

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830098

研究課題名(和文) マルチプレックス遺伝子変異測定技術の Liquid Biopsy における有効性検討

研究課題名(英文) Liquid biopsy for detection of somatic mutation using next generation sequencer

研究代表者

坂井 和子 (SAKAI, Kazuko)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20580559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次世代シーケンサーによる血漿検体からの体細胞遺伝子変異測定系の有用性を示すことを目的とした。大腸癌に見出されるKRAS, NRAS, BRAF遺伝子変異の検出系を構築し、臨床検体での解析を行った結果、標準法と比べて92%の高い一致率を得た。また、肺癌に特徴的な22遺伝子の遺伝子変異検出パネルを用い、肺癌患者血漿検体を用いて検出を試みた結果、EGFR遺伝子変異を含む複数の遺伝子変異を検出した。検出されたEGFR遺伝子変異は、デジタルPCR法と91%の一致率を示した。以上の結果から、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異検出は、従来の高感度手法と比して同等の検出力を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate the feasibility of detecting gene mutation in plasma using NGS. We established and validated a gene mutation assay for the detection of KRAS, NRAS, and BRAF mutations in colorectal cancer samples using an Ion Torrent PGM semiconductor sequencer. The concordance of KRAS mutations in exon 2 as detected using the NGS assay and the standard assay was 92%. In addition, we established a gene mutation assay for the detection of 22 lung cancer-related gene mutations. To gauge the feasibility of using the assay for liquid samples, we used plasma samples from eleven lung cancer patients. The concordance of EGFR mutations as detected using the NGS assay and the digital PCR assay was 91%. In conclusion, the genetic screening assay using NGS was useful for the detection of clinically relevant gene mutations using liquid samples.

研究分野：分子生物学

キーワード：次世代シーケンサー セルフリーDNA 肺がん 体細胞遺伝子変異 血漿

1. 研究開始当初の背景

肺がんにおいては、多くのドライバー遺伝子変異、融合遺伝子が見いだされ、分子標的薬による最適化治療が実施される。現在では、有効な薬剤の選択のために、EGFR (上皮成長因子受容体) 阻害剤に対する EGFR 遺伝子変異の診断、ALK 阻害剤に対する EML4-ALK 融合遺伝子の診断、さらには、RET 阻害剤に対する RET 融合遺伝子の診断と、多数の診断が必要となる。肺がんは、生検腫瘍組織を解析対象とする場合に採取できる組織検体が特に少なく、採取には侵襲性を有することから、非侵襲的に採取し得る末梢血からの Liquid Biopsy による血清、血漿検体を用いた体細胞変異検出が望まれている。我々は、これまでに、血清・血漿由来の循環細胞フリーDNA (circulating free DNA, セルフリーDNA) からの遺伝子変異検出に取り組んできた。その中で、昨年、質量分析装置 (マスアレイ・シーケノム社) を用いた高感度の遺伝子変異検出系を構築し、遺伝子変異の検出を行った。EGFR 阻害剤の耐性変異である EGFR T790M を対象とした感度 0.3% の高感度検出系を構築し、EGFR 阻害剤に耐性となった患者血清から抽出したセルフリーDNA を用いて検出を試みた結果、21/75 (28%) の頻度で EGFR T790M 遺伝子変異が検出され、血清中 cfDNA を用いた検出の有効性が示唆された (Sakai K. et al, Cancer Sci. 2013; 1198-204., 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会奨励賞)。一方で、組織腫瘍検体と血清・血漿中セルフリーDNA での遺伝子変異の一致率の検討は十分には行われていない。さらに、マスアレイによる高感度検出系は、EGFR T790M のみを対象としており、肺がんにおける多くの遺伝子変異を一度に検索するには、マルチプレックス化による測定が望ましい。そこで、我々は、肺がんの同一症例での腫瘍組織と血清のペア検体を用いた血清中セルフリーDNA での遺伝子変異検出の有用性についての検討を、マルチプレックス化が容易であり、一定の感度が担保され、必要検体量が微量 (10 ng DNA) であり、かつ、肺がんの腫瘍組織検体での体細胞変異検出の測定実績を有する次世代シーケンサー IonPGM (ライフテクノロジーズ社) を用いて行う研究計画を立案した。まず、EGFR や KRAS 等の代表的な遺伝子変異検出を検討した結果、肺がん腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体において、遺伝子変異の検出が確認された。この結果から、IonPGM による遺伝子変異検出が実施可能であることが示唆されたため、血漿・血清中セルフリーDNA を用いた本研究を計画した。

2. 研究の目的

がん医療では、ゲノム解析技術の発展により、分子標的薬の標的となる新しいドライバー遺伝子変異の発見、遺伝子変異・融合遺伝子による薬の効果の違いなどが明らかになり、体細胞変異プロファイルによる最適化医

療が進みつつある。その中でも、肺がんにおいては、診断時の生検による検体がごく微量であり、採取には侵襲性を有することから、非侵襲的に採取し得る末梢血からの血清、血漿検体を用いた体細胞変異検出が望まれている。本研究では、次世代シーケンサーを応用し、非侵襲的な血清中の遊離核酸からの体細胞遺伝子変異検出の実行可能性ならびに血漿・血清検体から検出した遺伝子変異のサーロゲートマーカーとしての臨床的有用性を検討し、肺がん治療に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

血漿・血清中の循環細胞フリーDNA (セルフリーDNA) からの遺伝子変異検出系の構築には、マルチプレックスでの測定が可能な、次世代シーケンサー IonPGM (ライフテクノロジーズ社) を用いた。セルフリーDNA に微量に含まれる遺伝子変異アレルの高感度検出系を構築するため、KRAS, NRAS, BRAF の 3 遺伝子に絞った検出系をデザインし、遺伝子変異陽性細胞株を用いた検出下限値の測定、標準法ならびに高感度検出法との比較による検出系の評価を行った。実際の臨床検体を用いた評価には、100 例の大腸がんホルマリン固定パラフィン包埋組織検体を用いた。また、血漿検体からの検出の評価は、15 例の腫瘍組織検体と血漿検体のペア検体での評価を行った。肺癌での遺伝子変異検出系の構築には、肺がんに係る 22 遺伝子 (AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH1, NRAS, PIK3CA, PTEN, SMAD4, STK11, TP53) のホットスポット部位を測定する検出系を構築した。実際の臨床検体を用いた評価には、EGFR 遺伝子変異陽性肺がんの血漿検体を用いた。高感度検出法であるデジタル PCR (バイオラッド社) と比較することにより、次世代シーケンサー IonPGM での検出系の評価を行った。すべての臨床検体を用いた検討は、近畿大学医学部遺伝子倫理委員会の承認を受けた研究実施計画書に基づき実施した。

4. 研究成果

次世代シーケンサー IonPGM によるセルフリーDNA に微量に含まれる遺伝子変異アレルの高感度検出系の構築として、大腸がんにおける KRAS, NRAS, BRAF の 3 遺伝子に絞った検出系をデザインし、その feasibility についての検討を行った。測定機器には、次世代シーケンサー IonPGM を用い、アレル検出頻度を指標に、遺伝子変異検出系を構築した (図 1)。正常 DNA を用いて、リード数を測定した結果、各変異部位のリード数は、中央値 57,070 (範囲: 39,769 - 83,633) であった (図 2)。遺伝子変異の有無を判定するため、正常 DNA を用いて、KRAS, NRAS, BRAF の各変異部位のエラー率を測定した結果、ほとんどの部位でのエラー率は 0.01 以下であった。

その際、高いエラー率の検出された3か所については評価対象部位から除外した(図3)。同検出法の検出下限値の評価には、遺伝子変異陽性細胞株を用いた。細胞株は、ヒト由来肺がん株 A549(*KRAS G12S*)、H1299(*NRAS Q61K*)、およびヒト由来大腸がん株 HCT116(*KRAS G13D*)、HT-29(*BRAF V600E*)を用いた。正常DNAを用いた段階希釈による検討の結果、同手法による遺伝子変異検出の検出下限値は、*KRAS G12S*では2.4%、*KRAS G13D*では3.9%、*NRAS Q61K*では0.6%、*BRAF V600E*では1.9%であることが明らかとなった。

図1. IonPGMシーケンサーでの遺伝子変異解析フロー

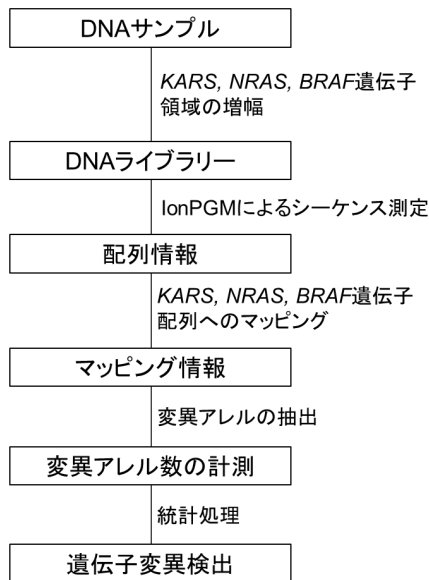


図2. IonPGMシーケンサーで測定した各変異部位でのリード数

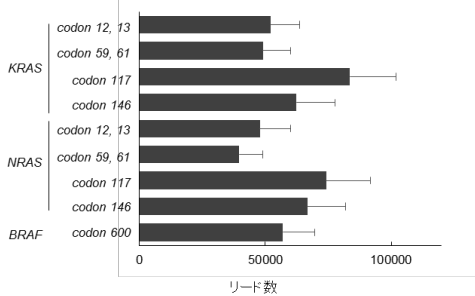
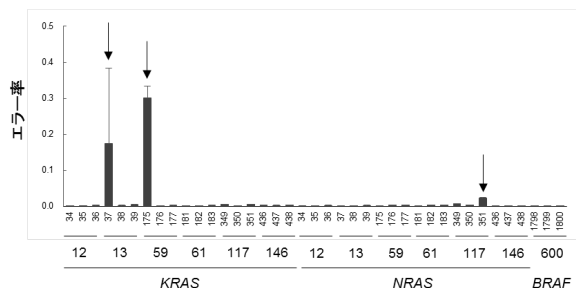


図3. IonPGMシーケンサーで測定した各変異部位でのシーケンスエラー率



臨床検体を用いた評価を行うため、大腸がん100例のホルマリン固定パラフィン包埋組織検体から抽出したDNAを用いて、同検出手法による遺伝子変異検出を行った。*KRAS*遺伝子変異検出を標準法であるリアルタイムPCR法(スコーピオンアームズ法)と比較した結果、次世代シーケンサーと標準法との一致率は92%であった(表1)。同時に、より高感度な検出系との比較を行うため、検出感度が0.01%であるデジタルPCR法による検出結果との比較を行った。次世代シーケンサーとデジタルPCRによる検出法との一致率は90%であった(表2)。

目的とするセルフリーDNAからの遺伝子変異検出の可否を検討するため、組織検体と血漿検体のペア検体を収集、解析した結果、15例中11例で腫瘍組織検体と血漿検体での一致した結果を得た(表3)。

表1. *KRAS*遺伝子変異検出における標準法との比較

		標準法		合計
		陽性	陰性	
次世代シーケ ンス測定	陽性	35	8	43
	陰性	0	57	57
合計		35	65	100

表2. *KRAS*遺伝子変異検出における高感度検出法(デジタルPCR)との比較

		デジタルPCR		合計
		陽性	陰性	
次世代シーケ ンス測定	陽性	36	7	43
	陰性	3	54	57
合計		39	61	100

表3. 腫瘍組織検体と血漿検体での遺伝子変異検出結果の比較

検体 番号	<i>KRAS</i>		<i>NRAS</i>		<i>BRAF</i>	
	腫瘍 組織	血漿	腫瘍 組織	血漿	腫瘍 組織	血漿
DS1						
DS3	陽性		陽性			
DS4						
DS6	陽性	陽性				
DS8	陽性	陽性				
DS9	陽性		陽性			
DS22					陽性	陽性
DS23						
DS24						
DS25	陽性	陽性				
DS28			陽性			
DS29			陽性			
DS30	陽性	陽性				
DS32	陽性	陽性				
DS33						

大腸がんでの結果を踏まえて、肺がんの特徴的な22遺伝子のホットスポット部位に対する検出系の構築を行った。11例の*EGFR*遺伝子変異陽性肺がん患者血漿検体から抽出

したセルフリーDNAを用いて、IonPGMによる遺伝子変異を検出した。次世代シーケンサーでのEGFR遺伝子変異の検出について、高感度検出法であるデジタルPCR法と比較した結果、一致率91%、感度75%、特異度88%を示した。

大腸がん、肺癌における結果から、次世代シーケンサーによる遺伝子変異検出系は、微量な遺伝子変異アレルの検出が可能であり、マルチプレックス測定により、複数の遺伝子変異を同時に検出可能であることから、微量なセルフリーDNAからの遺伝子変異検出に有用である可能性が示唆された。

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 1 件) 査読あり

1. Sakai, K., Tsurutani, J., Yamanaka, T., Yoneshige, A., Ito, A., Togashi, Y., De Velasco, MA., Terashima, M., Fujita, Y., Tomida, S., Tamura, T., Nakagawa, K., Nishio, K. Extended RAS and BRAF Mutation Analysis Using Next-Generation Sequencing. PLoS One, 2015, 10(5):e0121891.

[学会発表](計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井 和子 (SAKAI, Kazuko)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20580559

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし