GIST patients using next-generation sequencer

研究代表者

黒川 幸典(Kurokawa, Yukinori)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10470197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌およびイマチニブ耐性GISTの持つ変異について、末梢血中に浮遊している腫瘍由来のDNA断片(ctDNA)として検出できるかどうか検討した。胃癌症例6例に対して血漿中に遊離しているDNAの抽出を行い、6例中3例で腫瘍と同一のTP53変異を持つctDNAを検出できた。これら3例におけるctDNAの存在比率は病勢を反映していた。一方、イマチニブ耐性GISTの4例中3例でC-KIT exon13、1例でexon18の1塩基置換が認められた。これら腫瘍と同一のC-KIT変異を持つctDNAの存在比率は0.010-9.385%であり、この存在比率は腫瘍量や病勢との相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether tumor-specific mutations could be detected in circulating tumor DNA (ctDNA) from the peripheral blood in patients with gastric cancer or imatinib-resistant GIST.

Cell-free DNA was extracted in blood samples in 6 patients with gastric cancer. Identical TP 53 mutations could be detected in ctDNA in 3 of the 6 patients. All 3 patients had extremely progressive disease, and the fraction rates of ctDNA were also consistent with tumor volume and disease course. Regarding GIST, imatinib-resistant lesions had single nucleotide substitutions in C-KIT exon 13 in three patients and exon 18 in one patient. Identical secondary C-KIT mutations could be detected in ctDNA with a mutant fraction range of 0.010- 9.385%, and the fraction rate of ctDNA was consistent with tumor volume and disease course.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ctDNA 次世代シーケンサー 胃癌 GIST

### 1. 研究開始当初の背景

日本人において胃癌は最も多い癌である。早期発見や再発診断あるいは抗癌剤の効果判定法などには適切な血中腫瘍マーカーが重要であるが、胃癌で現在汎用されている腫瘍抗原は陽性率 3-4 割程度と十分でなく、新たなマーカーが期待されている。胃癌においては遺伝子変異の頻度の多いものとして TP53、APC、CDH1、KRAS などが報告されている。特に TP53 および APC は胃癌においてそれぞれ約 60%、約 40% に変異が認められると報告されていることから、腫瘍におけるこれらの遺伝子変異を血液サンプルを用いて検出および定量することができれば非侵襲的および簡便に癌の診断および再発後の化学療法効果判定が行えると考えられる。

一方 Gastrointestinal stromal tumor (GIST) は主に C-KIT および platelet-derived growth factor receptor (PDGFRA) の変異により引き起こされる疾患である。C-KIT の exon11 に変異を有する症例ではイマチニブが奏効するとされているが、C-KIT に二次変異を来すことで耐性を獲得することが知られている。現在、イマチニブ耐性 GIST の治療としてはスニチニブとレゴラフェニブの 2 つの薬剤が使用可能であるか、それらの効果は二次変異の部位によって異なるとされており、二次変異の部位を知ることは薬剤選択において有用である。しかしながら耐性病変は体腔内深くに存在することも多く、腫瘍サンプルを得ることは困難なことが多い。

近年、担癌患者の末梢血中に浮遊している DNA (cfDNA) の中に腫瘍由来の DNA 断片 (ctDNA) が含まれていることが分かってきた。この ctDNA は腫瘍と同じ変異を持つことから、腫瘍から組織を採取することなく採血だけで腫瘍の持つ遺伝子変異を知ることができる手法として注目されているほか、治療経過をモニタリングするための新しいマーカーとして期待されている。近年、次世代シーケンサーの発展・普及にともない、腫瘍の変異同定がさらに容易となり、ctDNA の定量的検出にも応用が可能となった。これまでもいくつかの悪性疾患で ctDNA 検出の有用性を示唆する報告がなされている。

### 2. 研究の目的

本研究は、胃癌患者および GIST 患者の末梢血を用いて次世代シーケンサーによる腫瘍由来遊離 DNA (ctDNA) の検出を行い、血中を浮遊している変異 DNA 断片の検出が可能かどうかを調べ、早期発見法や再発診断法あるいは抗癌剤の効果判定法などの確立につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

当院で診療を行った胃癌患者および GIST 患者を対象とした。治療のために当科で切除された胃癌組織および GIST 組織を収集して DNA を抽出し、腫瘍に特徴的な変異を検索した。それと同じ変異を有する DNA 断片を血漿から検出可能かどうか次世代シーケンサーを用いて検索した。

組織の収集と DNA の抽出：治療開始前に原則として全症例に行っている上部消化管内視鏡検査の際に、生検組織を採取し凍結保存した。手術患者では、切除標本から腫瘍組織と正常組織を採取しただちに凍結保存し、これらの組織から DNA を抽出した。

原発巣のシーケンシング：胃癌においては次世代シーケンサー用試薬 Cancer Panel を用いてまずは原発巣における変異の決定を行った。結果の解析には Torrent Suit Variant Caller を用いた。解析症例中で 1 つ以上の変異が同定された割合を求め、解析に用いる遺伝子変異を症例ごとに選択した。

GIST においてはサンガー法を用いたダイレクトシーケンスで腫瘍の持つ C-KIT の変異を検索した。

プライマーの設計：腫瘍で同定した変異を、血漿から検出するためのプライマーを設計した。既知の変異点を含む領域で約 100bp 前後のサイズとなるように設計した。

血漿サンプルの収集と DNA 抽出：胃癌患者では、手術前後あるいは化学療法の前で血液約 7mL を採取した。術後経過観察のための症例では、2-3 カ月毎の定期外来通院時に血液を採取した。GIST 患者では耐性病変の治療前後で末梢血を採取した。

血液は直ちに遠心し血漿分離を行い、ディ

ープフリーザーで保管した。血漿からの cfDNA 抽出は、Circulating Nucleic Acid Kit(QuiaGen 社)を用いて行った。

血漿 DNA のシーケンシングとデータ解析： 前述のプライマー(原発巣が有する変異を血中からも検出するために患者ごとに設計)を用いて、cfDNA を PCR で増幅した。得られた PCR 産物は Ion PGM を用いて 1 症例あたり 10 万リード以上となるよう計画してシーケンシング(= deep amplicon sequencing)を行った。得られた塩基配列データは、あらかじめ準備した参照配列にマッピングし、腫瘍で同定している変異点における、正常塩基のリード数に対する変異塩基のリード数を算出することにより、cfDNA 中における ctDNA の存在比率を算出した。

#### 4. 研究成果

##### 胃癌サンプルに関して

当科で手術された胃癌原発巣 42 例を用いて、変異報告の多い箇所(TP53 の各エクソンおよび APC の exon16 内の 5 つの領域、KRAS の exon2, 3)をはさむような primer を設計し、PCR で増幅した後、Sanger 法を用いてサイクルシーケンス反応を行った。3730 DNA Analyzer を用いて TP53、APC、CDH1、KRAS の変異の解析を行い、10 例(24%)で TP53 の変異を同定した。

TP53 の変異を同定した 10 例のうち、6 例の術前血液サンプルを用いて、血漿中の cfDNA の抽出を行った。それぞれの症例において術前、術後の 2 サンプルずつから、14.1-58.9ng の cfDNA を回収することができた。次世代シーケンサーを用いて回収した cfDNA の deep sequencing を行い、3 例で腫瘍と同一の変異を持つ ctDNA を血漿から検出した。検出例はいずれも Stage IIIC や IV の非常に進行した胃癌患者であった。

再発を認めた際には術後 3 か月ごとに 1 年間血液を提供していただき、DNA を抽出した。治療経過中の血液サンプルを追跡したところ、ctDNA の定量値が腫瘍量、治療効果、血清腫瘍抗原の推移と合致していた。このことから、ctDNA が術後の再発診断や再発後の化学療法効果判定を行うマーカーとして応用可能である可能性が示唆された。

TP53 で ctDNA を追跡しえた 3 例に関して、TP53 に加え ALK や EGFR、BRAF、KRAS などの 48 の癌関連遺伝子を一度に検索可能な次世代シーケンサー用のパネルを用いて原発巣の解析を追加し、TP53 以外の遺伝子について変異を検索したところ、1 つ以上の別の遺伝子の変異を同定することができた。それらの遺伝子で ctDNA を調べたところ TP53 と同様の推移を示していた。このことから、TP53 以外の遺伝子の変異もマーカーとして応用可能である可能性が示唆された。

##### GIST サンプルに関して

当科で手術されたイマチニブ耐性 GIST 病変 4 例を用いた。イマチニブ耐性病変の有する二次変異は、4 例中 3 例は C-KIT exon13 の 1 塩基置換(V654A)、1 例は C-KIT exon18 の 1 塩基置換(A829P)であった。全ての血液サンプルから 0.64-2.03ng/ $\mu$ L の cfDNA を抽出することができた。次世代シーケンサーを用いて回収した cfDNA の deep sequencing を行い、4 例全例で腫瘍と同一の変異を持つ ctDNA を血漿から検出することができた。イマチニブ耐性病変に対する治療の前後で採取した血液サンプルにおいては、二次変異について cfDNA における ctDNA の存在比率を算出したところ、4 例の治療前値および治療後値はそれぞれ、[6.039%, 0.010%]、[0.053%, 0.013%]、[0.010%, 0.041%]、[9.385%, 0.199%]であり、4 例中 3 例において病勢との相関を認めていた。初発病変の切除前後にも血液サンプルを採取できた症例において、病勢と ctDNA 割合との関係を経時的に検討したところ、ctDNA 割合は耐性病変出現前には閾値以下であったものが耐性病変出現後に閾値以上にまで増加した。さらに、耐性病変の治療としてスニチニブを投与した後には閾値以下にまで減少しており、病勢との相関を認めた。

#### 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 2 件)

Hamakawa T, Kukita Y, Kurokawa Y, Miyazaki Y, Takahashi T, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Taniguchi K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y, Kato K. Monitoring gastric

cancer progression with circulating tumour DNA. Br J Cancer. 2015 Jan 20;112(2):352-6.

Wada N, Kurokawa Y, Takahashi T, Hamakawa T, Hirota S, Naka T, Miyazaki Y, Makino T, Yamasaki M, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Detecting Secondary C-KIT Mutations in the Peripheral Blood of Patients with Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. Oncology. 2016;90(2):112-7.

〔学会発表〕(計 3 件)

Wada N, Kurokawa Y, Takahashi T, Hamakawa T, Hirota S, Naka T, Miyazaki Y, Makino T, Yamasaki M, Nakajima K, Takiguchi S, Mori M, Doki Y. Detecting secondary C-KIT mutations in the peripheral blood of patients with imatinib-resistant GIST. 28th EORTC-NCI-AACR Symposium, Nov-Dec 2016, Munich (Germany).

和田範子、黒川幸典、高橋剛、浜川卓也、廣田誠一、宮崎安弘、牧野知紀、山崎誠、中島清一、瀧口修司、森正樹、土岐祐一郎。Imatinib 耐性 GIST における ctDNA からの secondary mutation の検出。第 88 回日本胃癌学会総会。2016 年 3 月（大分）

和田範子、黒川幸典、高橋剛、宮崎安弘、牧野知紀、山崎誠、中島清一、瀧口修司、森正樹、土岐祐一郎。イマチニブ耐性 GIST 患者の末梢血における C-KIT の変異検索。第 71 回日本消化器外科学会総会。2016 年 7 月（徳島）

〔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

黒川 幸典 (KUROKAWA YUKINORI)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：10470197

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者