

授与番号	甲第 1853 号
------	-----------

論文内容の要旨

Analysis of mutational and proteomic heterogeneity of gastric cancer suggests an effective pipeline to monitor post-treatment tumor burden using circulating tumor DNA

(胃癌腫瘍内遺伝子変異多様性に対する遺伝子変異およびタンパク量解析は腫瘍由来血中循環 DNA を用いた治療後体内腫瘍量を追跡するための効果的なパイプラインを提案する)

(佐々木教之, 岩谷岳, 千葉丈広, 藤田征志, Zhenlin Ju, 遠藤史隆, 八重樫瑞典, 八谷剛史, 杉本亮, 菅井有, Doris Siwak, Lance Liotta, Yiling Lu, Gordon Mills, 中川英刀, 西塚哲)

(PLoS One 15 巻, 10 号 令和 2 年 10 月掲載)

I. 研究目的

がん患者の血中に含まれる腫瘍細胞由来の血中遊離 DNA (Circulating tumor DNA, ctDNA) は症例特異的な腫瘍マーカーとして注目されているが, 腫瘍内遺伝子変異多様性がどのように反映されるかは明らかになっていない. また, 近年では遺伝子変異情報から分子標的治療を行うがんゲノム医療が注目されているが, 特定のコンパニオン診断以外ではその臨床的有用性は示されていない. これは, 多くの分子標的治療薬の標的がタンパクであり遺伝子変異のみではその効果を直接予測することが困難なことや, 腫瘍内の遺伝子変異多様性による治療対象標的部位の不確実性の影響によるものと考えられる.

本研究では胃癌の multi-region sampling から遺伝子変異解析およびタンパク発現解析を行い, 胃癌における ctDNA 解析が体内腫瘍量の追跡に有用であることを検証した.

II. 研究対象ならび方法

2016 年 7 月から 2017 年 1 月の間に岩手医科大学附属病院で胃切除術を受けた cStage II 以上の胃癌患者 10 名を対象とした. 切除検体の原発腫瘍の 3 箇所から検体を採取し DNA を抽出し次世代シーケンサー(NGS)によるがん関連 151 遺伝子の変異解析を行った. 3 箇所の検体における変異アリル頻度(variant allele frequency, VAF)をもとに腫瘍進化系統樹を作成した. また, 分割したそれぞれの検体を用いて, 逆相タンパク質ライセートマイクロアレイ(reverse-phase protein array, RPPA)による 293 個のタンパク定量解析を行い, 遺伝子変異とタンパク量との関連を検討した. 同定された症例特異的変異の中から複数の変異を選択し, digital PCR(dPCR)に用いるプライマー・プローブセットを設計・合成した. 術前後の血漿を用いて, 体内腫瘍量に応じた ctDNA 変化をもとに, ctDNA の腫瘍マーカーとしての臨床的妥当性について検討した.

III. 研究結果

1. 遺伝子変異解析では 10 腫瘍 30 検体から 126 種類の体細胞変異が検出された。3 箇所
に共通する体細胞変異を founder mutation, 1 箇所のみ, または 2 箇所のみで共通で
あった変異を non-founder mutation と定義したところ 16 種類 (12.7%) が founder
mutation に該当した。
2. Founder mutation の VAF は non-founder mutation の VAF よりも有意に高かった (26.5%
vs 13.5%; $p < 0.0001$)。
3. R パッケージ Canopy を用いた VAF に基づく進化系統樹解析では, hypermutator を除
く 8 つの腫瘍のうち 5 つの腫瘍で founder mutation が進化系統樹の幹部に位置して
いた。
4. NGS で同定された 15 種類の non-founder mutation について腫瘍 DNA を用いて dPCR を
行ったところ, 14 種類 (93.3%) の変異が 3 箇所すべてで検出された。
5. 術前血漿で ctDNA が検出されたのは 30% (3/10) であった。ctDNA の VAF は founder
mutation が non-founder mutation よりも有意に高かった (1.09% vs
0.29%; $p = 0.0039$)。
6. 術前血漿で ctDNA が検出された 3 例では, 治療による体内腫瘍量減少に伴い術後血漿
ctDNA の VAF が減少していた。
7. RPPA 解析によるタンパク量の検討では, 腫瘍間よりも腫瘍内で高い相関を示した。
8. 42 個の遺伝子とタンパク発現のペアのうち, TP53 変異では p53 タンパク量は有意に
高かったが ($p = 0.0004$), 他の変異ではタンパク量との関連はみられなかった。

IV. 結 語

腫瘍内の遺伝子変異多様性を考慮した場合, VAF が高い変異は founder mutation かつ進
化系統樹の幹部に位置する可能性が高く, 高感度の dPCR 技術を用いた ctDNA 解析におい
て症例特異的な腫瘍マーカーとなりうることが示唆された。また, 遺伝子変異情報のみで
は分子標的であるタンパクの発現量を予測するのは困難であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 松本 主之（内科学講座：消化器内科消化管分野）

副査 教授 前門戸 任（内科学講座：呼吸器内科分野）

副査 講師 上杉 憲幸（病理診断学講座）

血中を循環する腫瘍由来の遊離 DNA が腫瘍関連バイオマーカーとなる可能性が示唆されている。研究者らは進行胃癌患者 10 例の切除標本 3 部位から DNA を採取し、151 遺伝子の変異解析、逆相タンパクアレイ解析によるタンパク定量解析、および進化系統樹解析を行なった。変異陽性となった 126 遺伝子中 16 遺伝子の変異は同一患者で共通していたので founder mutation (FM) と定義した。FM はそのアレル頻度が非 FM よりも有意に高く、進化系統樹の幹部に位置していた。以上より FM がデジタル PCR 法による定量的 ctDNA モニタリングの候補となる可能性が示唆された。術前の患者血漿では FM のアレル頻度が非 FM よりも高かったが、タンパク解析の結果は変異の頻度とは関連せず、患者内あるいは患者間で一定の傾向はみられなかった。以上より、高率に変異アレル頻度を示す癌関連遺伝子は ctDNA 定量の標的となり得るが、その量から分子標的のタンパク発現を予測することは困難と結論した。

試験・試問の結果の要旨

癌遺伝子に関する基礎的知識、遺伝子・タンパク解析の理論と手技、liquid biopsy に関する最新の知見、本研究の結果の解釈と臨床的意義、今後の研究の進展について試問を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成に当たって、剽窃・盗作等の研究不正はないことを確認した。

参考論文

- 1) Esophageal carcinosarcoma in which the sarcomatous element has sloughed off. A case report
肉腫成分が脱落した食道癌肉腫の 1 例
(佐々木教之 他 16 名と共著)
International Journal of Surgery Case Reports, 74 巻, 2020): p27-31.
- 2) 小腸悪性リンパ腫穿孔の 1 例
(佐々木教之 他 3 名と共著)
岩手県立病院医学会雑誌, 58 巻, 2 号 (2018): p158-161.
- 3) きんぴらごぼうによる食餌性イレウスの 1 例
(佐々木教之 他 3 名と共著)
岩手県立病院医学会雑誌, 58 巻, 2 号 (2018): p155-157.
- 4) 脾臓原発血管肉腫の 1 例
(佐々木教之 他 3 名と共著)
岩手医学会雑誌, 70 巻, 2 号 (2018): p59-63.