

ミニレビュー

分子病理学ハイライト

No. 1

リキッドバイオプシーによる診断技術の開発

Recent advance of liquid biopsy

東京医科大学分子病理学分野：黒田 雅彦

Department of Molecular Pathology,

Tokyo Medical University : Masahiko KURODA

1. はじめに

近年、リキッドバイオプシーという聞き慣れない検査法の名前を耳にする読者が多くいらっしゃると思います。リキッドバイオプシーは、分子標的医薬品の開発や、がんの早期発見に繋がる可能性があることから、現在大きな関心を集めています。具体的には、病理診断で行う組織採取による検査を、組織材料のかわりに侵襲度の低いリキッド（液体つまりここでは血液を意味する）を用いて行う検査の事です。私のような病理医の立場からすると、バイオプシーと呼ぶからには、疾患の確定診断がつかないといけなると考えます。一方で、次世代シーケンサーや Digital PCR 法など最近の急速な検出系の技術進歩が、リキッドバイオプシーの普及を後押ししています¹⁻³⁾。

2. リキッドバイオプシーとは

さて、このリキッドバイオプシーの対象となるのは、血液中に存在する核酸を含めた様々な微量の生体分子となります。具体的には、大きく以下の5つに分類されます²⁾³⁾ (図1)。

- a. Circulating tumor cells (CTCs)
- b. cfDNA (Cell free DNA)
- c. cfRNA (Cell free RNA, protein complex RNA)
- d. Extracellular vesicles/exosome (EV)
- e. Platelet RNA

a. Circulating tumor cells (CTCs)

腫瘍細胞の生物学的特徴として、浸潤、転移能が

あります。腫瘍が転移を起こすため、血液中に腫瘍細胞が循環しますが、この血液中に遊離している腫瘍細胞を Circulating tumor cells (CTCs) と呼びます。この遊離した、転移する可能性のあるがん細胞を、上皮細胞のマーカーである、サイトケラチンや EpCAM (CD326) を用いて、末梢血からのソーティング技術で検出します。現在では、この CTC の検出法は、FDA に認可され、EpCAM をマーカーとして乳がん、前立腺がん、大腸がんで臨床応用されています。一方で、この技術の弱点は、検出対象となる血液中に流れる腫瘍細胞が、転移を示す進行がんでも、血液中 1 個/ml 程度と少ない事です。さらに CTC は Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) の変化が起きているため、EpCAM 等の上皮性マーカーが減弱している事があります。したがって、検出感度の向上のため、さらなる特異的なマーカーの開発が必要と考えられています。

b. cfDNA (Cell free DNA)

cfDNA は文字通り、血液中に循環している DNA の事です。がん患者の cfDNA 量は、健常人よりも多いことが報告されていますが、がん患者の平均で、17-20 ng の DNA が 1 ml の血液中に循環しています。これまでこれらのがん患者の cfDNA の由来は、当初は大部分が CTC 由来と考えられていました。しかし、細胞 1 個あたりの DNA 量は約 6 pg であり、がん患者の平均 DNA 量から推測すると、約 200 個のがん細胞が循環していることとなります。しかし、実際の CTC は血液中 1 個/ml 程度ですので、cfDNA の大部分は、生きている細胞の DNA ではなく、細胞のアポトーシス、壊死に由来すると考えられます。

さて、現在がん特異的な cfDNA の検出は、リキッドバイオプシーにおいて最も注目されています。特に肺がんや大腸がんのように、ドライバー遺伝子が存在し、その分子標的医薬品の薬理効果がドライバー遺伝子の変異に相関する場合に威力を発揮します。一方で、必ずがん細胞の周囲には、正常な遺伝子を有する多数の間質細胞および、リンパ球等の免

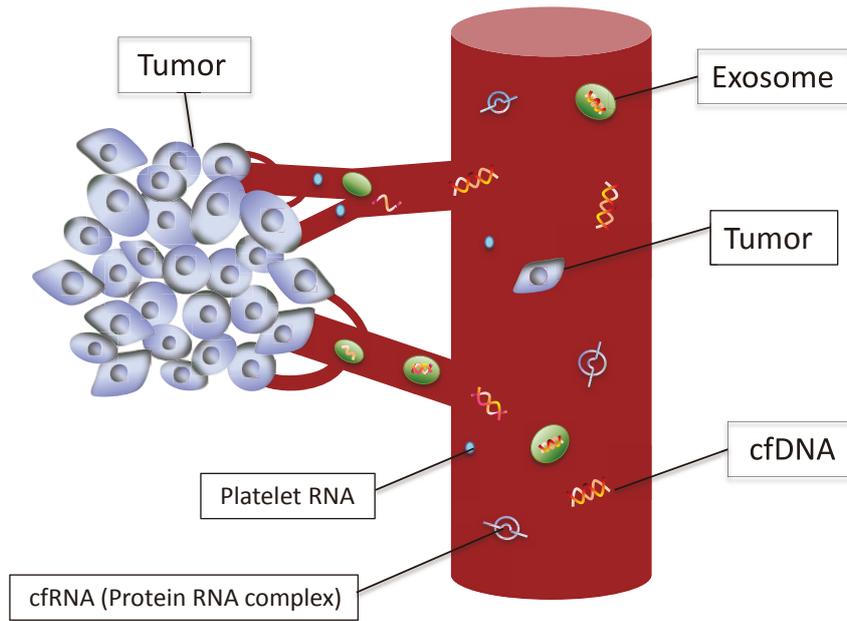


図1 血液中を循環する腫瘍由来の生体物質の種類

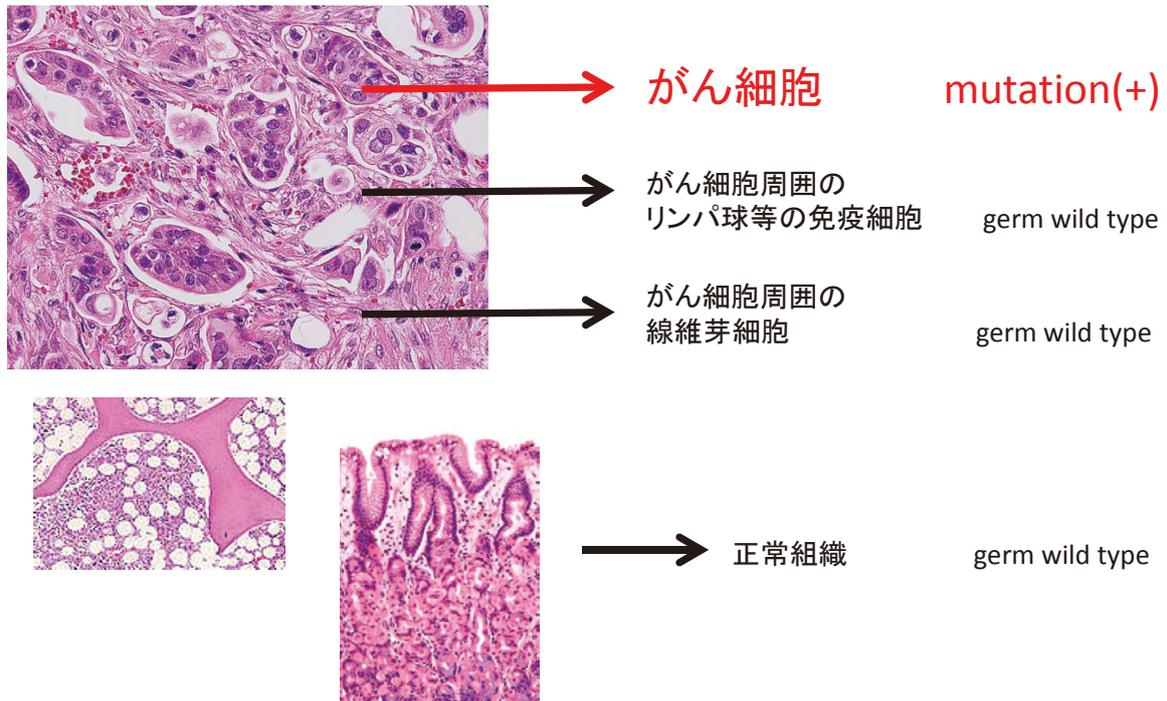


図2 がん患者の Cell free DNA の種類

疫細胞が集まっています (図2)。したがってがん胞巣から血液中に放出されて循環するがん細胞由来の cfDNA は、極めて量が少ないと考えられます。また、cfDNA の長さは、血液中の DNA 分解酵素によって 180-200 bp と細断化されているため、遺伝子変異の検出が大変難しい状態となっています。そ

こで、検出には BEAMing 法をはじめとした Digital PCR が基盤技術として用いられます。

c. cfRNA (cell free RNA, protein complex RNA)

cfRNA の正体は、protein complex RNA と呼ばれる、microRNA (miRNA) とその結合タンパク質である AGO2 の複合体です。血液中に循環している

RNAは、この protein complex RNA と後述する EV に由来するものです。これまで、多くの疾患において、患者血清中の miRNA が多数例報告されています。特にがんにおいての報告が 90% 以上を占めます。一方、臨床応用での問題となっているのは、血液中 miRNA の標準化です。様々な施設が、独自の内部標準を用いているため、多施設間での評価が難しくなっています。β アクチンのようにタンパク質定量で用いられる内部標準 miRNA が決定されれば、miRNA 測定が幅広く臨床応用されることが期待されています。また、PCR 法やマイクロアレイ法といった検出系の違いにより、miRNA の結果の違いも指摘されています。

d. Extracellular vesicles/exosome (EV)

細胞から分泌される膜小胞体は、分泌経路、大きさ、構成分子または分泌する細胞の種類によって、エクソソーム (Exosome)、マイクロベジクル (Microvesicles)、アポトーシス小体 (Apoptotic vesicles) に細かく分類されていますが、現在は、国際学会により Extracellular vesicles (EV) と呼ぶことが提唱されています。リキッドバイオプシーにおいては、この EV の膜表面の分子や EV 内部の miRNA が標的となります。疾患によって発現が変化する EV タンパク質や miRNA は、これまでにない新たな疾患マーカーとして期待されます。

e. Platelet RNA

最近、オランダの Wurdinger のグループから、血小板に存在するがん由来の RNA (Tumor-educated blood platelets, TEPs) が報告されました⁴⁾。彼らは、がん患者の血小板中に RNA が存在することを見だし、その RNA が、がん由来の配列をもっている事を発見しました。血小板は簡単に採取可能であり、新たなリキッドバイオプシーの手法として、多くの

研究者の注目を集めています。

3. おわりに

Digital PCR によって、血液中の腫瘍由来の 200 bp 程度の微量 DNA から、がん遺伝子の変異を確実に捉える事が示され、リキッドバイオプシーに対する大きな期待は高まっています。しかし、がん特異的な遺伝子変異を捉えることでがんの確定診断は可能になりましたが、EV や cfRNA の定量的な診断はまだ臨床応用に至っていません。それには、標準的な EV、miRNA 等の血液サンプルの精製法を確立する必要があります。一方安価で、安定して微量サンプルの測定が可能な機器の開発も期待されています。これらの技術革新により、定量化技術が開発されるのが、今後のリキッドバイオプシーの普及にとって大変重要になってくると考えられます。

文 献

- 1) Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS : Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA : Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res* **21** : 4786-800, 2015
- 2) Alix-Panabières C, Pantel K : Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* **14** : 623-631, 2014
- 3) Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K : Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* **11** : 426-437, 2011
- 4) Best MG, Sol N, Kooi I, Tannous J, Westerman BA, Rustenburg F, Schellen P, Verschuieren H, Post E, Koster J, Ylstra B, Ameziane N, Dorsman J, Smit EF, Verheul HM, Noske DP, Reijneveld JC, Nilsson RJ, Tannous BA, Wesseling P, Wurdinger T : RNA-seq of tumor-educated platelets enables blood-based pan-cancer, multiclass, and molecular pathway cancer diagnostics. *Cancer Cell* **28** : 666-676, 2015