

血中DNA Palindrome配列発現解析による乳癌早期発見法の開発

Evaluating DNA palindromes as cancer genomic markers
for early detection in liquid biopsy

猪狩 史江^{*1,2}

田中 尚^{*2} Armando E. Giuliano^{*2}

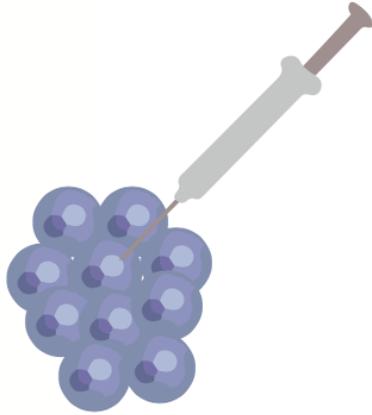
^{*1} 順天堂大学医学部 乳腺腫瘍学講座

^{*2} Cedars-Sinai Medical Center Department of Surgery



リキッドバイオプシーとは

Tissue Biopsy



現在の診断方法の主軸

- 侵襲的・生検場所によっては困難
- 繰り返しの生検が困難
- Tumor heterogeneityに反映困難

Vs.

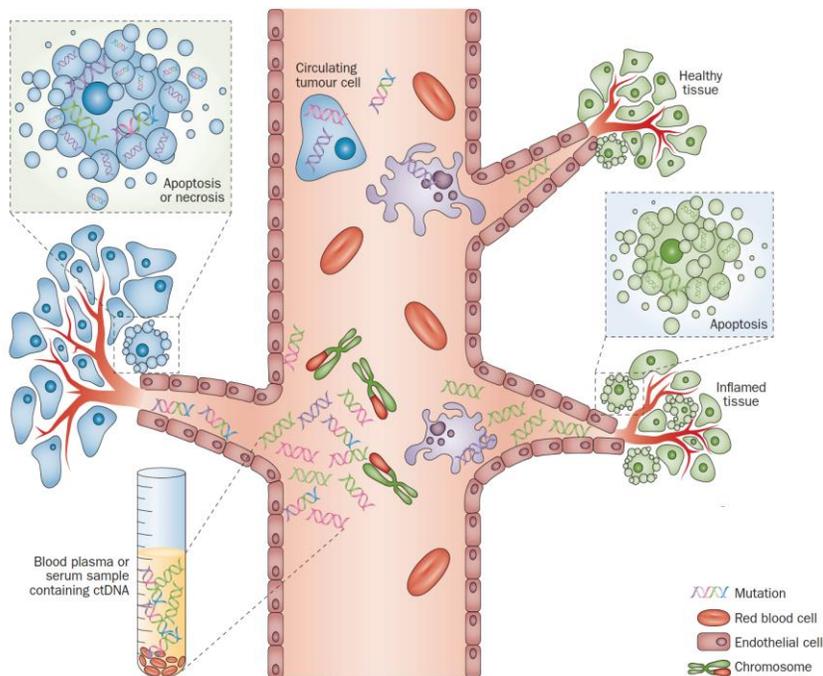
Liquid Biopsy



再発症例への適応に限られる(本邦・乳がん)

- 非侵襲的
- 再生検が容易
- = 腫瘍のbiologyをリアルタイムにモニタリング可能
- Tumor heterogeneityに反映可能
- コスト面

リキッドバイオプシーの臨床応用 - 検診への応用の問題点 -



Cancer Screening ?



Neoadjuvant

Adjuvant

Metastatic disease

HR-positive

- CDK4/6 inhibitor (palbociclib) efficacy (NCT04567420)
- VEGFR/FGFR kinase inhibitor (licatinib) efficacy (NCT02053636,02202746)

- *ESR1* mutations and prognosis(NCT03079011, 04256941) (PADA-1)
- *PI3KCA* mutations and PI3K inhibitors efficacy and prognosis

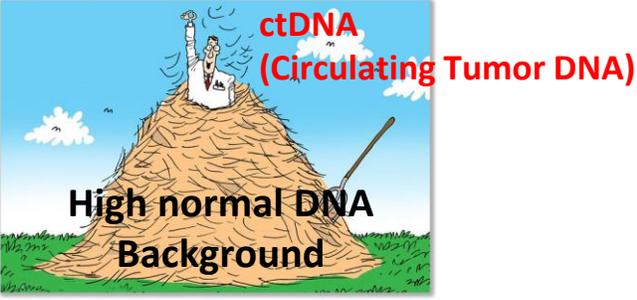
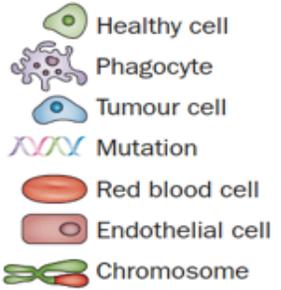
HER2

- ctDNA before and after NAT (NCT00553358)

- *ERBB2* copy number and T-DXd efficacy (NCT03248492)
- *PI3KCA* mutations and anti-HER2 and PI3K inhibitors efficacy (NCT02705859)
- HER2 mutant ctDNA and pan HER2 inhibitor efficacy (NCT01670877)

TNBC

- an immune checkpoint blockade and pembrolizumab for patient with ctDNA after NAT (NCT03145961)
- Global ctDNA mutation profiling for precision therapies (NCT02101385)



極少量のctDNA検出感度の問題

Crowley, E. et al. Nat Rev Clin Onc. 10:472-484 (2013)

Igari et al. Critical Reviews in Oncology / Hematology (2022)

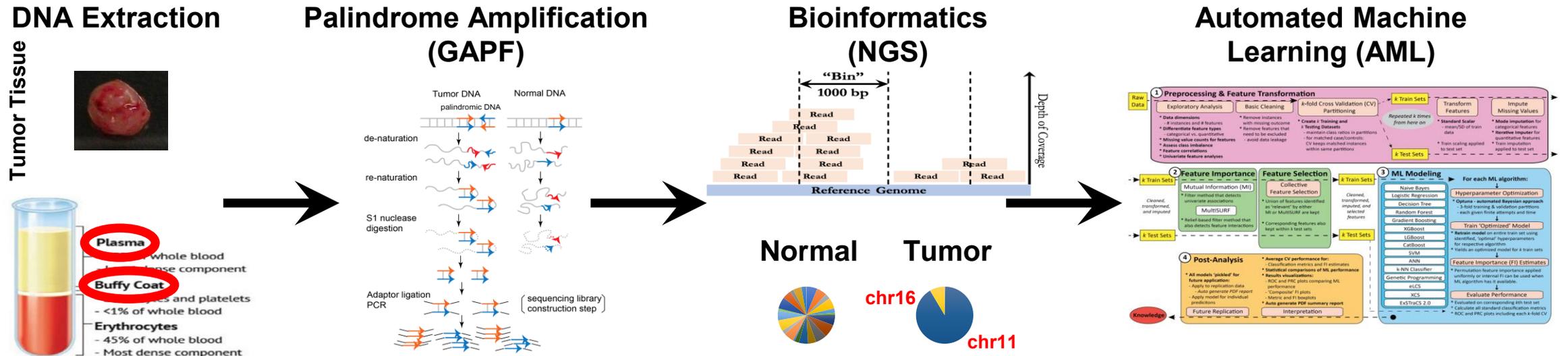
研究目的・方法

■研究目的：

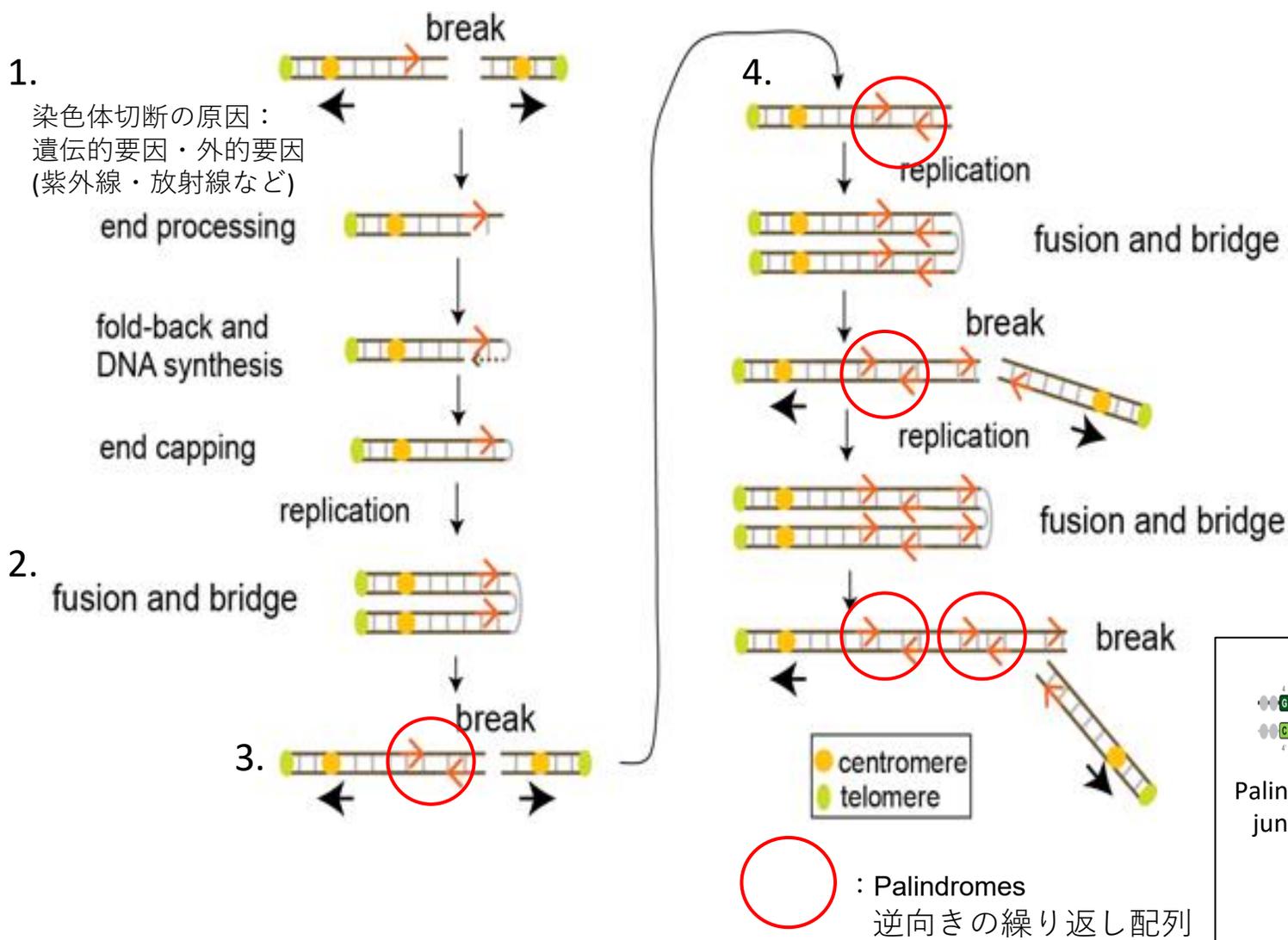
乳癌早期発見を目的とした血液検体による高精度なLiquid Biopsyの開発のため、染色体構造異常を標的とした、新たな技術戦略を確立する。

■研究方法：

乳癌組織検体及び乳癌患者血漿検体から抽出したDNAから、“**Genomewide Analysis of Palindrome Formation (GAPF)**” の手法を用い、**Palindrome配列**を抽出。次世代シーケンサー(NGS:Next Generation Sequencing)を経て得られたデータをBioinformatics解析する(=**GAPF-Seq**)。Automated Machine Learning (AML)でデータの精度検証を行う。



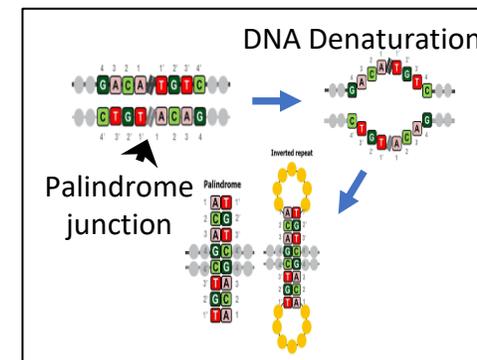
Palindrome配列(回文配列)とは？



Breakage-Fusion-Bridge(BFB) cycles

1. 染色体が何らかの原因で切断
2. 末端同士が融合し、融合染色体形成
3. 融合染色体は複数のセントロメアを有し、細胞分裂の際に別々の方向に牽引され切断される
4. このサイクルが繰り返されることで、Palindrome配列が蓄積される

↓
ゲノム不安定性の誘導へ



遺伝子変異・DNA再構成

DNAコピー数の増加

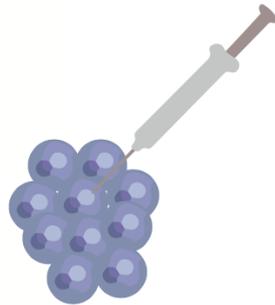
発癌・増殖



Sample Characteristics

▪ Breast Tissue (N=41)

| pStage | Total | Subtype | Total |
|----------|-------|-----------|-------|
| I | 7 | Luminal A | 32 |
| II | 24 | TNBC | 7 |
| III | 5 | DCIS | 2 |
| IV | 1 | | |
| unknown | 2 | | |
| DCIS (0) | 2 | | |

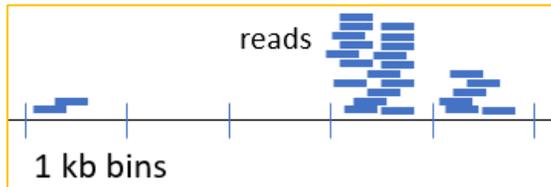
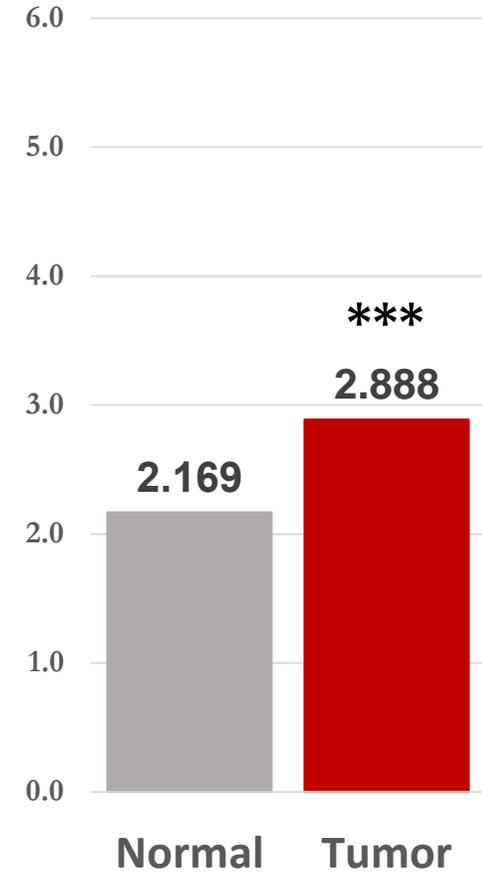
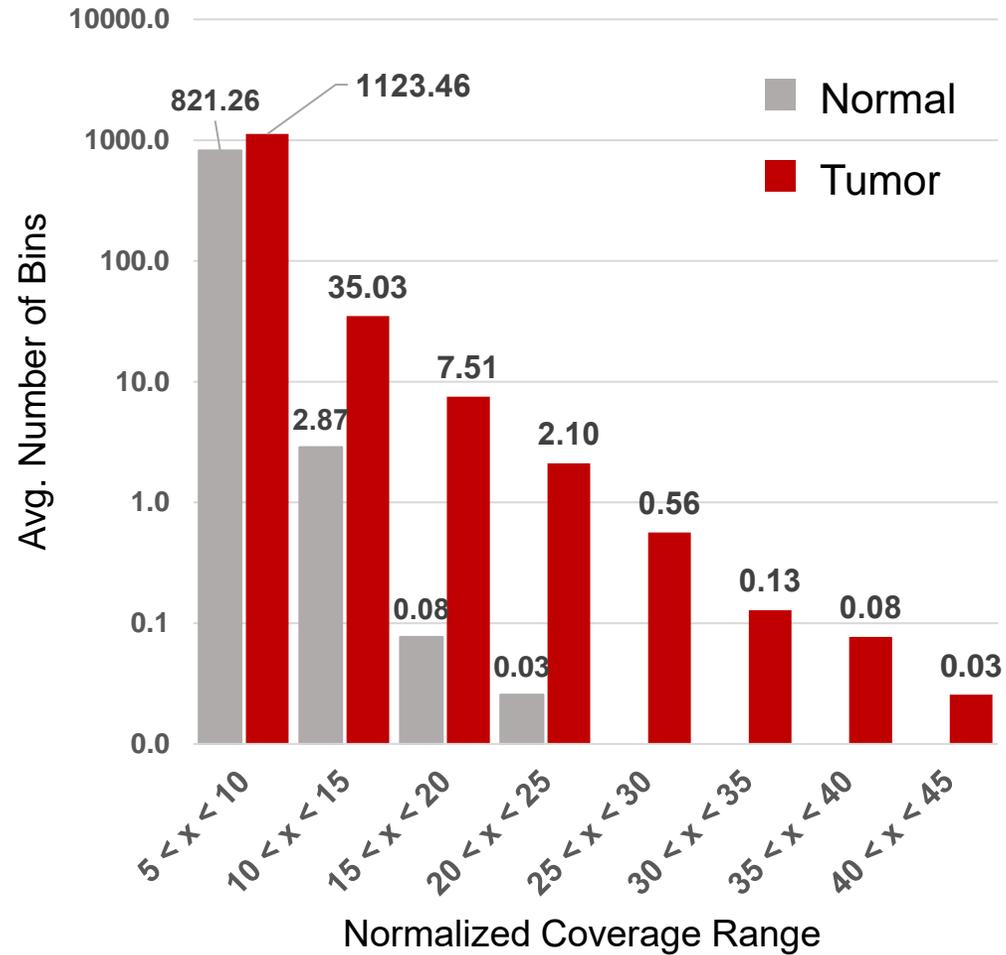
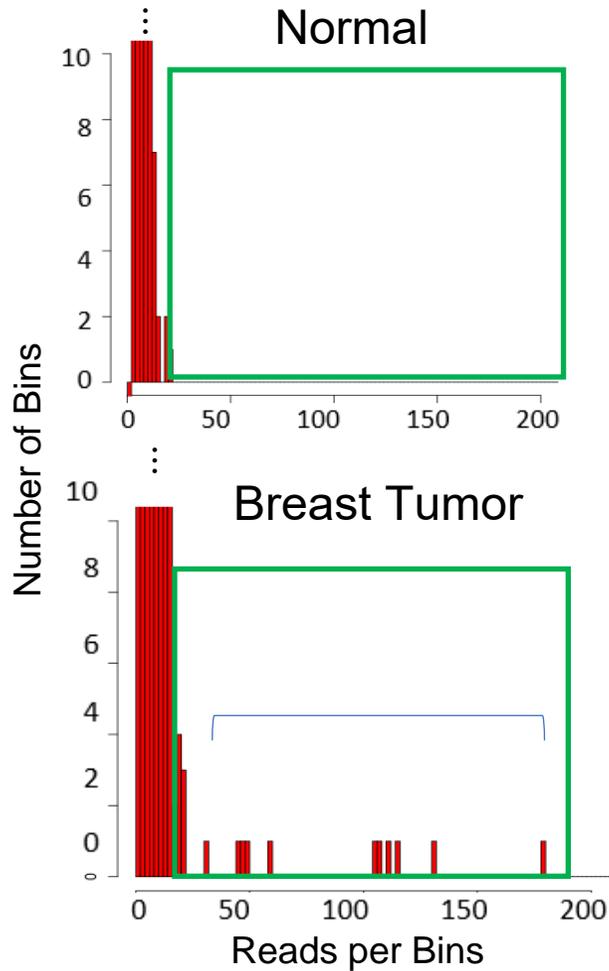


▪ Breast Plasma (N=15)

| pStage | Total | Subtype | Total |
|--------|-------|-----------|-------|
| I | 4 | Luminal A | 13 |
| II | 8 | TNBC | 2 |
| III | 2 | | |
| IV | 1 | | |



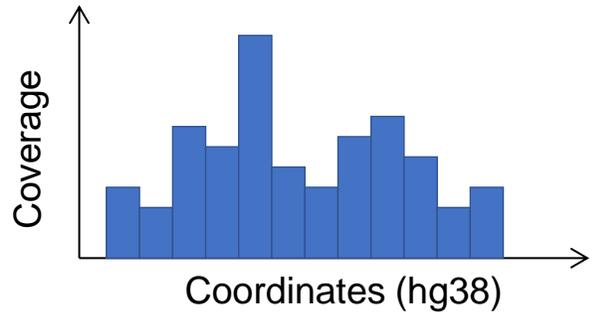
結果① Tumor-specific high coverage bins



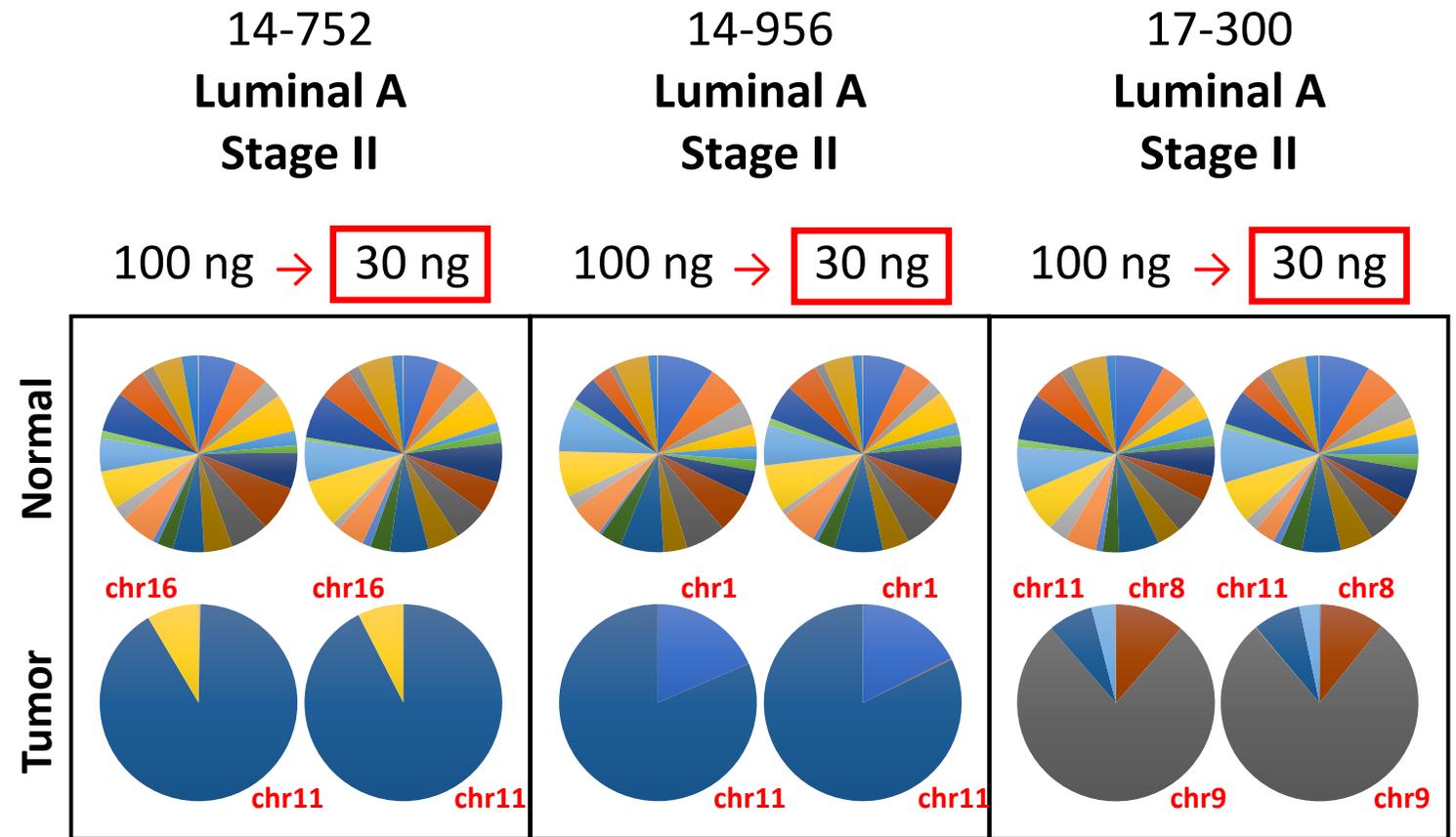
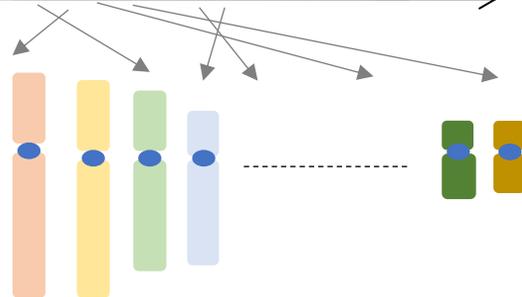
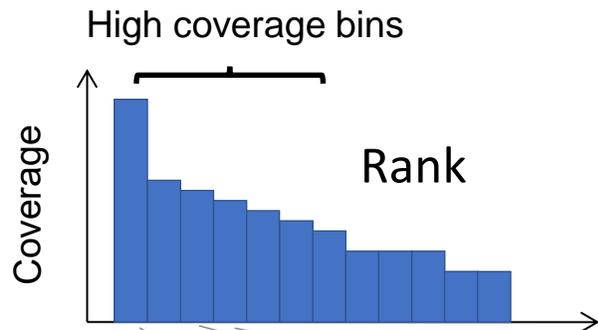
■ 乳癌検体で正常より多数のhigh coverage binsを有する

結果②

Chromosomal distributions of high coverage bins are reproducible



↓ Sort

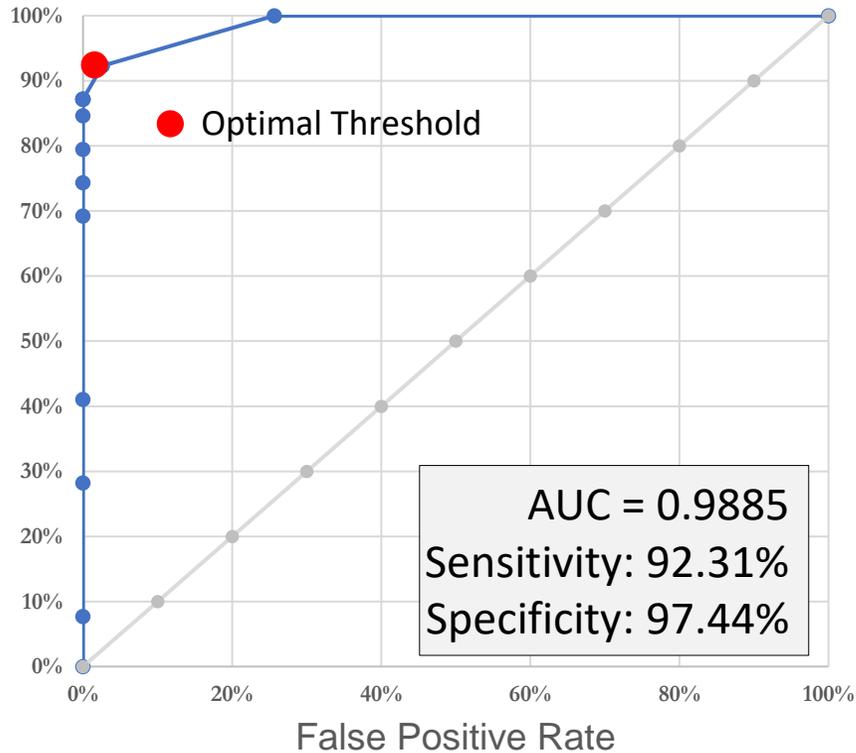


乳癌検体はある特定の染色体で多数のhigh coverage binsを有する

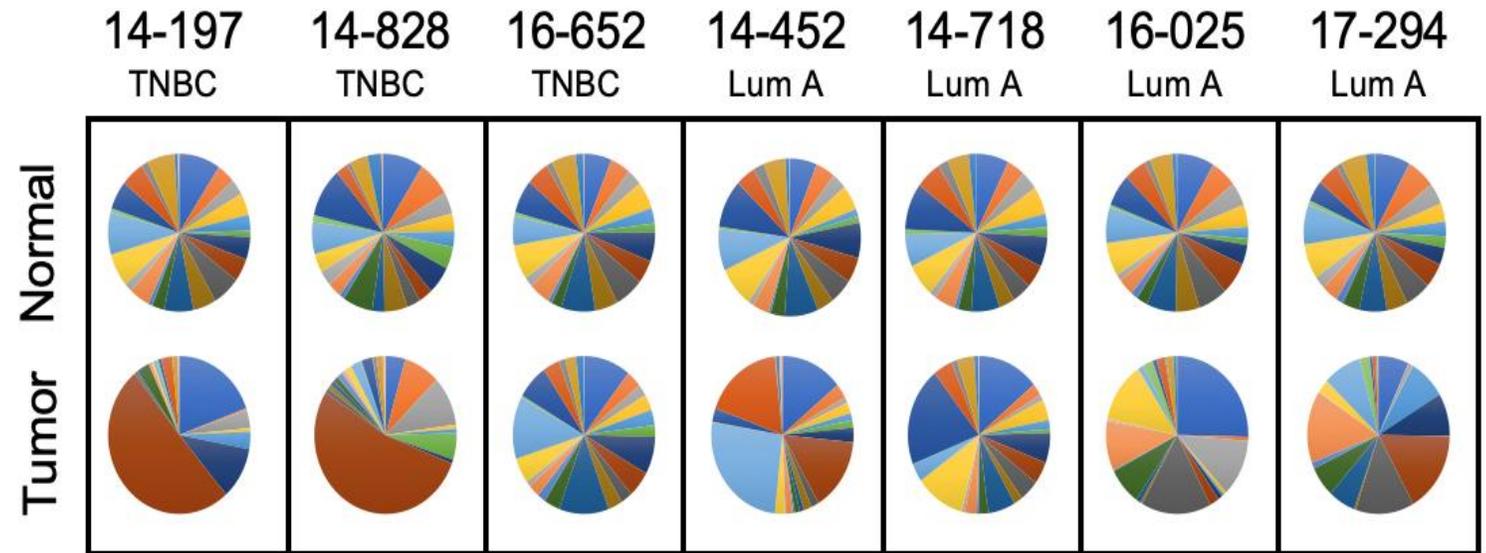
結果③

Distinct chromosomal distributions between tumor and normal in Stage I breast tumors

Top 1,000 bins



*全てstage I 症例



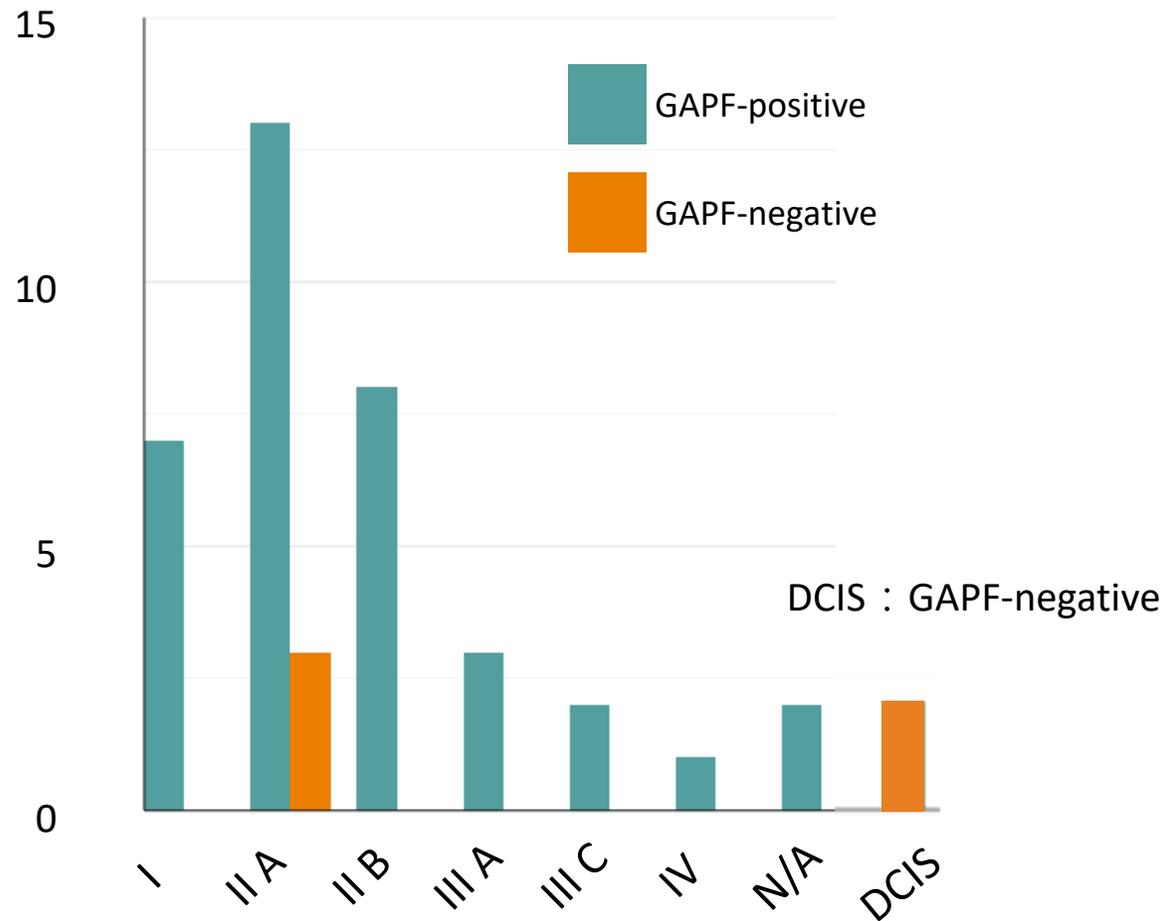
- 乳癌検体はある特定の染色体で多数のhigh coverage binsを有する



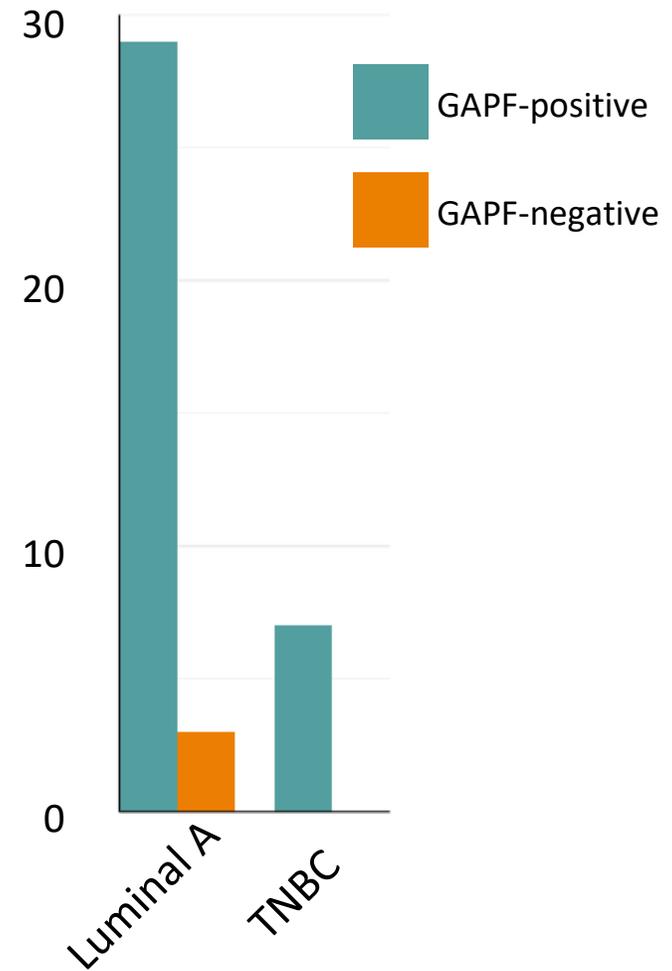
Stage I 症例でも同様の結果
早期癌でも検出可能である可能性を示した

結果④ GAPF profiles in Tumor Stages and Subtypes

GAPF by pStage



GAPF by Subtype

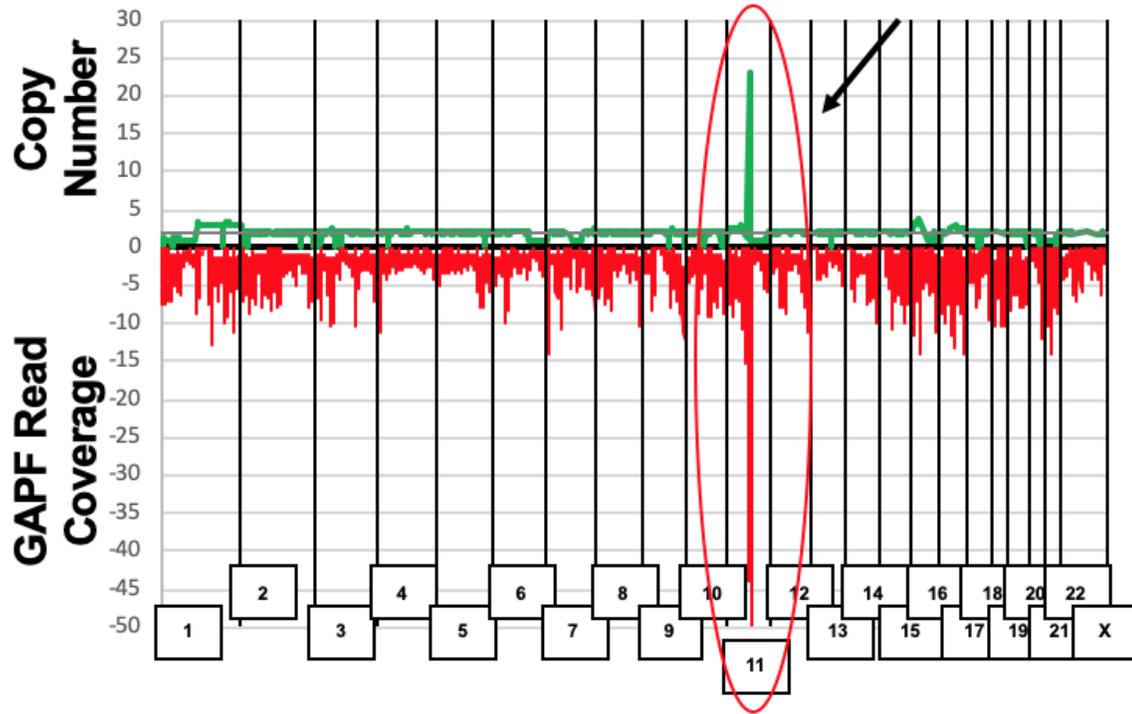


Short Summary

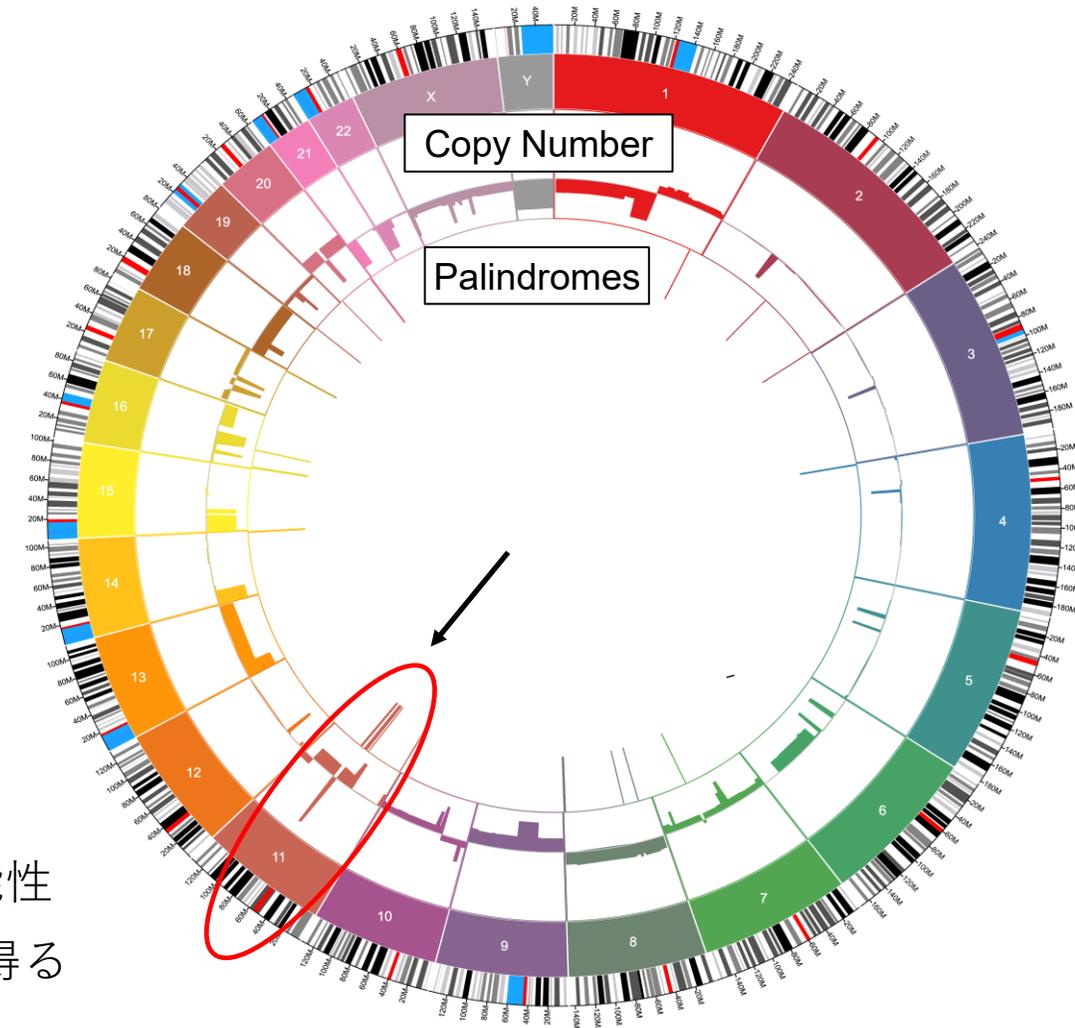
- GAPF-Seqを用いた解析では、
 - 高精度に正常と癌を区別することが可能
 - ”がん”を見つけるためのバイオマーカーとなり得る
 - 極少量のDNAからでも検出可能
 - 腫瘍量が少ないことが想定される早期癌の検出も可能
 - 乳癌検体はある特定の染色体で多数のhigh coverage bins (HCBs)を有する
 - Palindrome配列の生物学的機能について
 - HCBsの詳細な検討
 - 乳癌Subtype別の解析

GAPF Enriched Regions Often Correspond to Copy Number Gain in Breast Tumors

Luminal A · Stage II

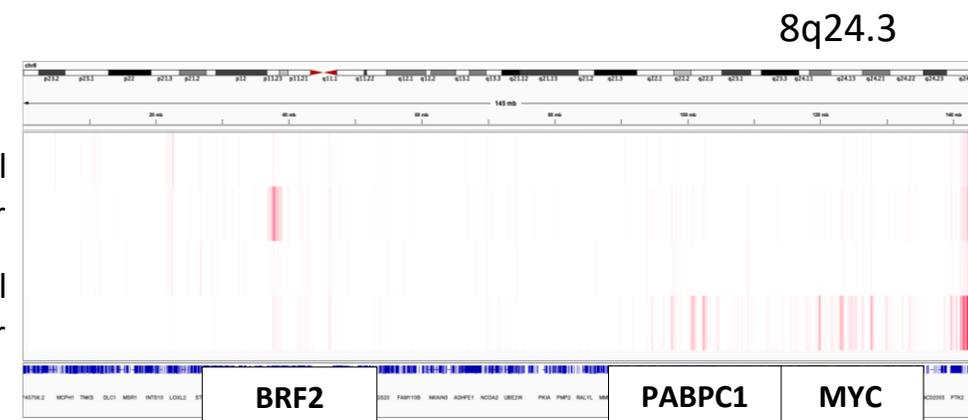
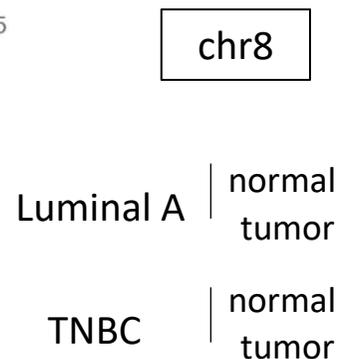
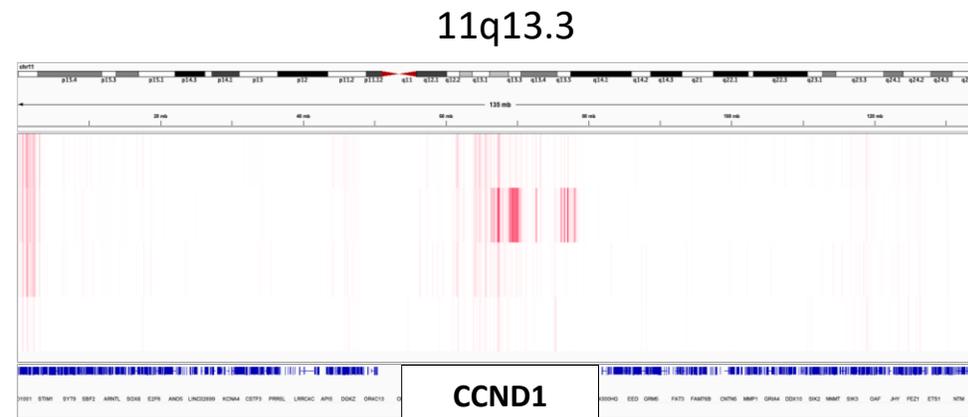
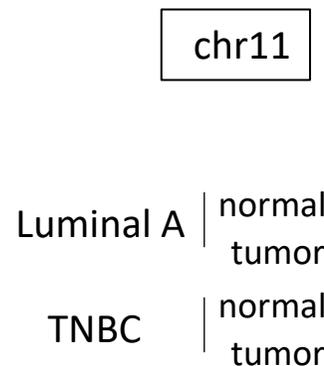
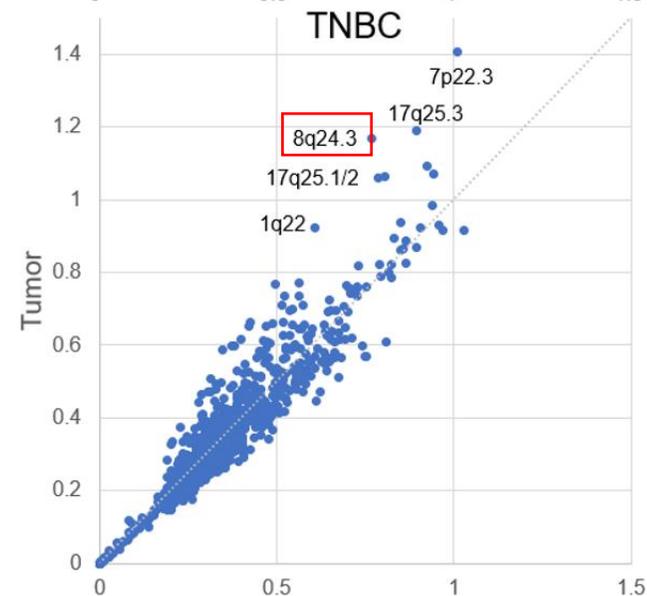
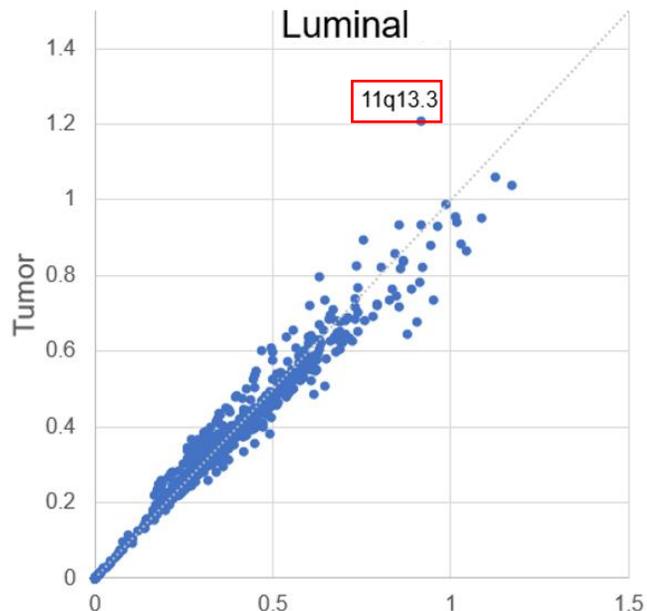
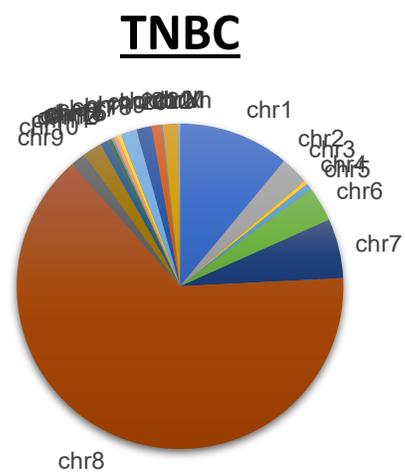
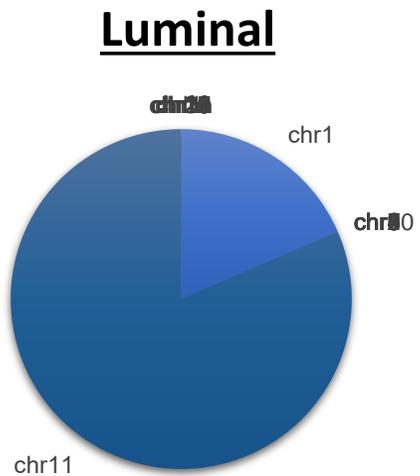


PalindromesとCopy Numberの相関



- Copy Numberの増幅とPalindromesは相関する
 - Copy数が増加するより早い段階でPalindromeが存在する可能性
 - Palindromesの検出は、遺伝子増幅の感度の良い指標になり得る

結果⑥ Tumor subtype-specific enrichment of top 1000 bins



- SubtypeによってCytoband上での増幅領域が異なる

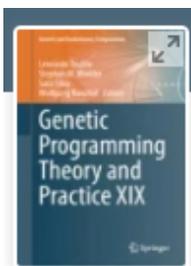
Automated Machine Learning (AML)



[Home](#) > [Genetic Programming Theory and Practice XIX](#) > Chapter

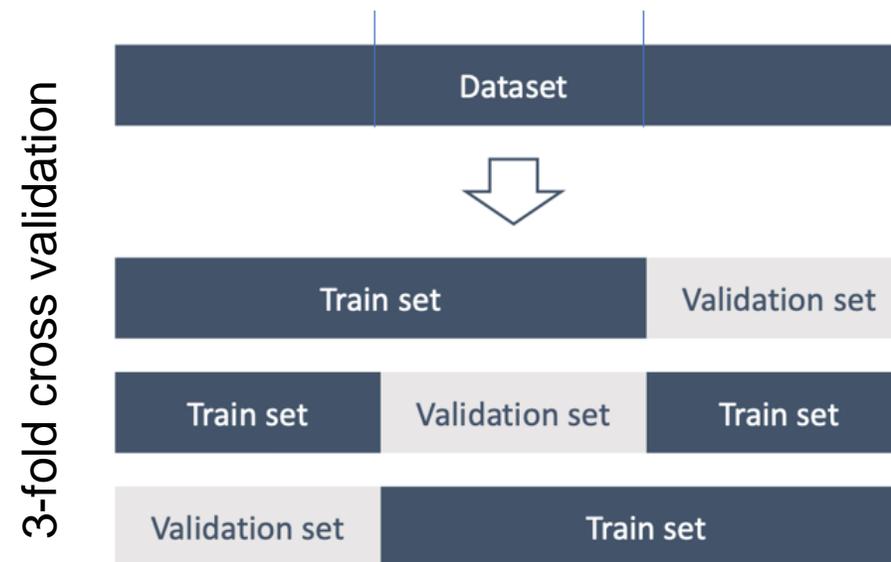
STREAMLINE: A Simple, Transparent, End-To-End Automated Machine Learning Pipeline Facilitating Data Analysis and Algorithm Comparison

[Ryan Urbanowicz](#) , [Robert Zhang](#), [Yuhan Cui](#) & [Pranshu Suri](#)



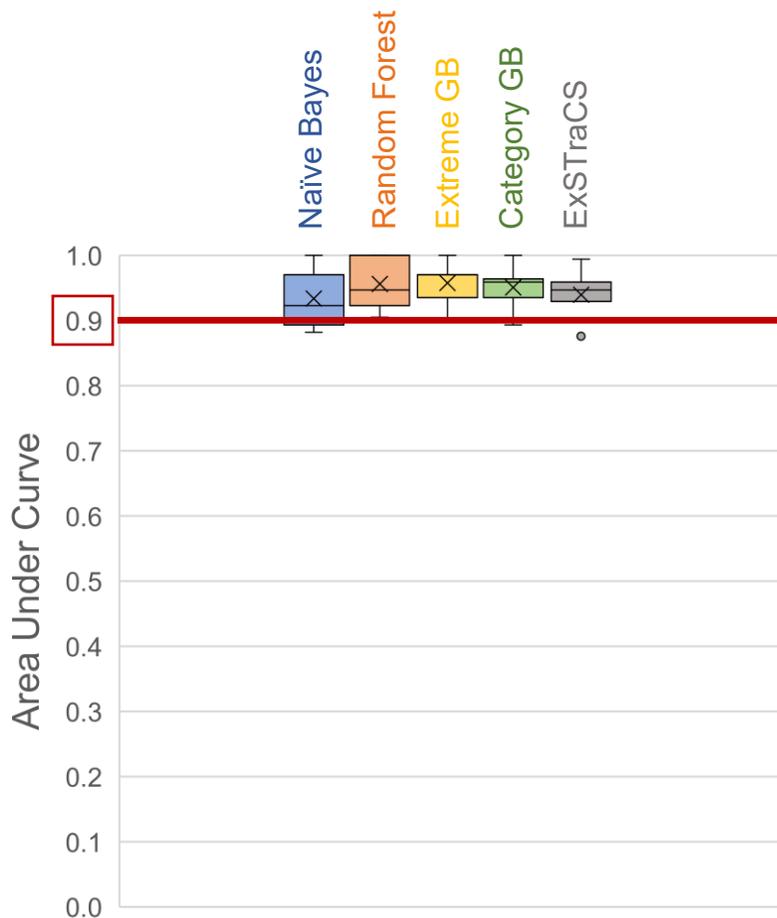
Genetic Programming Theory and Practice XIX pp 201–231 | [Cite as](#)

Input: the numbers of top 1000 bins in each chromosome



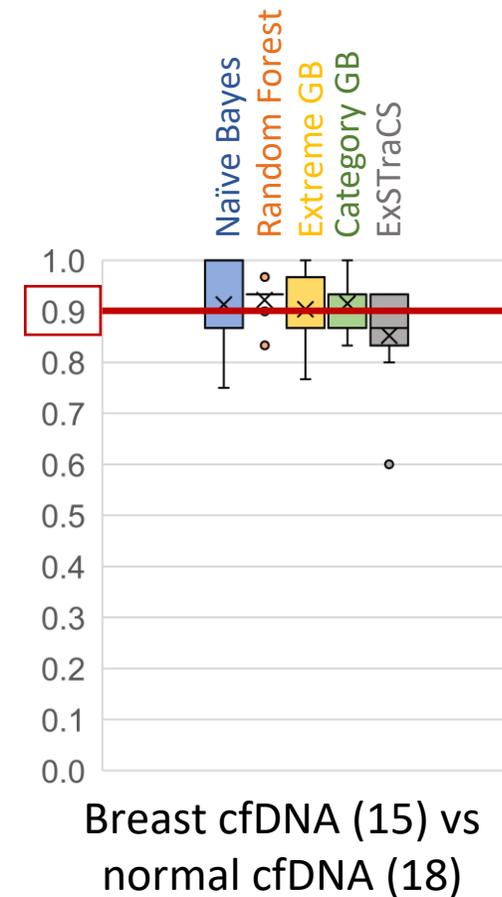
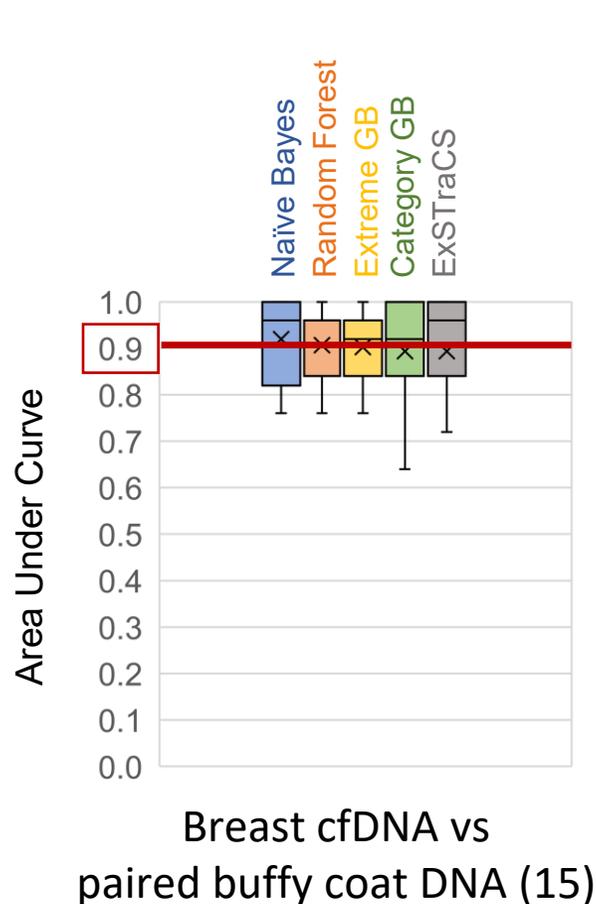
結果⑧ AML

- **Breast Tumor** and Buffy Coat (paired)



- **Breast cfDNA** and Buffy Coat (paired) or cfDNA from healthy individuals

- cfDNAを用いたGAPF-Seqでも、高精度に解析可能



Summary and Future directions

Summary

- GAPF-Seq は、DNA Palindromesを高精度に検出可能であることを明らかにした
 - 正常と癌を高精度に識別可能 (AUC: 0.9885)、高い感度(92.31%)と 特異度(97.44%)
 - ごく少量のInput DNA (30ng)からでも解析可能
 - DCISと浸潤癌を区別できる可能性
 - Palindromeの形成は癌進行初期から起こっていることが示唆される
 - 癌特異的なPalindromeは、ある特定の染色体部位に集積する傾向がある
 - Subtype特異的な増幅傾向が認められた。Palindromeは増幅遺伝子のマーカー？
 - AMLPを用いた解析では、乳癌組織検体及び血漿検体からのcfDNAでも高精度に解析可能であった

Next Steps

- DNA Palindromesが早期癌発見に寄与できるバイオマーカーとなるか、評価検証を継続する
- がんの検出のみならず、個々の腫瘍のbiologyを含めた解析が可能か、臨床情報と照合して解析を進めていく
 - 症例数を増やす (DCIS vs IDC, Luminal vs TNBC, HER2-positive症例など)
 - DNA Palindromesの生物学的機能意義について検索を進める

“がんで命を落とすことのない、**治せるがん**を見つけること”

- ・ 患者さんへの身体的・精神的負担の軽減
- ・ 通院・治療期間の短縮に貢献
- ・ 生命予後の改善
- ・ 国民医療費の削減

- 高精度で被験者に優しい簡便なツールであること → 検診率の向上・継続した検診に貢献



Palindrome pos? neg?

Acknowledgements

Cedars-Sinai Medical Center

Department of Surgery

- Armando E Giuliano
- Tanaka lab
 - Hisashi Tanaka
 - Ryusuke Suzuki
 - Neeraj Joshi
 - Lila Mouakkad
 - Michael Murata
- Xiaojiang Cui
- Dolores Di Vizio
- Tatyana Vagner

Anatomic Pathology and Biobank

- Farnaz Dadmanesh
- Wohaib Hasan

本研究はCedars-Sinai Medical Centerと共同で行われた。
協力して下さった患者さんを含む全ての方々に感謝申し上げます。

