

KRAS mutation analysis of single circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2016-11-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 近藤, 侑鈴 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10470/31575

主 論 文 の 要 約

KRAS mutation analysis of single circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer

邦題 一細胞単離した末梢血循環癌細胞における KRAS 遺伝子変異解析

東京女子医科大学大学院

外科系専攻消化器がん化学療法分野

(指導: 山本雅一教授)

(指導: 林和彦教授)

近藤 侑鈴

BMC Cancer に投稿予定

【目 的】

近年、分子標的治療薬の発展に伴い、腫瘍組織の分子生物学的解析が治療選択に重要となった。循環癌細胞 (CTCs) は予後予測や治療効果判定マーカーとして知られてきたが、リアルタイムの腫瘍組織の変化を反映している可能性があり、CTCs の分子生物学的解析により液体生検としての有用性も期待されている。腫瘍組織の高い不均一性を鑑みると正確な CTCs の分子生物学的性質の評価には 1 細胞レベルでの解析が必要であると考えられ、今回、我々は患者末血中より CTC を単離回収し、single CTC における KRAS 遺伝子変異解析を行った。

【対象および方法】

CTCs の検出、濃縮には既存の Cell Search[®] System (CS) を用いた。CS は抗 EpCAM 抗体が結合した磁気ナノビーズを用い、血中から上皮系細胞を検出し、抗原抗体反応により CTC を識別する。回収には、国内で新規開発された細胞集団から蛍光を発する細胞を蛍光強度に応じて単離回収する装置である ASONECell picking system (ASONECell) を用いた。

ASONECell の細胞認識能力の評価目的に、健常人血液 7.5mL 中に 1500 個に濃度調整した A549 細胞を混入し、CS で細胞数を測定、その後濃縮 CTC 溶液に ASONECell を用いて細胞数の再測定を行った。また、単離回収した A549 細胞 24 個について 1 細胞ごとに KRAS 解析を行った。転移性大腸癌患者 61 例から末梢静脈血を採取し、CTC 陽性の 27 例から CTC を回収した。2 個以上の CTC を回収でき、原発組織の解析が可能であった 11 例から回収した計 283 個の CTC において KRAS 解析を行った。107 個の CTC は細胞融解後 KRAS 特異的 PCR を行い、ダイレクトシーケンスにより解析、残りの 176 個の CTC は全ゲノム増幅 (WGA) を行った後 KRAS 特異的 PCR を行い、ダイレクトシーケンスにより解析した。

【結果】

腫瘍細胞数の測定では、ASONECell で平均値 1318 細胞を認識し、CS との認識率は 73.4%であった。回収した 24 個の A549 細胞で 87.5%に既存の変異を確認できた。臨床検体より回収した single CTC 解析では、WGA を行わなかった 107 個の CTC のシーケンス成功率は中央値 70%、WGA を行った 176 個の CTC のシーケンス成功率は中央値 86.6%であった。9.1%に原発巣と CTC 間で KRAS 変異に差を認めた。1 症例では解析した 3 細胞中 2 細胞に G12D 変異を認め、ヘテロ変異とホモ変異の細胞を認めた。原発組織が野生型であったが CTC では変異を認めた別の 1 症例では、G13D と G12D の異なる変異をもつ CTC を認めた。

【結論】

臨床検体より CTC を単離回収し、1 細胞レベルでの KRAS 変異解析に成功した。CTC 1 細胞レベルで heterogeneity が示唆された。