

難治がんに対する ctDNA モニタリングを用いた再発予測法の開発

大阪大学 医学部 消化器外科

山下 公太郎

1. 諸言

近年、血液中に存在するがん細胞由来の cell free DNA (cfDNA) を治療や転移再発診断に用いる研究が注目されており、がんの存在と cfDNA 量との間に相関性があることもこれまでに多数報告されている。しかし、cfDNA は存在量が非常に少なくまた小断片であることから検出が難しく、臨床応用するためには解析法の最適化が求められている。既存の解析法における課題は患者間・実験者間のバイアス補正、検体間のバイアス補正、遺伝子検査プロセスの簡略化、絶対定量可能な手法の開発など複数挙げられる。われわれはこれらの課題を解決するため、ポリエチレンビニルアルコールから製造された吸水性スポンジ (PVA スポンジ) を応用した、新たな遺伝子解析法 (PVA スポンジ法) の開発を行ってきた。PVA スポンジ法では従来の DNA 抽出や精製工程を省略可能であり、血液サンプルから cfDNA をリアルタイム PCR で安定して検出可能、さらに定量性にも優れている可能性がある。

消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor : GIST) は原因遺伝子変異が同定されている疾患 (c-kit 遺伝子や PDGFRA 遺伝子の突然変異) であり、さらに治療耐性獲得時には特定の部位に二次遺伝子変異が起こることが明らかにされている¹⁾。当科では GIST 患者の診療を数多く行っているが、現在の GIST 診療の大きな課題の一つが薬剤耐性への対応である。特にイマチニブ耐性の早期診断と、2 次変異部位に対応した二次治療選択は最重要課題と考えられる。しかしながら 2 次変異の診断には体腔内に存在する GIST 病変組織を確保する必要があるため、針生検や手術生検等侵襲性の高い手技が必要であり、実施できない場合も多く経験する。そこでわれわれは circulating tumor DNA (ctDNA) を用いた 2 次変異モニタリングにてイマチニブ耐性を早期診断する方法に着目した。上述の通り、GIST は 1 次変異、2 次変異ともに hot spot が同定されており、ターゲットを定めてモニタリングすることが可能であり、本研究の対象に適していると考えている。われわれの先行研究でも ctDNA 量のモニタリングによる GIST の病勢評価が可能であることを確認済みである。

今回、PVA スポンジ法による cfDNA モニタリング手法を最適化すること、当院にて治療中の GIST 患者を対象とし血漿中の ctDNA における 2 次遺伝子変異をモニタリングし、

図 2

QIAanmp DNA Blood Mini Kitによる精製との比較

※サンプルとして、各DNA精製溶液を5μLずつPCRへ持ち込んだ

<QIAanmp DNA Blood Mini Kit>

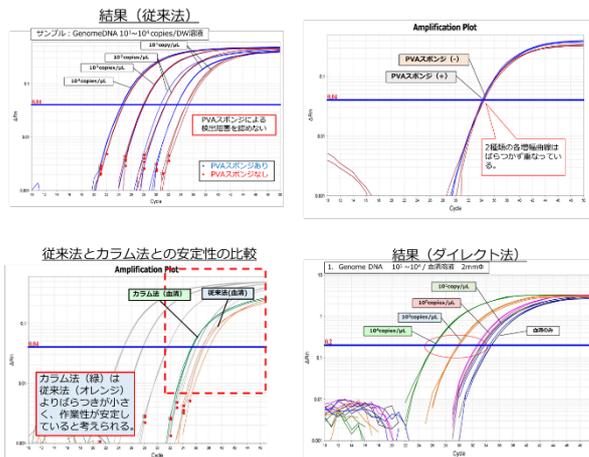
Sample	Ct値	Ct値平均	Ct値標準偏差
標準ヒト血清	36.5	37.1	0.5
	37.1		
	37.5		

1.6サイクル差 = $2^{1.6}$ 差
 ↓
 DNA量で考えると約3倍
 PVAスポンジ法の方が検出量が多い

<PVAスポンジ法>

Sample	Ct値	Ct値平均	Ct値標準偏差
標準ヒト血清	35.5	35.5	0.1
	35.4		
	35.6		

図 3 従来法とカラム法におけるDNA検出安定性の比較



サンプルをカラムを用いて遠心分離し検体を抽出するカラム法を考案した。図 3 (左下) に従来法とカラム法との DNA 検出における安定性の比較を示す。カラム法では従来法に比べて各検体間のばらつきが少なく、より安定的な方法であると考えられた。しかしながら多量のサンプルを効率よく測定することが求められる臨床応用には遠心分離等の作業工程をさらに短縮することが望ましいと考えられた。この課題を解決するために考案した、サンプルを添加した PVA スポンジをダイレクトに検体として用いるダイレクト法では、血清成分によると考えられるリアルタイム PCR での検出阻害を認めたが、阻害物質を含むサンプルからの増幅が可能である既存キットのリアルタイム PCR 試薬を併用することにより安定した

結果を得ることができた (図 3 右下)。今回検討した 3つの手法の比較を表 1 に示す。精製効率や測定の安定性の面からはカラム法が優れた方法であるが、作業の簡略化や多くのサンプルを処理するといった面からはダイレクト法が有用であると考えられた。

さらに、PVA スポンジ法により実際のがん患者の血液中より cfDNA の定量が可能であるかを検証するため、食道癌患者の血漿サンプルを用いて PVA スポンジ法にてリアルタイム PCR を用いて解析を行った結果を表 2 に示す。未だ小数例の検討ではあるが、ステージの進行した症例では cfDNA コピー数が多い傾向を認めた。

4.考察

今回、PVA スポンジ法による cfDNA 測定が実施可能であるこ

表1 各方法の比較

	従来法	カラム法	ダイレクト法
抽出精製の操作性	×	○	○
作業の安定性	×	○	○
解析結果の安定性	△	○	△
精製効率の高さ	×	△	△
検出阻害の受けにくさ	△	○	△
大規模解析	×	△	○

(※抽出精製法の詳細： 手作業で絞る 遠心分離 不要)

表 2 食道癌患者におけるcfDNAコピー数

健常者	cT (原発腫瘍の拡がり)	cN (リンパ節転移)	cM (遠隔転移) 1 (多発肝、 多発LN、皮膚)	ステージ	Ct値平均	コピー数平均 (血液1μLあたり)
P1	3	4	1 (多発肝、 多発LN、皮膚)	4	30.6	153
P2	2	1	0	2b	35.7	4
P3	3	2	0	3b	35.3	5
P4	4	1	0	3c	34.6	8
P5	3	3	1 (多発LN、 肺)	4	32.6	46
P6	3	4	1 (多発LN)	4	32.6	36
P7	3	3	1 (骨転移)	4	31.1	104
P8	3	1	1	4	33.7	16
P9	4b	2	0	3c	35.4	4

※3回実験を繰り返した結果の平均値を示す

とを明らかにした。迅速かつ簡便で高感度な解析が可能であったことから、血液中 cfDNA モニタリングによるがんの早期転移再発診断への可能性が示唆された。精密な測定が求められる場合にはカラム法が、多くのサンプルを効率よく測定することが求められる場合にはダイレクト法が適しているのではないかと考えられた。実際にダイレクト法を応用した新型コロナウイルス感

染症に対する PCR 検査を臨床実施しており、効率よく運用可能であった。

PVA スポンジ法は、患者間・実験者間のバイアス、検体間バイアス、遺伝子検査の多段階プロセス、検体ロス、定量性等、既存の測定法が抱える課題を解決する可能性があり、今回、血液から従来の DNA 抽出や精製工程を除き、リアルタイム PCR で安定した検出が可能であること、定量性に優れていることを確認した。その他、PVA スポンジは利用目的に応じた形に自在に設計できる、常温で長期的な保存、輸送が可能である等、研究現場から臨床現場まであらゆる場所での活用が可能である可能性がある。

今後は作業工程の改良やそれに基づく解析の安定性改善など解析条件を整え、最終的に最も適切な解析条件を確立し、GIST 患者の臨床サンプルを用いた測定、解析研究を進めていく予定である。

5. 結語

PVA スポンジを用いた血中 DNA 測定法を開発し、臨床検体を用いた測定の実施可能性を示した。今後は測定法の改良を引き続き進めるとともに、臨床検体を対象とした測定解析研究へ移行する予定である。

6. 文献

1) Michael C Heinrich, Robert G Maki, Christopher L Corless, Cristina R Antonescu, Amy Harlow, Diana Griffith, et al. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. J Clin Oncol. Nov 20 2008;26(33):5352-5359.

7. 成果発表

学会発表

- Kiso M, Yamashita K, Takahashi T, Yamasaki M, Saito T, Tanaka K et al. Development of cancer diagnostics method using PVA sponge to apply cell-free DNA in blood. The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Hiroshima. 2020.