

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： Liquid Biopsy のゲノムシーケンス解析による癌の変異プロファイル
2. 研究開発代表者： 藤本明洋（理化学研究所統合生命医科学研究センター 副チームリーダー）
3. 研究開発の成果

がんゲノムは、がんの進行や治療反応に伴って変化する高い柔軟性と、個々のがん細胞が異なった変異をもつという不均一性を有し、ゲノム情報を指標としてがんの個別化治療やゲノム医療を実践していくには大きな障害となっている。その柔軟性に対応していくためには、治療の過程においてがんゲノムを随時モニターしていかなければならないが、造血系腫瘍と異なり、固形腫瘍においては病態の変化に伴って経時的に連続して生検を行うことは不可能である。また、個別化医療やゲノム医療の適応となるのは主に切除不能の進行・再発症例であり、分子プロファイル作成のためのがん組織の採取を生検にて行うのは浸襲性が高く困難なことが多く、採血によってがんの分子プロファイルを作成するという「liquid biopsy」の概念が、がんの個別化医療やゲノム医療において注目されている。本研究は、これまで我々が取り組んできた肝臓がんゲノム(Nat Genet 48: 500-509 (2016))を対象に、容易に採取できる血液循環 DNA (cell-free DNA: cfDNA) のゲノムシーケンス解析を試み、同じ症例の切除標本から複数箇所採取した腫瘍 DNA でのゲノムシーケンス解析も行って、腫瘍の変異プロファイルとの比較検討を行うものである。この比較検討にて、情報解析も含めた、cfDNA でのゲノム変異プロファイルを作成するための技術基盤の改善、構築を行うことを目的とする。

進行・再発肝臓がんにおいては術前に血管塞栓療法 (TACE) を行うことが多く、その際に大量の腫瘍由来の cfDNA の検出が期待され、cfDNA のゲノム解析に非常に適したがん種であり、多数の肝臓がんの治療にあたっている広島大学消火器内科と共同でがん由来の cfDNA が含まれる血漿および腫瘍組織を収集した。本年度は、10 例の肝臓がん症例について、適切なインフォームドコンセントを得たうえで、TACE 後の血漿を採取した。これらの血漿より QIAGEN キットを用いて、血漿 cfDNA の抽出を行った。

比較的多くの cfDNA が抽出でき、また、該当する肝臓がんの切除凍結組織が確保できた 3 症例 (RK258, RK342, RK350) について、cfDNA、腫瘍組織から抽出した DNA、およびリンパ球由来の DNA より NGS 用のライブラリー構築を行った。それぞれのライブラリーについて、肝臓がんの変異遺伝子等、166 遺伝子領域を標的とした配列約 1Mb を hybridization にて濃縮を行い (SureSelect Human Exome V5)、NGS にてシーケンスを行った。

マッピングは BWA-SW software、PCR duplication の除去は Picard software、変異候補の選出は varscan2 を用いた。マッピング率は、すべてのサンプルで 99.5% を超えていた。PCR duplication rate は、血漿 cfDNA で著しく高く、50% を超えていた。このことは、微量の cfDNA からライブラリー構築する際の PCR による増幅が影響していると考えられた。変異の一致率は、サンプル間で大きく異なっていた。RK258 は、腫瘍と比べ血漿 DNA から多くの変異が検出されていた。RK350 は、腫瘍、血漿ともに変異数が少なかった。RK412 では、1 つの腫瘍から多くの変異が検出されていた。また血漿 DNA から検出された変異は少なかった。このパターンの違いは、腫瘍の多様性を反映しているのかもしれない。より多くのサンプルを解析し比較し、臨床情報や DNA 量と検出される変異数との関連を調査する必要があると思われた。また、低頻度の変異の検出は、依然困難な課題である。血漿由来 DNA の量は少なく、得られた結果のサンガー法等での検証実験が困難である。解析の精度を確認するために、腫瘍ゲノムを異なる割合に混合したサンプルし、シーケンスを行っており、今後は解析パイプラインの精度検証と改良を行うとともに、さらにサンプル数を増やした解析を実行する予定である。