

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430142

研究課題名(和文) 血中循環がん細胞解析を利用した小細胞肺癌の新規治療標的・バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Identification of Novel Treatment Targets and Biomarkers for Small-Cell Lung Cancer by Circulating Tumor Cell Analysis

研究代表者

木村 英晴 (Kimura, Hideharu)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40444202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：【CTCを用いた遺伝子発現解析】小細胞肺癌12例の末梢血単核球分画からRNAを抽出し、RT-PCR法にてCTC由来遺伝子発現の解析を行った。神経内分泌関連および上皮間葉移行関連、血管新生関連の遺伝子発現を検討し、上皮間葉移行関連遺伝子発現を検出することができた。本方法でCTC関連遺伝子発現を検出できることが示唆された。

【血中DNAを用いた遺伝子変異解析】進行期肺癌剖検例4例を対象に、腫瘍組織由来のDNAと血中DNAを用いて、次世代シーケンサーにて遺伝子変異を解析した。血中DNA中の遺伝子変異は、複数病変に共通して存在し腫瘍組織内のallele frequencyが有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：[Gene expression analysis using circulating tumor cells (CTCs)] We extracted RNA from the peripheral blood mononuclear cell fraction of 12 small-cell lung cancer patients and analyzed it for CTC-derived gene expression by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). We investigated neuroendocrine-related, epithelial-mesenchymal-transition-related, and angiogenesis-related gene expression and were able to identify epithelial-mesenchymal transition-related gene expression. The results suggested that it is possible to identify CTC-related gene expression by this method.

[Gene mutation analysis using blood DNA] We analyzed tumor tissue derived DNA and blood DNA from 4 autopsy cases of advanced lung cancer by using a next generation sequencer. The same gene mutations as in the blood DNA were present in multiple lesions, and allele frequency in the tumor tissue was significantly higher.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺癌 血中DNA 循環腫瘍細胞

1. 研究開始当初の背景

現在までに我々は、分子標的薬の薬剤感受性メカニズムおよび血中バイオマーカー研究を精力的に進めており、なかでも非小細胞肺癌における EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性因子や耐性克服に関する研究結果を報告してきた。特に以前から血液検体を用いたバイオマーカーの探索研究を精力的に行ってきた。なかでも血中 DNA を用いた EGFR 遺伝子変異の検出方法は世界に先駆けて報告した。我々は小細胞肺癌に対しても、血液検体を用いて新たな治療標的やバイオマーカーの同定を目指している。

今回我々は、その循環血中腫瘍細胞 (CTC) を利用すれば肺癌にみられる好転移性を解明でき、新たな治療標的分子を見出せるのではないかと仮定した。本研究における CTC の解析法として、QX100™ Droplet Digital PCR システム (Bio-Rad 社) を応用した CTC ドロップシステムの実用化を目指すことを考案した。

2. 研究の目的

1) 小細胞肺癌における CTC の特性を明らかにする。2) 小細胞肺癌の新たな治療標的およびバイオマーカーを同定する。以上当初の目的に加え研究経過の中で以下の目的を追加した。3) 血中 DNA を用いた肺癌関連遺伝子変異検出感度を高める因子を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 進行期肺癌 CTC の採取と遺伝子発現解析
CTC の採取は、患者の末梢血単核球分画を採取し Rosettesep (Stemcell technologies) による顆粒球のネガティブセレクションとサイズ選択性フィルターを用いた ISET 法 (Rarecells 社) による補足を組み合わせて行った。CTC から抽出された RNA を用いて SurePrint G3 Human Exon マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行った。新規治療標的分子候補や新規バイオマーカー候補を選定し、それらの候補遺伝子の発現量を定量 RT-PCR にて遺伝子発現解析を行った。

2) 進行期肺癌患者の循環血中 DNA 中に存在する腫瘍由来遺伝子変異の検出

今回の研究では研究用の採血を行った後に死亡され、剖検を得られた症例が 4 例あった。その症例を対象として、上記の CTC 採取の際に得られた血漿から QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出し、また剖検時の病変組織から腫瘍細胞由来 DNA を抽出した。次世代シーケンサーによる Human Comprehensive Cancer Panel (QIAGEN 社) を用いて上記の DNA に存在する遺伝子異常の解析を行った。血中 DNA の腫瘍組織 DNA から得られた遺伝子異常をそれぞれ比較し、血中 DNA を用いた肺癌関連遺伝子変異検出感度を高める因子を検討した。

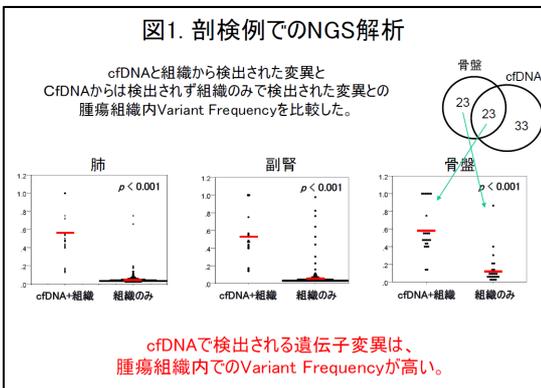
4. 研究成果

1) 進行期肺癌 CTC の採取と遺伝子発現解析
当初計画していた ISET 法では CTC の回収とその後の十分な DNA 回収を行うことはできなかった。そのため当初の計画から変更し、単核球分画から RNA を抽出し CTC 由来遺伝子発現の解析を行った。進行期肺癌 12 例の末梢血単核球分画から RNA を抽出し、RT-PCR 法にて遺伝子発現を解析した。肺がん細胞に特異的に発現する上皮系タンパク質もしくは preproGRP 遺伝子は 12 例中 8 例で検出できた。この 8 例では単核球分画内に CTC が存在するものと考え、単核球分画由来 RNA を用いて、神経内分泌関連および上皮間葉移行関連、血管新生関連の遺伝子発現を検討した。その結果、上皮間葉移行関連遺伝子発現を検出することができ、単核球分画由来 RNA を用いて CTC 関連遺伝子発現が可能であることが示唆された。本研究は、現在マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行っており、その結果を含めて論文発表する予定である。

2) 進行期肺癌患者の循環血中 DNA 中に存在する腫瘍由来遺伝子変異の検出

肺癌患者から回収された循環血中微量 DNA から次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析が可能であることを確認した。本年度は、さらに循環血中微量 DNA から腫瘍由来遺伝子変異を検出できる症例の臨床病理学的特徴を明らかにする検討を進めた。剖検を得られた進行期肺癌 4 例を対象に、剖検で複数の病変臓器から抽出された DNA と死亡前 2 週間以内に得られた循環血中微量 DNA を用いて Lung Cancer Panel (QIAGEN 社) で解析した。循環血中微量 DNA で検出できる遺伝子変異は、複数の病変臓器に共通して存在し allele frequency が有意に高かった (図 1)。

この結果は、本研究にて計画されていたものではないが、研究の過程で新たに得られた知見である。同様の成果は他の研究者からこれまでに報告されておらず、現在論文投稿中である。



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9件)

1) Kimura H, Nishikawa S, Koba H, Yoneda

- T, Sone T, Kasahara K. A Rapid and Sensitive Method for Detection of the T790M Mutation of EGFR in Plasma DNA. *Adv Exp Med Biol*. 2016;924:171-174. doi: 10.1007/978-3-319-42044-8_31. 査読有り .
- 2) Nagai T, Arao T, Nishio K, Matsumoto K, Hagiwara S, Sakurai T, Minami Y, Ida H, Ueshima K, Nishida N, Sakai K, Saijo N, Kudo K, Kaneda H, Tamura D, Aomatsu K, Kimura H, et al. Impact of Tight Junction Protein ZO-1 and TWIST Expression on Postoperative Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis*. 2016;34:702-707. doi: 10.1159/000448860. 査読有り
 - 3) Yoneda T, Koba H, Tanimura K, Ogawa N, Watanabe S, Hara J, Abo M, Sone T, Kimura H, Kasahara K. Postoperative Recurrence of Invasive Thymoma with Cold Agglutinin Disease and Autoimmune Hemolytic Anemia. *Intern Med*. 2016;55:2685-2689. doi: 10.2169/internalmedicine.55.6654. 査読有り
 - 4) Watanabe S, Kimura H, Takato H, Waseda Y, Hara J, Sone T, Abo M, Maeda S, Matsushita T, Kasahara K. Severe pneumonitis after nivolumab treatment in a patient with melanoma. *Allergol Int*. 2016;65:487-489. doi: 10.1016/j.alit.2016.04.009. 査読有り
 - 5) Watanabe S, Waseda Y, Kimura H, Takato H, Ohata K, Kondo Y, Kasahara K, Nakao S. Imatinib for bronchiolitis obliterans after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2015;50:1250-1252. doi: 10.1038/bmt.2015.120. 査読有り
 - 6) Hayashi H, Arao T, Togashi Y, Kato H, Fujita Y, De Velasco MA, Kimura H, et al. The OCT4 pseudogene POU5F1B is amplified and promotes an aggressive phenotype in gastric cancer. *Oncogene*. 2015;34:199-208. doi: 10.1038/onc.2013.547. 査読有り
 - 7) Kimura H, Ohira T, Uchida O, et al. Analytical performance of the cobas EGFR mutation assay for Japanese non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;83:329-333. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.12.012. 査読有り
 - 8) Hayashi H, Arao T, Matsumoto K, Kimura H, et al. Biomarkers of reactive resistance and early disease progression during chemotherapy plus bevacizumab treatment for colorectal carcinoma. *Oncotarget*.

2014;5:2588-2595. doi:

10.18632/oncotarget.1811. 査読有り

- 9) Togashi Y, Arao T, Kato H, Matsumoto K, Terashima M, Hayashi H, de Velasco MA, Fujita Y, Kimura H, et al. Frequent amplification of ORAOV1 gene in esophageal squamous cell cancer promotes an aggressive phenotype via proline metabolism and ROS production. *Oncotarget*. 2014;5:2962-73. doi: 10.18632/oncotarget.1561. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

- 1) Koba H, Kimura H, Nisikawa S, Tambo Y, Sone T, Kasahara K. Detection of EGFR-TKI resistant mutation in tumor samples unexposed to EGFR TKIs. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2016. 2016.4.16-20.
- 2) Shingo Nishikawa, Hideharu Kimura, Hayato Koba, Taro Yoneda, Takashi Sone, Chris Booth, Andrew Webb, Kazuo Kasahara. Non-invasive analysis for T790M mutations of EGFR using a selective amplification method. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015. 2015.4.18-22.
- 3) Kimura H, Nishio M, Daito T, Nishio K. Noninvasive analysis of acquired resistance to EGFR-TKI. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014. 2014.4.5-9.

〔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

木村 英晴 (KIMURA HIDEHARU)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40444202

(2) 研究分担者

笠原 寿郎 (KASAHARA KAZUO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30272967

曽根 崇 (SONE TAKASHI)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授

研究者番号：30420334

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()