

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15187

研究課題名(和文)セルフリーDNAを用いた乳癌の予後予測法の開発

研究課題名(英文)Development of Diagnostic methods for detection of breast cancer using cell free DNA

研究代表者

野口 恵美子(Noguchi, Emiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40344882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳癌患者の血中遊離DNAの変異を次世代シーケンサーで検出し、乳癌の予後予測、個別化医療に貢献することを目的とした。TP53とPIK3CAについてシーケンスを行った。解析結果をCatalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) に登録されている情報と比較したところ、複数の患者で共通してTP53遺伝子の第7エクソンに体細胞変異を検出した。In silico解析の結果、この変異はTP53遺伝子の機能に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate mutations of cell-free DNA (cfDNA) associated with breast cancer using next generation sequencer. We performed target sequences of TP53 and PIK3CA on 5 patients who were diagnosed with breast cancer. Mutations identified in these patients were also annotated with Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) database. We observed one somatic mutation at 7th exon of TP53 in several patients. In silico analysis revealed that this mutation is likely to influence on the function of TP53 protein.

研究分野：遺伝学

キーワード：血中遊離DNA

1. 研究開始当初の背景

近年乳癌に罹患する患者は大きく増加しており、1999年には女性の癌の罹患者数で胃癌を抜いてトップとなった。現在では14人に一人の日本人女性が生涯で乳癌に罹患し(国立がん研究センターがん対策情報センター、がんの統計'13より)、世界的にみても腫瘍による女性の死亡で最も多いのが乳癌によるものであることが報告されている(Global Health Estimates, WHO 2013)。乳癌は増殖が活発で予後が悪いものから、転移もなく予後がよいものまで、様々なサブタイプが存在し、そのサブタイプごとに有効な治療が異なる。癌が発生する過程で体細胞変異が蓄積していくが、乳癌患者ではTP53やPIK3CAの体細胞変異が患者腫瘍組織の10%以上の頻度で検出され(Cancer Genome Atlas Network, Nature 2012)、それらを応用した転移や治療効果の指標とする研究が盛んに行われている。

近年、非侵襲的な腫瘍モニタリングの手法として血中循環腫瘍細胞や血中遊離DNAが注目されている。しかし血中循環腫瘍細胞の検出は特殊な分離装置が必要となる。一方で血中遊離DNAは特別な装置を必要とせずに分離でき、かつ、得られたDNAを使用した次世代シーケンス解析が可能である。

癌から血中に遊離したDNAは癌の体細胞変異を保持しており、採血で検出することができれば少ない侵襲で予後を予測できるバイオマーカーとなり得る。簡易型の次世代シーケンス装置と組み合わせることにより、日常の診療で使用できる可能性が高い。また、血中遊離DNAは採血で得られるため侵襲性が少なく、日常的に繰り返し診断ができるツールとなりうる。

2. 研究の目的

本研究では、乳癌患者の血中遊離DNAの変異を次世代シーケンスで検出し、乳癌の予後予測、個別化医療に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

乳癌と診断された患者5名に対し、血中遊離DNAを用いてTP53およびPIK3CA遺伝子を標的とした次世代シーケンスを行った。使用した血漿量はサンプルあたり0.6-1.0mlとし、血中遊離DNAの抽出にはQIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いた。血中遊離DNAは20 µlのelution bufferに溶解し、Qubit DNA high-sensitivity assay kit

(Invitrogen Corporation)を使用して定量をおこなった。TP53遺伝子およびPIK3CAを標的としたシーケンス用のライブラリはIon AmpliSeq™ カスタムパネル(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts)を用いてターゲット領域の増幅を行い、さらにIon AmpliSeq kit for Chef DL8(Thermo Fisher Scientific Inc.) およびIon Chef system (Thermo Fisher Scientific Inc.)を使用して作成した。Ion PGM (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いてライブラリのシーケンスを行い、得られたデータはIon Reporter softwareのvariantCaller plugin (v5.2.1.39) (Thermo Fisher Scientific Inc.)を使用してヒトゲノムリファレンス(hg19)にマッピングし、体細胞変異の検出を行った。アノテーションを行った変異の中でアレル頻度20%以下の変異を中心に検討した。

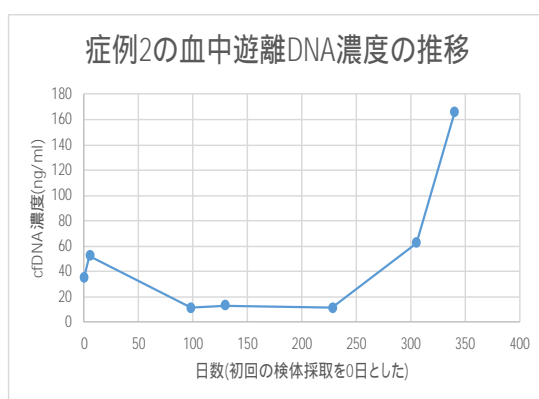
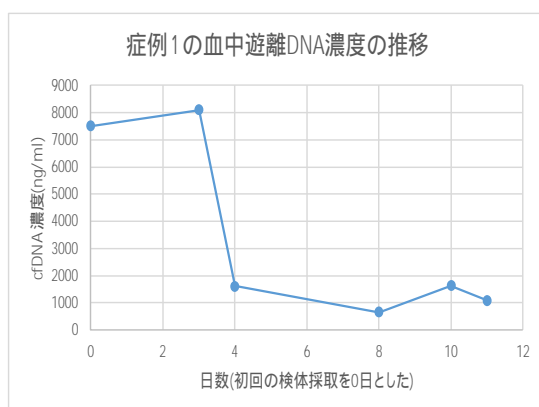
これらのバリエーションについて、Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC)のデータベース、SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)、Polyphen2

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) を用いて解析を行った。

4. 研究成果

血中遊離 DNA の濃度

乳癌患者 5 名から複数回血中遊離 DNA を抽出し、解析を行った。血中遊離 DNA は健常人でも少量存在しており、癌により増加することが知られている。しかし今回の研究では 2 症例において、100 ng/ml を超える濃度の DNA が抽出され、そのうちの 1 例については複数回 1000ng/ml を超える DNA が抽出された。患者 5 名における血中遊離 DNA 濃度は 10 ~ 8106 ng/ml に分布していた。症例 1 と症例 2 の血中遊離 DNA 濃度の推移を示す。



シーケンス解析

TP53 遺伝子ターゲット領域の平均 Depth は 11232 ~ 18109 に分布しており、十分なシーケンスカバレッジが得られていた。各サンプルのシーケンスの On target の割合は 89.9 ~ 97.5% に分布していた。

PIK3CA 遺伝子ターゲット領域の平均 Depth は 4073 ~ 6677 に分布しており、十分なシーケンスカバレッジが得られていた。各サンプルのシーケンスの On target の割合は 85.1 ~ 92.9% に分布していた。

TP53 遺伝子において、5 つの、アレル頻度が 20% 以下のバリエーションを検出し、そのうちの 1 つは multiple nucleotide variant (MNV, CAG AGC) であり、残りの 4 つはいずれも single nucleotide variant (SNV) であった。変異の割合は 2.7 ~ 10.3% に分布していた。5 つの検出されたバリエーションのうち、2 つは IARC TP53 Database

(<http://p53.iarc.fr/TP53GermlineMutations.aspx>) に登録されていた。1 つのバリエーションはイントロン領域の変異で、1 名の患者のみに検出された。第 7 エクソンに存在するミスセンス変異については複数の患者で共通して検出された。この変異は IARC TP53 Database に体細胞変異として登録されている。同一症例が複数回採取された検体を解析し、同じ変異が同定されることを確認した。上記の変異は過去に小児神経細胞膠芽腫と胃癌で報告されている。また SIFT, Polyphen2 を用いた in silico 解析において、TP53 の機能に影響を及ぼす変異であることが予測された。(SIFT score = 0, Polyphen2 = 0.985) 更に別の SNV はナンセンス変異であり、1 名の患者で観測された。この変異は IARC TP53

Database に体細胞変異として登録されていない新規の変異であった。

PIK3CA 遺伝子において、アレル頻度が 20% 以下のバリエーション (3.4%、3.1%) を 2 つ検出しいずれも SNV であった。1 つのバリエーションはイントロン領域の変異で、1 名の患者のみに検出された。他方のバリエーションはエクソン領域のミスセンス変異であり、1 名に検出された。この変異は、過去に cosmic database

(<https://grch37-cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) や dbSNP database

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) に登録されておらず、新規のバリエーションであると考えられた。SIFT, Polyphen2 を用いた in silico 解析において、PIK3CA の機能に影響を及ぼす変異であることが予測された。(SIFT score = 0.004, Polyphen2 = 0.994)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 :

出願年月日

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

野口 恵美子 (NOGUCHI, Emiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号 : 40344882

(2) 研究分担者

坂東 裕子 (BANDO, Yuko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号 : 00400680