

論文内容の要旨

Individualized mutation detection in circulating tumor DNA for monitoring colorectal tumor burden using cancer-associated gene sequencing panel

(癌関連遺伝子シーケンシングパネルを用いた大腸癌体内腫瘍量モニタリングのための血中腫瘍由来 DNA 中の個別遺伝子変異検出)

(佐藤 慧, 八谷 剛史, 岩谷 岳, 久米 浩平, 松尾 鉄平, 川崎 啓祐, 安孫子 幸人, 赤坂 理三郎, 松本 主之, 大塚 幸喜, 西塚 哲)

(PLOS ONE 11 巻, 1 号 平成 28 年 1 月掲載)

I. 研究目的

癌患者の血中には癌細胞由来の血中遊離 DNA (cell free DNA, 以下 cfDNA) が含まれていることが知られている. cfDNA 中の特定の遺伝子変異は手術後や化学療法後に減少すると言われている. 大腸癌患者の cfDNA を用いて、原発腫瘍由来の変異遺伝子配列を定量的に検出できれば、癌存在診断および治療効果判定に有用な個別化バイオマーカーとなり、CT などの画像評価や既存の腫瘍マーカーよりも鋭敏に病態を反映する可能性がある.

II. 研究対象ならび方法

2013 年 5 月から 2014 年 8 月の間に岩手医科大学で大腸腫瘍を切除された外科手術群 31 例 (StageIV は除外), 内視鏡治療群 20 例, および腫瘍に対する治療履歴のない健常者群 9 名を含めた 60 名を対象とした. はじめに各群の cfDNA 量を測定した. 次に, 半導体型次世代シーケンサー (Ion PGM) を用いて癌関連遺伝子 50 種類の変異解析パネル (CHPv2) で原発腫瘍 (27 症例) の変異解析を行った. 原発腫瘍でシーケンスリード中 10 以上のシーケンスリード数を示した変異遺伝子リストから, 症例ごとに個別の Marker Mutation (MM) を設定し, 手術前後の cfDNA 中 MM 断片の量的変化を Ion PGM および droplet digital PCR (ddPCR) でモニタリングした.

III. 研究結果

1. 腫瘍、血漿、末梢血単核球からそれぞれ平均 8300, 121.9, 5376ng の DNA を抽出できた.
2. 血漿 1ml から cfDNA は平均 22.9ng 抽出された.
3. 健常者, 内視鏡群, 外科群の cfDNA 量はそれぞれ平均 5.1, 13.7, 27.4ng/ml であり,

病態が進行するにつれて、cfDNA量は増加する傾向があった。しかしながら、腫瘍切除後にcfDNA量の明らかな減少傾向は認めなかった。

4. 腫瘍 (n=27) 由来のDNAをIonPGMでシーケンスすると、癌関連50遺伝子中から、腫瘍あたり平均2.7遺伝子の変異がみられた。
5. 腫瘍中の変異の種類は missense, 53.9%; frameshift, 25.0%; nonsense, 7.0%; in-frame, 0.8%; synonymous, 6.3%; および splice site, 7.0%であった。
6. 対象とした腫瘍で高頻度に変異がみられた遺伝子は TP53, 70% (19例); KRAS, 37% (10例); APC, 22% (6例) であった。
7. 検出された320個の一塩基置換から個別の腫瘍に特異的なMMは66個設定できた。
8. Ion PGMではcfDNA中のMMは術前後とも検出できなかった。
9. 66個のMMのうちddPCRでの検出系を確立できた24例についてcfDNA中のMMを術前後でモニタリングすると、術前アリアル頻度が0.1%以上の8例全例で減少傾向であった(100%)が、0.1%以下の16例全例で減少傾向が見られなかった。

IV. 結 語

癌関連遺伝子シーケンシングパネルを用いて進行大腸癌，早期癌，および腺腫の原発腫瘍遺伝子変異を明らかにした。対応したcfDNA中の変異断片量が体内腫瘍量と密接に関連していることから，その変異断片量は体内腫瘍量モニタリングに有用な個別化腫瘍マーカーとなりうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 前沢 千早 (医歯薬総合研究所 腫瘍生物学研究部門)
副査 講師 高田 亮 (泌尿器科学講座)
副査 准教授 佐藤 衛 (医歯薬総合研究所 生態情報解析部門)

がん細胞由来の血中遊離 DNA (cell free DNA; cfDNA) は、がんの存在診断や治療効果の判定に有用なバイオマーカーとして期待されている。本研究論文では、ヒト大腸癌組織に於いて、半導体型次世代シーケンサーを用いて 50 種類のがん関連遺伝子について、がん細胞特異的に生じていた変異を同定した。この変異情報に基づいて、droplet digital PCR (ddPCR) 法による標的 cfDNA の定量法を開発した。本法では、内視鏡あるいは外科切除前後で 33% の症例に於いて標的 cfDNA の減少傾向が確認された。ddPCR 法は、従来の DNA/RNA 定量法が半定量しかできなかった限界を打ち破り、微量の検体から高感度に絶対定量を可能にした新規手法である。大腸癌原発巣に於いて、次世代シーケンサーによる解析が進み、少数の共通標的 cfDNA が明らかとなれば、ddPCR 法による大腸癌の存在診断や治療効果の判定が可能になる。

本論文は、大腸癌患者の血液サンプル中の cfDNA による癌細胞の存在/治療効果診断に応用可能な優れた方法である。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

大腸癌の遺伝子変異とその解析法に係る基礎知識及び実験手法について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考ええる。

参考論文

- 1) A compensatory role of NF- κ B to p53 in response to 5-FU-based chemotherapy for gastric cancer cell lines (胃癌細胞株での 5-FU 系抗癌剤に対する反応における NF- κ B の p53 に対する補填的役割) (遠藤史隆, 他 9 名と共著)
PLoS One, 27 巻, 9 号 (2014) e90155.
- 2) 再発癌抑制目指した科学的根拠に基づくバイオマーカー探索 (西塚哲, 他 11 名と共著)
分子細胞治療フロンティア (2014) : pp20-26.
- 3) Evaluation of the antitumor effects of alternate-day 5-fluorouracil administration model using human gastric cancer cell lines (ヒト胃癌細胞を用いた 5-FU 隔日投与の抗腫瘍効果の評価) (石田馨, 他 8 名と共著)
岩手医学雑誌 67 巻, 2 号 (2015): 掲載予定