

胃癌組織型とホルマリン固定後パラフィン包埋検体からの DNA 抽出濃度の関係：次世代シーケンサーによる 遺伝子解析のために

市川 寛¹⁾・島田 能史¹⁾・永橋 昌幸¹⁾・亀山 仁史¹⁾
坂田 純¹⁾・小林 隆¹⁾・若井 俊文¹⁾
井筒 浩²⁾・兒玉 啓輔²⁾・中田 光隆²⁾

1) 新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野（第一外科）

2) デンカ株式会社 デンカイノベーションセンター ライフイノベーション研究所
ダイアグノスティクス研究部

Association between Histopathologic Type and Concentration of Extracted DNA
from Formalin - fixed Paraffin - embedded Samples of Gastric Cancer:
Comprehensive Analysis of Genomic Alterations Using Next - generation Sequencer

Hiroshi ICHIKAWA¹⁾, Yoshifumi SHIMADA¹⁾, Masayuki NAGAHASHI¹⁾, Hitoshi KAMEYAMA¹⁾,
Jun SAKATA¹⁾, Takashi KOBAYASHI¹⁾, Toshifumi WAKAI¹⁾,
Hiroshi IZUTSU²⁾, Keisuke KODAMA²⁾ and Mitsutaka NAKADA²⁾

1) *Division of Digestive and General Surgery, Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences*

2) *Diagnostics Research Department, Life Innovation Research Institute,
Denka Innovation Center, Denka Company Limited*

要 旨

【緒言】近年、様々な癌種において悪性度に関わる driver 遺伝子が発見され、その遺伝子が関与するシグナル伝達経路を標的とした分子標的薬の開発が盛んに行われている。今後は次世代シーケンサーを臨床検査に応用した clinical sequencing により driver 遺伝子異常を同定し、患者個々に最適な薬剤を選択することが必要になる。その際に問題となるのは臨床検体の取り扱いである。特に胃癌は組織型ごとに腫瘍組織中のがん細胞の密度にばらつきが大きく、組織型ごとに抽出された DNA 濃度や質が次世代シーケンサーでの解析に耐えるか否かを明らかにする事は重要である。本研究の目的は、胃癌腫瘍組織からの DNA 抽出結果と組織型との関係を検討し、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を想定した DNA 抽出における注意点を明らかにすることである。

【方法】胃切除を施行された胃癌 100 症例のホルマリン固定後パラフィン包埋 (FFPE) 検体を対象とした。組織型の内訳は乳頭腺管癌 (pap) 1 例、高分化型管状腺癌 (tub1) 9 例、中分化

Reprint requests to: Hiroshi ICHIKAWA
Division of Digestive and General Surgery,
Niigata University Graduate School of Medical and
Dental Sciences,
1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器・一般外科学分野（第一外科） 市川 寛

型管状腺癌 (tub2) 45 例, 充実型低分化型腺癌 (por1) 12 例, 非充実型低分化型腺癌 (por2) 24 例, 印環細胞癌 (sig) 6 例, 粘液癌 (muc) 3 例であった。腫瘍含有割合が最も高い領域を選択し, 20 μ m に薄切した切片から組織を削り取り (スクレープ), DNA 抽出に用いた。単位面積当たりの DNA 濃度 (ng/ μ l/mm²) や断片化 (Q-ratio : [129 bp]/[41 bp]) について組織型間で比較検討した。

【結果】100 症例全ての検体から次世代シーケンサーの解析に十分な DNA を抽出することができた。抽出に用いた領域の腫瘍含有割合は por2, sig, muc で有意に低かった。単位面積当たりの DNA 濃度は pap/tub1/tub2/por1 群 (中央値 1.05 ng/ μ l/mm², 範囲: 0.07 ng/ μ l/mm² - 2.75 ng/ μ l/mm²) と比較して, por2/sig/muc 群 (中央値 0.75 ng/ μ l/mm², 範囲: 0.08 ng/ μ l/mm² - 1.63 ng/ μ l/mm²) で有意に低かった (p -value = 0.04)。一方, Q-ratio については 2 群間に有意な差は認められなかった。

【結論】胃癌において, 組織型が por2, sig または muc の FFPE 検体から抽出される DNA 濃度は他の組織型と比較して低値である。上記の組織型に該当し, 腫瘍含有割合が低い検体では, 抽出に用いる切片枚数やスクレープする組織の面積を増やすといった対策を講じることが肝要である。

キーワード：次世代シーケンサー, 胃癌, 組織型, ホルマリン固定パラフィン包埋検体, DNA 抽出, DNA 濃度, DNA 断片化

緒 言

次世代シーケンサーの登場により, 短時間で DNA 配列情報を網羅的に解析することが可能となった。近年では, この次世代シーケンサーを用いた研究により, 様々な癌種において悪性度に深く関わる driver 遺伝子が同定された¹⁾。それに並行して, driver 遺伝子が関与するシグナル伝達経路を標的とした分子標的薬の開発も盛んに行われており²⁾。一つの癌種に対して複数の分子標的薬を選択して使用できる時代になりつつある。今後は, 次世代シーケンサーを臨床検査に応用した clinical sequencing により driver 遺伝子異常を同定することで治療効果を予測し, 患者個々に適切な薬剤を選択することが必要になると予想される³⁾。

胃癌は日本において年間死亡率第 2 位の悪性腫瘍である⁴⁾。近年米回を中心に行われている大規模ながん遺伝子解析により, 胃癌における driver 遺伝子異常の同定と, その異常を基にして胃癌を細分化するサブタイプ分類が提唱された⁵⁾。同研究では, 各サブタイプの特徴的な driver 遺伝子異常に即した最適な薬剤選択の可能性を示唆している。現時点では胃癌で認可されている分子標的薬

は少なく, trastuzumab と ramucirumab の 2 種のみである⁶⁾⁷⁾。しかし, 現在複数の分子標的薬に関する第 III 相試験が並行して行われており, 今後は胃癌においても治療の最適化のための clinical sequencing の必要性が高まると考えられる。clinical sequencing の実用化を想定した場合に問題となるのは, 臨床検体の取り扱いである。胃癌は組織型が多彩であり, 各組織型で腫瘍組織中のがん細胞の密度にはばらつきが大きい⁸⁾。そのため, 組織型ごとに抽出された DNA の量や質が次世代シーケンサーでの解析に耐えるか否かを明らかにすることは臨床上の重要な課題である。しかしながら, この点に関しては未だ十分な検討が行われていない。

本研究の目的は, 胃癌腫瘍組織から抽出した DNA 濃度や質と組織型との関係を検討し, 次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を想定した DNA 抽出における注意点を明らかにすることである。

対象と方法

1. 対象

2013年4月から2015年7月までに新潟大学医学総合病院、及び新潟県立がんセンター新潟病院にて胃切除を施行された100症例を対象とした(表1)。組織型の内訳は、乳頭腺管癌(pap)が1例、高分化型管状腺癌(tub1)が9例、中分化型管状腺癌(tub2)が45例、充実型低分化型腺癌(por1)が12例、非充実型低分化型腺癌(por2)が24例、印環細胞癌(sig)が6例、粘液癌(muc)が3例であった。10%中性ホルマリンで固定された手術検体のパラフィン包埋ブロック(FFPE)から腫瘍組織の最大断面を含むブロックを選択し

た。固定日数の中央値は1日(範囲:1日から4日)であった。各FFPEブロックから6枚の連続切片(4 μ mが1枚,20 μ mが5枚)を作製した。4 μ mの切片はHE染色下での検鏡に用いた。可能な限り腫瘍細胞の密度が高い領域を選択し、DNA抽出用にマッピングした。次に対物10倍の顕微鏡下で、その領域の腫瘍含有割合を10%未満,10%以上50%未満,50%以上の3段階で評価した。その後、プレパラートのマクロ画像を撮影し、Photoshop elements ver.9.0(Adobe)を用いてマッピング領域の面積を測定した。

2. FFPE切片からのDNA抽出

HE染色プレパラートと20 μ m未染プレパラ-

表1 解析検体の臨床病理学的因子

		検体数 (n = 100)
T (壁深達度)	T2 (MP)	20
	T3 (SS)	44
	T4a (SE)	33
	T4b (SI)	3
組織型	pap	1
	tub1	9
	tub2	45
	por1	12
	por2	24
	sig	6
	muc	3
腫瘍含有割合	< 10%	25
	10-50%	22
	≥ 50%	53
ホルマリン固定日数	中央値(範囲)	1(1-4)

トを重ね合わせ、マッピング領域の FFPE 切片を削り取ることで (スクレープ) 腫瘍組織を採取した。DNA の抽出には BiOstic FFPE Tissue DNA Isolation Kit (MO Bio Laboratories) を用いた。抽出した DNA は NanoDrop™2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、260 nm と 280 nm の吸光度比 ($A_{260/280}$)、及び 260 nm と 230 nm の吸光度比 ($A_{260/230}$) を測定して純度を評価した。 $A_{260/280}$ が 1.8 以上および $A_{260/230}$ が 1.9 以上の場合を高純度と判定した。

二本鎖 DNA 濃度 (dsDNA) の測定には Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) と Qubit®3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いた。我々がやっている次世代シーケンサーによる遺伝子解析では 1 回の測定にあたり 150 ng の二本鎖 DNA が必要である。DNA 抽出後の検体液量は $40\mu\text{L}$ であることから、最低必要濃度を $3.75\text{ ng}/\mu\text{L}$ と設定した。

DNA の断片化は KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC Kit (KAPA Biosystems) を用いて評価した。129 bp と 41 bp の配列に対する primer を用いて Real time qPCR にて DNA の増幅を行い、DNA 断片化比 (Q-ratio : [129 bp]/

[41 bp]) を求めた。Q-ratio > 0.1 の場合に次世代シーケンサーによる遺伝子解析が可能であると判断した。

3. 統計学的解析

カテゴリー変数の群間比較には Fisher's exact test を用いた。連続変数の 2 群間比較には Mann-Whitney U test を、多群間比較には Kruskal Wallis test をそれぞれ用いた。p-value < 0.05 の場合を統計学的に有意な差と定義した。

結 果

1. 胃癌 FFPE 検体からの DNA 抽出

胃癌 100 検体の FFPE 切片からの DNA 抽出結果を表 2 に示した。FFPE 切片 1 枚当たりのスクレープ面積は中央値 44.7 mm^2 (範囲: 10.6 mm^2 - 201.7 mm^2) であった。55 検体は 1 枚の FFPE 切片から DNA を抽出した。面積が小さい、もしくは腫瘍含有割合が低く DNA 量を確保できないことが予想された 45 検体については 2 枚の FFPE 切片から DNA を抽出した。しかしながら、3 検体で DNA 抽出濃度が不十分であったため 5 枚の FFPE 切片を使用し再度 DNA 抽出を行い、

表 2 胃癌 FFPE100 検体からの DNA 抽出結果

		検体数 (n = 100)
スクレープ面積 (mm^2 /枚)	中央値 (範囲)	44.7 (6.7-201.7)
FFPE 使用枚数	1 枚	55
	2 枚	42
	5 枚	3
最終抽出 DNA 濃度 ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	中央値 (範囲)	54.8 (6.5-163.8)
Q-ratio: 129 bp/41 bp	中央値 (範囲)	0.70 (0.19-1.11)
$A_{260/280}$	中央値 (範囲)	1.91 (1.54-2.08)
$A_{260/230}$	中央値 (範囲)	2.09 (0.66-2.32)

十分な濃度の DNA を得ることができた。100 検体から最終的に抽出された DNA の濃度は中央値 $54.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (範囲: $6.5 \text{ ng}/\mu\text{l} - 163.8 \text{ ng}/\mu\text{l}$) であった。単位面積当たりの DNA の濃度は中央値 $0.95 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$ (範囲: $0.07 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2 - 2.75 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$) であった。Q-ratio については中央値 0.70 (範囲: 0.19-1.11) と基準値以上であり、 $A_{260/280}$ や $A_{260/230}$ の値も比較的良好で、全検体から次世代シーケンサーによる解析に十分な濃度と質を有する DNA を抽出することができた。

2. 胃癌組織型と DNA 抽出結果の関係

組織型別にマッピング領域の腫瘍含有割合を比

較すると、por2, sig, muc 群で割合が低い検体が有意に多かった ($p\text{-value} < 0.01$, 図 1, 2)。各検体から抽出された DNA の単位面積当たりの濃度は、por2, sig, muc で低い傾向にあったが、統計学的に有意な差は認められなかった (図 1, 3)。Q-ratio についても組織型間で有意な差は認められなかった。組織型を膨張性発育を示す pap/tub1/tub2/por1 と、その他 por2/sig/muc の 2 群に分けて、DNA 抽出結果を比較した (図 4)。単位面積当たりの DNA 濃度は pap/tub1/tub2/por1 群 (中央値 $1.05 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$, 範囲: $0.07 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2 - 2.75 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$) と比較して、por2/sig/muc 群 (中央値 $0.75 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$, 範囲: $0.08 \text{ ng}/$

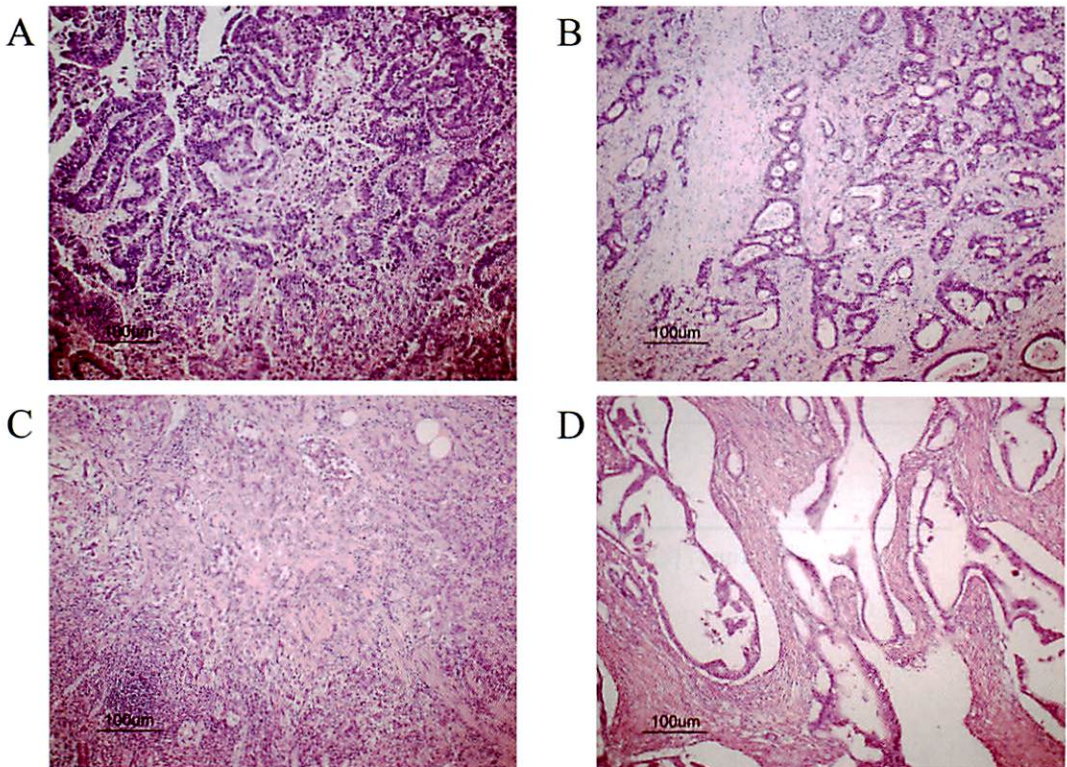


図 1 胃癌の組織像と腫瘍含有割合, 及び DNA 抽出濃度

- A : 中分化型管状腺癌 (HE 染色, $\times 10$), 腫瘍含有割合 50% 以上, DNA 抽出濃度 $1.72 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$.
 B : 中分化型管状腺癌 (HE 染色, $\times 10$), 腫瘍含有割合 10% 以上 50% 未満, DNA 抽出濃度 $0.22 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$.
 C : 非充実型低分化型腺癌 (HE 染色, $\times 10$), 腫瘍含有割合 10% 未満, DNA 抽出濃度 $0.08 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$.
 D : 粘液癌 (HE 染色, $\times 10$), 腫瘍含有割合 10% 未満, DNA 抽出濃度 $0.07 \text{ ng}/\mu\text{l}/\text{mm}^2$.

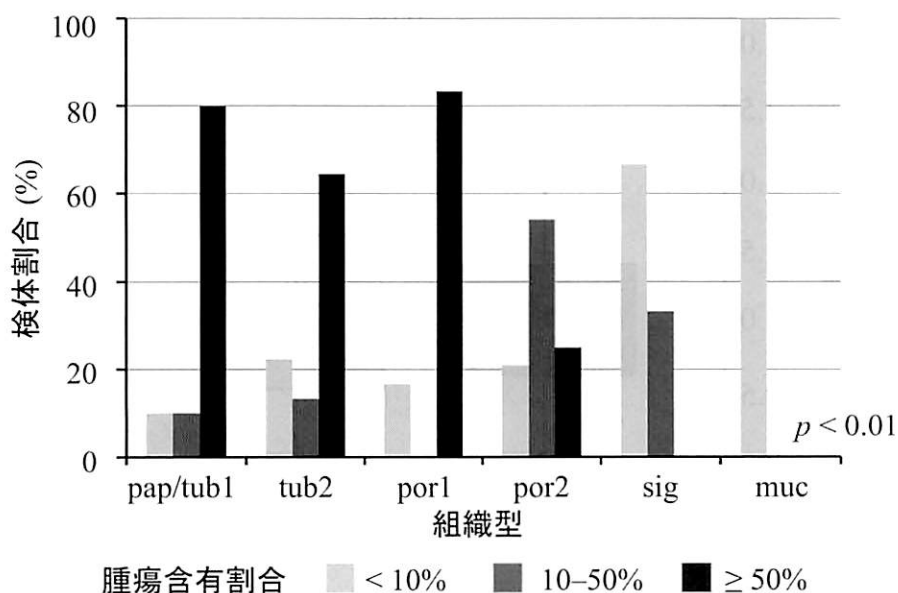
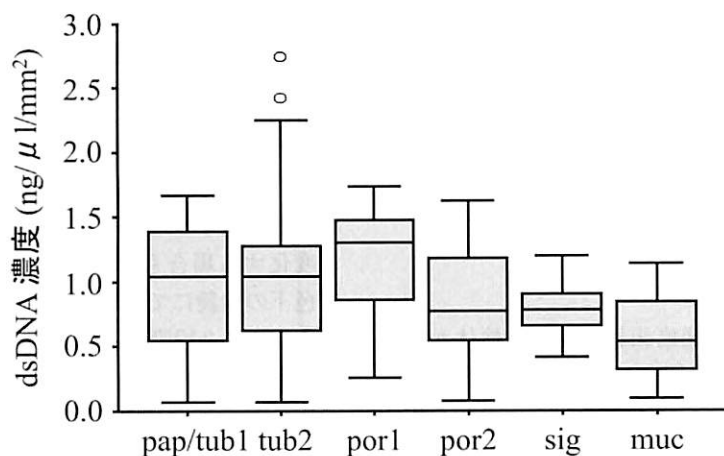


図2 胃癌組織型別の腫瘍含有割合

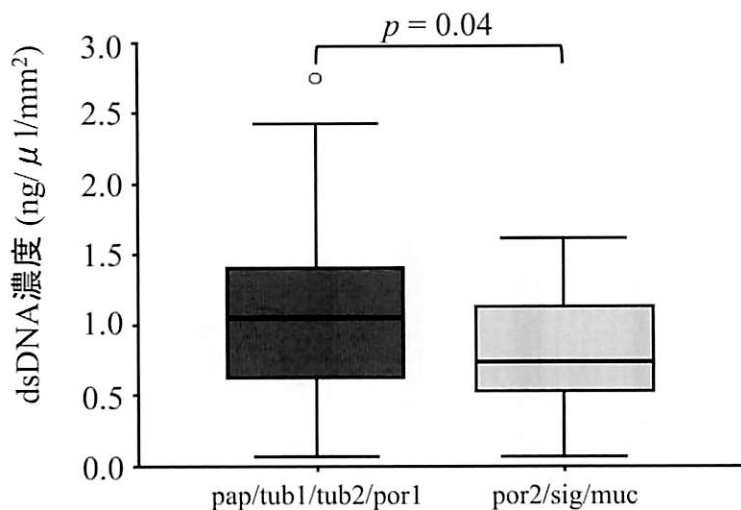
乳頭腺管癌 (pap), 高・中分化型管状腺癌 (tub1・2), 充実型低分化型腺癌 (por1) では腫瘍含有割合が高い検体が多く, 非充実型低分化型腺癌 (por2), 印環細胞癌 (sig), 粘液癌 (muc) では腫瘍含有割合が低い検体が多い (p -value < 0.01).



dsDNA濃度	中央値	0.98	1.04	1.31	0.76	0.78	0.54	$p = 0.33$
(ng/μl/mm ²)	範囲	0.07-1.67	0.07-2.75	0.26-1.74	0.08-1.63	0.42-1.20	0.10-1.14	
Q-ratio	中央値	0.68	0.75	0.71	0.66	0.49	0.75	$p = 0.49$
(129bp/41bp)	範囲	0.42-0.94	0.19-1.11	0.38-1.00	0.35-1.04	0.39-0.83	0.57-0.97	

図3 胃癌組織型別の DNA 抽出結果

非充実型低分化型腺癌 (por2), 印環細胞癌 (sig), 粘液癌 (muc) では単位面積あたりの DNA 抽出濃度が低い傾向にあるが, 有意な差は認められない. DNA の断片化は組織型間で有意な差は認められない.



dsDNA濃度	中央値	1.05	0.75	$p = 0.04$
(ng/ μ l/mm ²)	範囲	0.07-2.75	0.08-1.63	
Q-ratio	中央値	0.68	0.75	$p = 0.49$
(129bp/41bp)	範囲	0.42-0.94	0.19-1.11	

図4 pap/tub1/tub2/por1 群と por2/sig/muc 群の DNA 抽出結果
por2/sig/muc 群において単位面積あたりの DNA 抽出濃度は有意に低い (p -value = 0.04).
一方, DNA の断片化には有意な差は認められない.

μ l/mm² - 1.63 ng/ μ l/mm²) で有意に低かった (p -value = 0.04). 一方, Q-ratio については 2 群間に有意な差は認められなかった.

考 察

今回我々は, 胃癌腫瘍組織の FFPE 検体から DNA を抽出し, 組織型別に DNA の濃度や断片化の程度を比較検討した. 次世代シーケンサーを用いた clinical sequencing が実用化された場合, 臨床検体からの DNA 抽出の精度が問題となる. 胃癌は同じ消化管の上皮性悪性腫瘍である食道癌や大腸癌と比較して組織型が多彩である⁸⁾. 問題点は, 組織型ごとに腫瘍細胞の密度が異なることであり, 組織型と抽出された DNA の濃度や質との関係を明らかにすることは, 検体の精度管理を行う上で重要である.

胃癌には乳頭腺癌, 高・中分化型管状腺癌, 低分化型腺癌, 印環細胞癌, 粘液癌など様々な組織型が存在する. さらに単一の腫瘍組織に複数の組織型が混在する場合や, 浸潤部で低分化な組織型に変化する場合も少なくない. 本研究では, HE 染色下の検鏡にて DNA 抽出に用いる領域の腫瘍含有割合を 3 段階で評価した. 組織型ごとに比較すると, 非充実型低分化型腺癌, 印環細胞癌, 粘液癌において腫瘍含有割合の低い検体が多かった. これは, 非充実型低分化型腺癌や印環細胞癌では腫瘍細胞の周囲に非細胞成分である細胞外基質を多く伴っていること, 粘液癌では粘液を多量に伴っていることが原因である. さらに, 同組織型の検体では単位面積当たりの抽出 DNA 濃度も有意に低かった. 以上より, これらの組織型の検体では腫瘍細胞の含有量が少ないことに起因して, 抽出 DNA 濃度が低値であった可能性が示唆

される。一方、DNA の質、すなわち断片化については組織型との間に有意な関係は認められなかった。DNA 断片化は検体の固定条件や保存期間に起因していると考えられる。

FFPE 検体から抽出した DNA は固定や包埋の影響により断片化、架橋形成や化学的修飾などの影響により、従来の分子生物学的解析には向かないとされていた⁹⁾¹⁰⁾。しかしながら、次世代シーケンサーによる遺伝子解析技術の発展により、断片化の進んだ FFPE 由来の DNA でも精度の高い解析が可能となった¹¹⁾¹²⁾。FFPE 検体は日常の病理診断で用いられる検体であり、clinical sequencing を想定した場合に最も適した検体であると考えられる。特に胃癌において FFPE 検体を用いる最大の利点は、HE 染色した切片を検鏡することで各検体の組織型と腫瘍含有割合を容易に確認できる点である。低分化で腫瘍含有割合が低い検体に対しては、抽出に用いる切片の枚数、もしくはスクレープする面積を増やすことで対処することができる。実際に本研究ではスクレープすべき腫瘍の面積が小さい検体や、腫瘍含有割合の低い検体に対して、あらかじめ 20 μ m 厚の切片を 2 枚用いて抽出を行った。それでもなお DNA 濃度が不十分な検体では 5 枚まで切片を増やして抽出を行った。このような対処を行うことで、組織型によらず解析に十分な量の DNA を得ることができる。また、本研究では用いていないが、マイクロダイセクション法により腫瘍細胞を選択的に回収する方法も有用と考えられる¹³⁾。

結 論

胃癌において、低分化型腺癌、印環細胞癌、及び粘液癌の FFPE 検体から抽出される DNA 濃度は他の組織型と比較して低値である。胃癌 FFPE 検体からの DNA 抽出に際しては、HE 染色切片の検鏡は必須である。上記の組織型に該当し、腫瘍含有割合が低い検体では、抽出に用いる切片枚数やスクレープする組織の面積を増やすといった対策を講じることが肝要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、今回の研究に際して各種のコーディネートを担当されたデンカ株式会社稲田太郎氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway L a, Golub TR, et al: Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505: 495 - 501, 2014.
- 2) Gutierrez ME, Kummur S and Giaccone G: Next generation oncology drug development: opportunities and challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 259 - 265, 2009.
- 3) Luthra R, Chen H, Roy - Chowdhuri S and Singh RR: Next - Generation Sequencing in Clinical Molecular Diagnostics of Cancer: Advantages and Challenges. *Cancers* 7: 2023 - 2036, 2015.
- 4) 国立がん研究センターがん情報サービス【がん登録・統計】: http://ganjoho.jp/reg_stat/
- 5) The Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513: 202 - 209, 2014.
- 6) Bang Y - J, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2 - positive advanced gastric or gastro - oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open - label, randomised controlled trial. *Lancet* 376: 687 - 697, 2010.
- 7) Wilke H, Muro K, Van Cutsem E, Oh S - C, Bodoky G, Shimada Y, et al: Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro - oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double - blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15: 1224 - 1235, 2014.
- 8) 深山正久, 大倉康男: 腫瘍病理鑑別診断アトラス 胃癌 (第 2 版). 文光堂, 2015.
- 9) 津田 均, 広橋説雄: ホルマリン固定パラフィ

- ン包埋ブロックよりのDNAの抽出. 病理と臨床 5: 1377 - 1379, 1987.
- 10) 福重智子, 石黒晶子, 山田 梢, 菊岡幹太, 溝口幹朗, 竹下盛重: ホルマリン固定パラフィン包埋切片からのDNA抽出法の検討. 日染色体遺伝子検会誌 29: 49 - 54, 2011.
- 11) Hedegaard J, Thorsen K, Lund MK, Hein A - MK, Hamilton - Dutoit SJ, Vang S, et al: Next - Generation Sequencing of RNA and DNA Isolated from Paired Fresh - Frozen and Formalin - Fixed Paraffin - Embedded Samples of Human Cancer and Normal Tissue. PLoS One 9: e98187, 2014.
- 12) Carrick DM, Mehaffey MG, Sachs MC, Altekruze S, Camalier C, Chuaqui R, et al: Robustness of Next Generation Sequencing on Older Formalin - Fixed Paraffin - Embedded Tissue. PLoS One 10:e0127353, 2015.
- 13) Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin WC, Mansour J, et al: Whole - exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. Nat Commun 6: 6744, 2015.

(平成28年1月8日受付)
