様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年　3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008　～　2009
課題番号：20790565
研究課題名（和文）　血中 DNA を用いた腫瘍特異的遺伝子変異の検出とその臨床的意義

研究課題名（英文）　Detection of tumor-derived mutations in circulating DNA

研究代表者
木村　英晴（KIMURA HIDEHARU）
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：40444202

研究成果の概要（和文）：
*EGFR*遺伝子変異陽性非小細胞肺癌症例を本研究の対象とした。DNA回収量は血清のほうが多く、ダイレクトシークエンス法よりもScorpion ARMS法の方が、また血清よりも血漿を用いたほうが検出率は高かった。Whole genome amplification(WGA)を用いた検討ではWGAを加えたほうが検出感度は上昇した。問題点として、症例数が不十分であったことが挙げられる。課題として、さらに高感度の検出系の確立が必要である。

研究成果の概要（英文）：Patients with *EGFR* mutations were enrolled in this study. The concentration of the DNA extracted was higher in the patients' serum than in their plasma. The rate of *EGFR* mutation detection was higher, in their DNA from plasma, and by the Scorpion ARMS method. The detection rate was higher when whole genome amplification was performed.A larger study and the establishment of a more sensitive assay is needed to achieve the purpose of this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：癌、遺伝子変異、血中 DNA

１．研究開始当初の背景

2004 年に*EGFR*のチロシンキナーゼ領域に遺伝子変異を有する症例ではゲフィチニブの効果が認められたという報告がなされた(Lynch T., et al: N Engl J Med 2004)。我々も多数例で検討し、各種バイオマーカーの中で*EGFR*遺伝子変異がゲフィチニブの治療効果予測因子として最も有用であることを報告した（Sone T., Kasahara K., Kimura H., et al: Cancer 2007）。

ゲフィチニブと *EGFR* 遺伝子変異に関するこれまでの報告は，手術もしくは生検により得られた腫瘍組織が用いられている。しかし実際の臨床においてゲフィチニブの適応

となる進行期非小細胞肺癌患者では遺伝子変異を解析するために十分な腫瘍検体を得ることができない。そのため我々は *EGFR* 遺伝子変異解析のために、進行期非小細胞肺癌患者の全例から安定して得られる検体として血液検体などの腫瘍代替サンプルを用いた方法の確立が必要と考えた。

これまでにさまざまな悪性腫瘍患者において血中 DNA より腫瘍由来遺伝子異常が検出されることが報告されている(Esteller M, et al. Cancer Res 1999)。治療効果を予測するためのバイオマーカー検出の材料として、血中 DNA を用いることは、1) 患者の状態にかかわらず全例から採取できる、2) 経過を追って採取することが出来る、といった利点があり魅力的な方法である。しかしながら、血中 DNA は微量であること、また正常細胞由来の DNA が混入していることにより、これを用いたアッセイは、検出感度や精度が低くなることが懸念される。

我々はDNA抽出方法、遺伝子変異検出方法に対して様々な工夫を重ねて、検出感度を高めることで血中DNA用いた *EGFR* 遺伝子変異の検出を行ってきた(Kimura H., et al. J Thorac Oncol2006) (Kimura H., et al. Clin Cancer Res 2006) (Kimura H., et al. Br J Cancer 2007)。

また他の研究者から、ゲフィチニブ奏効後に増悪した患者の腫瘍組織から EGFR の 2 次変異が検出されたことが報告されており、これは耐性に関わる遺伝子変異として注目されている(Kobayashi S, et al: N Engl J Med 2005)。

これまでの我々の研究成果と他の研究者からの報告をもとに、EGFR-TKI の個別化治療のための血中 DNA を用いた *EGFR* 遺伝子変異解析の実用化にむけた研究を進めていく。

２．研究の目的

(1) 血中 DNA を用いて腫瘍由来遺伝子変異の検出感度を高めるために、より適した血液検体の処理方法を明らかにする。

(2) EGFR-TKI 投与期間中の血中 DNA から検出される EGFR 遺伝子変異の経時的な変化を解析し、治療効果などとその変化の関連を明らかにする。

３．研究の方法

(1) 対象症例の臨床情報と各種検体の集積

EGFR-TKI 投与を予定している *EGFR* 遺伝子変異陽性の非小細胞肺癌症例を対象として行った。この研究は金沢大学附属病院倫理委員会にて承認された「肺癌治療薬ゲフィチニブ投与を受けた肺癌症例の治療関連遺伝子発現解析（ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会、平成 16 年 7 月承認）」の範囲内で行った。EGFR-TKI 治療を予定する症例が仮登録された時点で、血液検体と腫瘍組織を回収し、*EGFR* 遺伝子変異解析を行った。その結果によって遺伝子変異陽性症例が本登録され、臨床情報(年齢、性別、組織型、EGFR-TKI の治療効果)が記録された。

(2) 血中 DNA の抽出

採取された血液を血清および血漿に分離し-80℃内で一時保存した。QIAmp DNA Blood Kit (QIAGEN)を用いて血中 DNA を抽出した。

(3) *EGFR* 遺伝子変異の解析

ダイレクトシークエンス法(D法)と Scorpion ARMS法(SARMS法)を用いた。D法はExon 18-21 を対象とし、以前に我々が用いた方法で行った(Sone T., Kasahara K., Kimura H., et al: Cancer 2007)。SARMS法はEGFR29 MutationTest Kit(Dxs)を用いて行った。腫瘍組織での解析ではD法を、血中DNAでの解析はD法およびSARMS法を用いた。

(1)Whole Genome Amplification(WGA)の検討

検出感度を高めるために血漿 DNA を用いて WGA を加えることの意義を検討した。WGA は REPLI-g UltraFast Mini Kit (QIAGEN)を用いて行った。

(2)治療経過中の血中 DNA を用いた獲得体制に関わる 2 次変異の検出

血液検体は容易に繰り返し採取できる点から、2 次変異の出現をモニタリングする役割が期待できる。本研究の対象症例の中で行った。EGFR-TKI 治療経過中に 8 週ごとに血漿を回収し、EGFR-TKI に獲得耐性を示す *EGFR* の Exon 20 の変異(T790M)の検出を行った。血漿 DNA の抽出は既述と同様であり、T790M 変異の検出は Scorpion ARMS 法を用いて行った。

４．研究成果

(1) 対象症例

対象期間中に金沢大学附属病院呼吸器内科にて診断された 42 例の進行期非小細胞肺癌患者の腫瘍組織を用いて EGFR 遺伝子変異解析を行った。16 例が遺伝子変異陽性であり、本試験の対象症例とした。年齢中央値 59(範囲 43-85)、男性 6 例、女性 10 例であり組織型は全例腺癌であった。EGFR-TKI の効果は部分奏効 13 例、不変 2 例、評価不能 1 例であった。

(2) 血中 DNA の抽出、回収量の評価

対象となった 16 例全例から血清および血漿を収集し DNA 抽出を行った。血中 DNA の回収量は血漿比べて血清のほうが多かっ

た(平均値; 血清 130.4 ng/5mL, 血漿 24.8 ng/5mL) (図 1)。

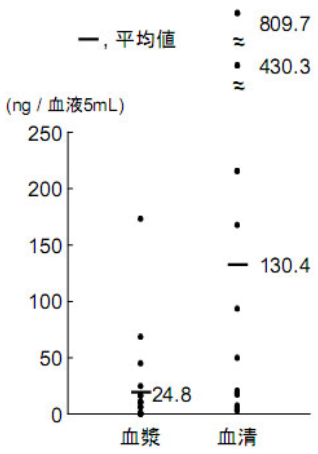


図 1. 処理方法による血中 DNA 回収量の違い

(3) EGFR 遺伝子変異解析結果

全体としては 16 例中 7 例で遺伝子変異を検出することができた(表 1)。D 法の場合には、血漿 DNA から 2 例のみ検出できた。SARMS 法の場合には、血漿 DNA から 7 例、血清 DNA から 5 例検出できた。検出された遺伝子変異は腫瘍組織から検出された遺伝子変異とすべて一致していた。ダイレクトシークエンス法よりも Scorpion ARMS 法の方が、また血清よりも血漿を用いたほうが検出率は高かった。

表 1. EGFR 遺伝子変異検査結果一覧

組織	血漿		血清	
	D 法	SARMS 法	D 法	SARMS 法
DEL	DEL	DEL	Wild	DEL
DEL	DEL	DEL	Wild	DEL
L861Q	Wild	L861Q	Wild	Wild
DEL	Wild	DEL	Wild	Wild
DEL	Wild	Wild	Wild	Wild
DEL	Wild	DEL	Wild	Wild
DEL	Wild	DEL	Wild	DEL
L858R	Wild	L858R	Wild	L858R
DEL	Wild	Wild	Wild	Wild
DEL	Wild	Wild	Wild	Wild
DEL	Wild	Wild	Wild	Wild
DEL	Wild	Wild	Wild	Wild
DEL	Wild	Wild	Wild	Wild
DEL	Wild	Wild	Wild	Wild
L858R	Wild	Wild	Wild	Wild
L858R	Wild	Wild	Wild	Wild

DEL, 欠失変異(exon 19)

(4) WGAを用いた検討

検出感度を高めるために血漿DNAを用いてWGAを加えることの意義を検討した。WGAを加えたほうが、検出感度が上昇した(陽性頻度; WGAあり 9/16, なし 7/16) (表2)。

組織	血漿 DNA+SARMS 法	
	WGA なし	WGA あり
DEL	DEL	DEL
DEL	DEL	DEL
L861Q	L861Q	L861Q
DEL	DEL	DEL
DEL	Wild	Wild
DEL	DEL	DEL
DEL	DEL	DEL
L858R	L858R	L858R
DEL	Wild	Wild
DEL	Wild	DEL
DEL	Wild	Wild
DEL	Wild	DEL
DEL	Wild	Wild
DEL	Wild	Wild
L858R	Wild	Wild
L858R	Wild	Wild

DEL, 欠失変異(exon 19)

(5)治療経過中の血中DNAを用いた獲得体制に関わる2次変異の検出

本研究に参加した16例中4例からEGFR-TKI治療経過中の血液を収集できた。そのうち2例は、EGFR-TKI奏効後増悪が確認されている。しかしながら、4例から得られた全サンプルからT790M変異は検出されなかった。

結論としては、血清よりも血漿サンプルの方が、およびダイレクトシークエンス法よりも Scorpion ARMS 法を用いたほうが検出率は高かった。本研究の問題点として、当初の計画と比べて症例数の集積が不十分であったことが挙げられる。また今後の課題として、当初の目的を達成するためにはさらに高感度の検出系の確立が必要である。

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）

(1) Ishiguro T, Kimura H, Araya T, et al. Eosinophilic pneumonia and thoracic metastases as an initial manifestaion of prostatic carcinoma. Internal Med. 査読有, 47, 2008, 1419-1423

〔学会発表〕（計 10 件）

(1) Kimura H. Using whole genome amplification of plasma DNA can increase the success rate of tumor-derived mutation

表 2. WGA を加えた検体での EGFR 遺伝子変異解析結果

detection in patients with advanced non-small cell lung cancer(NSCLC). CNAPS-VI Hong Kong. 2009. 11. 9-11. Hong Kong.

(2) 丹保裕一、ら. EGFR 遺伝子変異、遺伝子増幅と細胞傷害性化学療法の治療効果の関連性. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会. 2009. 6. 12-14. 東京.

(3) Tambo Y, et al. Prognostic and predictive impact of EGFR and K-ras mutation, and EGFR gene copy number in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) who received first-line cytotoxic chemotherapy. ASCO Annual Meeting 2009. 2009.5.31. Chicago

(4) Kimura H. Detection of micro-dissemination of cancer cells by testing for progastrin-releasing peptide expression in the peripheral blood of SCLC patients. AACR Annual Meeting 2009. 2009. 4. 18-22. Denver.

(5) 木村英晴. 腫瘍代替サンプルを用いた癌由来遺伝子変異の検出. 第49回日本肺癌学会総会. 2008. 11.13. 北九州.

(6) 木村英晴. Suitable Sourse of DNA for a Bool-based test for EGFR Mutations. 第 67 回日本癌学会学術集会. 2008. 10.29. 名古屋.

(7) 木村英晴. 腫瘍代替サンプルを用いた腫瘍由来変異遺伝子検出方法の確立、使用検体の検討. 第 12 回がん分子標的治療研究会. 2008. 6.27. 東京

(8) 木村英晴. ゲフィチニブによる皮膚障害の発現を予測する因子としての血漿中サイトカイン測定の有用性. 第 4 回日本臨床プロテオーム研究会. 2008. 5.10. 大阪

(9) Kimura H, et al. Suitable Sourse of DNA for a Bool-based test for EGFR Mutations. AACR Annual Meeting 2008. 2008. 4.15. San Diego.

(10) Sakai A, et al. Detection of *EGFR* mutations in accessible tissue that is a potential surrogate for tissue. AACR Annual Meeting 2008. 2008. 4.14. San Diego.

〔図書〕（計1件）

(1) 木村英晴. 南行堂. 遺伝子変異検査. 「新臨床腫瘍学-がん薬物療法専門医のために-」(NPO 法人日本臨床腫瘍学会　編）. 2009. 78-84

６．研究組織

(1)研究代表者

木村　英晴（KIMURA HIDEHARU）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40444202