

## 論文の内容の要旨

論文題目 婦人科癌患者における血中循環腫瘍ゲノムの解析

氏 名 後藤 健吾

ヒト血中に無細胞の遊離DNA (cell-free DNA, cfDNA) が存在していることは古くから知られていたが、その由来や生物学的意義は長らく不明であった。近年になり、がん患者のcfDNA中に腫瘍細胞由来のDNA (circulating tumor DNA, ctDNA) が存在することが示されたことで、血中のDNAを対象とした新たながん診断技術への関心が急速に高まっている。これまで腫瘍組織の一部を採取して行っていた生検 (バイオプシー) に対し、検査対象が血液であることから「リキッド・バイオプシー」とも呼ばれるこの方法は、従来法と比べて患者への侵襲性が低く、繰り返し採取が可能であり、さらには局所だけでなく全身に転移した癌の状態を把握できる可能性があることから、再発モニタリングや薬剤効果判定、早期診断等の様々な場面において、高い有用性を持った診断技術になりうるものと期待されている。

血液1mlあたりに含まれるcfDNA量はおよそ数十から数百ng程度とごく微量である。cfDNAに含まれるctDNAの割合はがんの種類や進行度により様々であることが報告されており、末期がん患者においては腫瘍由来DNAの割合が50%を超えるような報告がある一方で、早期患者においては1%に満たないという例も多く見られる。このような例においては、Taqman PCR等の従来技術は検出感度不足により役に立たない可能性が高く、次世代シーケンサやデジタルPCRといった高感度遺伝子解析技術の適用が必須といえる。すなわち、cfDNAおよびctDNAの分子的性状や生物学的意義に関する理解を深めること、様々ながんの症例における情報を蓄積すること、および、高感度検出のための方法論を確立することが、血中循環腫瘍ゲノムの研究において現在求められている課題といえる。本研究では、次世代シーケンサを解析プラットフォームとして使用し、婦人科癌患者の血中循環腫瘍ゲノムの解析を行うことで、cfDNAを対象としたがん診断技術開発のための基盤となる情報を獲得することを目的とした。

本研究の前半では、全ゲノムシーケンス法を用いて卵巣癌患者のcfDNAを解析することにより、血中循環ゲノムの分子性状の解明を試みた。cfDNAの大部分は160-200bp程度の長さに断片化された状態にあり、これはヌクレオソーム単位で切断された結果であると考えられている。ヌクレオソーム構造の状態に応じてゲノムの切断されやすい箇所が変わるため、cfDNA中に全ゲノム配列が均等に含まれていると考える保証はない。このことは、cfDNAないしctDNAの特定領域をバイオマーカーとして用いる際に、対象領域の選び方によってマーカーの検出されやすさが大きく変化する可能性があることを意味しており、臨床応用の大きな課題となりうる。全ゲノムシーケンス解析の結果、cfDNAには全ゲノム領域がほぼ均一に含まれており、このため原発腫瘍に大きなコピー数変化が存在している場合には、少なくともその一部が血中に反映され観察出来ることが明らかとなった。一方、転写開始点 (TSS) 周辺に注目して解析を行うことにより、ヌクレオソーム単位で切断された痕跡が、TSS周辺における特徴的なリード分布の偏りとして観察されることが示された。さらに同一患者の原発腫瘍のゲノム変異とcfDNAから見つかった変異の比較解析を行った結果、原発腫瘍に存在する変異の一部は確かに血中にも存在するが、原発腫瘍の全てのゲノム変異が均一に血中に反映されるわけではないことが明らかとなり、原発腫瘍とは異なる変異を持つサブ集団の変異プロファイルが同時に血中に反映されている可能性を示唆する結果が得られた。

本研究の後半では、子宮体癌患者の検体を用いて、実際の臨床応用に近い条件下におけるctDNA検出の実践を行った。cfDNA中には正常細胞由来のDNAも多く含まれているため、腫瘍由来のDNAを特定するためには、腫瘍細胞に特異的なゲノム変異をマーカーとして用いる必要がある。本研究では、まず全エクソーム解析により原発腫瘍の網羅的な遺伝子変異プロファイルを作成し、その結果を参照することで血中検出のための変異マーカーを選択した。続いて次世代シーケンサを用いたターゲットアンプリコンシーケンス法により、子宮体癌患者の血中からのctDNA検出を実施した。stage IIIの3症例を対象とし、合計10種類の変異マーカーについて血中検出を試みた結果、7つの変異に関しては0.2-1%という低頻度で検出された。一方で、異なる変異マーカーを用いた場合に、同一症例からであっても血中検出が出来る場合と出来ない場合があることが示された。

本研究の成果は、婦人科癌患者の血中循環腫瘍ゲノムの分子的性状と、その血中検出法に関して新たな知見を提供するものである。本研究の成果が、がんのリキッド・バイオプシーの実用化に向けた基盤となり、適正な臨床応用へと繋がることを強く期待する。