

令和元年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19345

研究課題名(和文)非侵襲的核酸変異解析技術の開発

研究課題名(英文)The development of non-invasive method for the molecular diagnosis

研究代表者

衣笠 秀明(Kinugasa, Hideaki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：70774800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌・大腸癌・膵癌・胆嚢癌等の消化管癌において組織診断は必須であるが、今回の研究のテーマである非侵襲的核酸変異解析技術の開発では特に胆嚢癌の血液や胆汁に着目した。胆汁中の癌由来浮遊遺伝子をターゲットとした胆汁Liquid biopsyで組織診断と同等の評価が可能であった。胆汁からの胆嚢癌診断の可能性を証明し、新たな手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆嚢癌の癌細胞中の情報が胆汁中にも存在していることを証明した。この知見から新たな診断方法として、胆汁中の遺伝子変異を検出する新たな手法を確立した。診断が困難な胆嚢癌に対して、非侵襲的な新たな方法の一つとなりうると思われる。

研究成果の概要(英文)：Tissue diagnosis is essential in gastrointestinal cancer such as gastric cancer, colon cancer, pancreatic cancer and gallbladder cancer. However, tissue sampling is challenging in some cases because of the anatomy. In the development of non-invasive nucleic acid mutation analysis technology (liquid biopsy), which is the subject of this research, we focus on circulating tumor DNA (ctDNA) of blood or body fluid. We proved the possibility of gallbladder cancer diagnosis from bile and established a new approach.

研究分野：消化器内科学

キーワード：Liquid biopsy 胆汁 胆嚢癌 Circulating tumor DNA ctDNA リキッドバイオプシー トランスレーショナルリサーチ

## 1. 研究開始当初の背景

変異遺伝子を検出する方法として、直接腫瘍から組織を採取し DNA を解析することが一般的である。しかしながら、直接腫瘍から組織を採取することは非常に侵襲を伴い、また早期発見という意味においても制限を伴う方法である。また、腫瘍の Heterogeneity も研究されてきており、同じ腫瘍の中でも領域によって、遺伝情報が異なっていることが明らかにされている。そこで腫瘍そのものでなく血液や胆汁などの体液中から癌由来の浮遊細胞や circulating tumor DNA(ctDNA)を捉えられることができれば、非侵襲的でありその応用性も計り知れない。

この方法は通常の腫瘍から組織を採取する biopsy に対して Liquid biopsy として今後の可能性を秘めていると思われる。特に、現在 Liquid biopsy の一つとして血液中に浮遊している癌細胞(circulating tumor cell; CTC)そのものを捉える方法が研究されてきており、有益な結果を報告している(Gastroenterology 146(3): 647-651,2014)。しかしながら、この手法は癌細胞そのものを検出する必要があり、さらなる技術的進歩が必要とされ、未だ一般化しているとは言い難い。そこで我々は浮遊している腫瘍細胞そのものではなく、ctDNA に着目した。

胆嚢癌は、解剖学的にも胃癌や大腸癌のように直接腫瘍を可視下に生検することが困難であり、画像診断に依存し、鋭敏な腫瘍マーカーがない診断に苦慮することの多い早期発見の難しい癌である。

今回の研究はその胆嚢癌に対して、胆汁中の Liquid biopsy を試み、新たな診断法の開発に主眼をおいている

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、この Liquid biopsy を胆汁に対して応用を試み、胆汁中の ctDNA をターゲットにした新たな胆嚢癌の診断法を開発することである。

## 3. 研究の方法

手術標本のパラフィンブロックから癌部及び非癌部より DNA を抽出し(QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN))、それぞれを比較することで癌部に特異的な遺伝子変異を次世代シーケンサー(Next Generation Sequencing (NGS), MiSeq, illumina)で検出する。48 癌候補遺伝子からなる Cancer panel(Haloplex, Agilent Technology)を中心とした遺伝子変異を対象とし、解析を行う。

一方で、血液や胆汁から circulating tumor free DNA (cfDNA)や ctDNA の抽出を試み、同様に次世代シーケンサーで解析を行う。

## 4. 研究成果

胆嚢癌 30 症例のうち、20 症例の胆嚢癌組織 DNA と 24 症例の胆汁 ctDNA を解析した。解析には次世代シーケンサーと Cancer panel を用いた。年齢中央値は 77 歳(40-90)、男女比は 9/21、ステージ / / / は 6/6/6/12 症例であった。胆嚢癌組織 DNA において、20 症例中 11 症例(55%)で変異陽性であった。胆嚢癌組織と胆汁ともにそろっている症例は 14 症例であり、この 14 症例のうち 8 症例(57.1%)が胆嚢癌組織 DNA 変異陽性であった。胆汁細胞診陽性は 14 症例中 5 症例(35.7%)、胆汁 ctDNA 陽性は 14 症例中 7 症例(50%)であった。

32 症例の非癌胆嚢組織 DNA と 19 症例の非癌患者胆汁 cfDNA も同様に解析を行った。胆汁 ctDNA の感度は 58.3%であり、胆汁細胞診の感度は 45.8%であり、胆汁 Liquid biopsy の可能性を示唆する結果であった。

次世代シーケンサーによる胆汁中の ctDNA は検出可能であり、胆汁 Liquid biopsy は胆嚢癌診断の新たな有用な手法であった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Kinugasa H, Nouse K, Ako S, Dohi C, Matsushita H, Matsumoto K, Kato H, Okada H. Liquid biopsy of bile for the molecular diagnosis of gallbladder cancer. *Cancer Biol Ther*. 査読有, 19: 2018; 934-938; doi: 10.1080/15384047.2018.1456604

衣笠秀明, 能祖一裕, 赤穂宗一郎, 加藤博也, 岡田裕之. 膵癌診断におけるリキッドバイオプシーの可能性. *胆と膵*. 査読有, 37(9):2016; 841-845

〔学会発表〕(計4件)

衣笠秀明, 能祖一裕, 岡田裕之, 胆嚢癌診断における胆汁 Liquid biopsy の可能性, 第104回日本消化器病学会総会(シンポジウム), 東京, 2018年

Hideaki Kinugasa, Kazuhiro Nouse, Soichiro Ako, Kazuyuki Matsumoto, Hironari kato, Hiroyuki Okada. The development of non-invasive molecular diagnosis of gallbladder cancer by bile juice-liquid biopsy. UEGW, Barcelona, 2017

Hideaki Kinugasa, Kazuhiro Nouse, Soichiro Ako, Kazuyuki Matsumoto, Hironari kato, Hiroyuki Okada. The development of non-invasive method for the molecular diagnosis of gallbladder cancer. Digestive Disease Week and the annual meeting of the American Gastroenterological Association (DDW), Chicago, 2017

Hideaki Kinugasa, Kazuyuki Matsumoto, Soichiro Ako, Koichiro Tsutsumi, Hironari Kato, Kazuhiro Nouse, Hiroyuki Okada. New Insight of Liquid Biopsy With Bile Juice in Patients With Gallbladder Cancer. Digestive Disease Week and the annual meeting of the American Society for Gastrointestinal Endoscopy (DDW), San Diego, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。