

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07999

研究課題名(和文) 分子バーコード併用次世代シーケンスによる高感度網羅的リキッドバイオプシーの開発

研究課題名(英文) High sensitive and comprehensive liquid biopsy by digital NGS

研究代表者

高野 伸一 (Shinichi, Takano)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：80377506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：体液生検法(リキッドバイオプシー)は、血中や体液などから低侵襲に遺伝子診断を実現することを目指しているが、体液に含まれる希少変異はSequence errorなどによるノイズの区別が困難であった。最近、そのノイズを除去する方法として分子バーコード併用次世代シーケンス(デジタルNGS)が開発され、高感度性を保ちつつ網羅性を兼ね備えた新規技術として期待されるものの、実際の臨床検体での有用性評価は不十分である。本研究では予後不良な膵癌患者の血液検体を主に用い、44%の症例からメジャーなKRAS変異を正確に検出することを確認し、また、分子標的薬の治療標的となりうるコピー数異常も検出可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

採血検体から組織と同じ変異が高率に検出可能であった。実際の臨床検体を用いて、単一遺伝子のみならず網羅的な遺伝子解析が可能であったことを確認できた点が有意義である。さらに、変異DNA量が少ない検体で次世代シーケンスを行う場合、配列の読み間違い、ノイズが発生するが、分子バーコードを使用することでそれを大幅に軽減できたことを確認した点、および治療標的となりうる遺伝子異常が検出可能であった点、変異遺伝子の割合を追うことで、治療のモニタリングが可能であることを示せた点で、将来への臨床応用の可能性が近付いた。

研究成果の概要(英文)：We assessed the utility of precise tag sequencing that eliminates PCR and sequence error-derived noises. Digital PCR was conducted for 45 patients with KRAS mutation in the EUS-FNA samples. Tag sequence of cfDNA was performed for patients with >2% allele frequency in KRAS by digital PCR. Tag sequence could detect mutations in KRAS (44%) and TP53 (28%) as well as copy number alterations in CCND2 (1 case), FGFR1 (1 case), and MYC (2 cases). Tag sequence for cfDNA and EUS-FNA samples was possible and could be informative for the clinical implication and therapeutic decisions. These results would lead to further development toward the improvement of prognosis of pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：リキッドバイオプシー 分子バーコード 次世代シーケンス 膵癌 遺伝子解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の恩恵が少ない膵癌では、その進行期には組織採取も体力的に困難なことが多く個別化医療にとって不利な条件が重なる。近年盛んに行われている体液生検法(リキッドバイオプシー)は、血中や体液中にごく微量に存在する腫瘍細胞由来核酸から特定の遺伝子変異を検出し、組織の採取なく低侵襲に診断を実現することを目指している。生検が容易でない進行癌患者の治療方針決定に大きく寄与する可能性を秘めており将来有望な方法である。しかしながら、体液生検法の感度は改善しつつあるものの少数の遺伝子変異を検出するにとどまっておき、また、希少変異は Sequence error などによるノイズの区別が困難なことも多く、網羅性と正確性を兼ね備えた技術革新が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では予後不良な消化器癌患者の個別化医療や、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)など膵癌の前癌病変の良悪性診断を目指し、血液や膵液検体からの希少な変異を高精度・高感度かつ網羅的に検出可能な、分子バーコード併用次世代シーケンス(デジタル PCR)による新しい体液生検法(リキッドバイオプシー)の開発・確立を行う。

3. 研究の方法

(1) 高感度で網羅性を兼ね備えた分子バーコードを併用した次世代シーケンス法(デジタル NGS)の可能性を検証する。具体的な方法として、12 個の塩基配列からなる 412=16,777,216 種類のバーコードを検体から抽出した DNA に付加し、その後の解析において、PCR と Sequence で得られた結果は同じ分子バーコードで 3 本以上同じ変異が検出された場合に真の変異と判断する。この方法により、PCR/Sequence error による人工的変異は大幅に軽減され、希少変異を正確にかつ網羅的に検出可能となる。

(2) 対象と検討項目

対象: EUS-FNA 検体の網羅的遺伝子解析施行済みの膵癌 58 症例のうち、KRAS メジャー変異(G12D, G12V, G12R)を有していた 45 症例の血漿抽出 cfDNA を対象とした(Stage I-III/IV = 16/29)。
 検討 1: dPCR による KRAS 変異検出率を検討した。

検討 2: dPCR により KRAS の allele frequency(AF)>2%の cfDNA を用い、dNGS による癌関連 52 遺伝子の網羅的解析を施行し、遺伝子異常に対応する分子標的薬の同定を試みた。

検討 3: 繰り返し採血による治療標的検出能を検討した。

4. 研究成果

(1) cfDNA のデジタル PCR による KRAS 変異検出(n=45, 図 1)では、CEA, CA19-9 の陽性率が 49, 80%であるのに対し、digital PCR では 93%の陽性率で、ステージごとの陽性率は差を認めなかった。さらに MAF および血漿 1ml あたりの絶対(mutant)コピー数もステージごとの差は認めなかった(図 2)。

(2) 25 症例 31 サンプルの cfDNA より dNGS を施行した。シーケンスのサマリーとしては、使用 DNA 量は平均で 19.3ng、標的遺伝子あたりの平均 read depth は 18000、original DNA の本数に相当する molecular depth の平均は 793 であった。dPCR と同じ KRAS 変異は 11 例(44%)で検出可能であり、

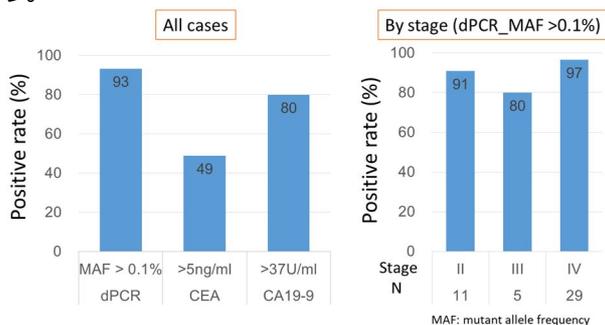


図 1: cfDNA のデジタルPCRによるKRAS変異検出 (n=45)

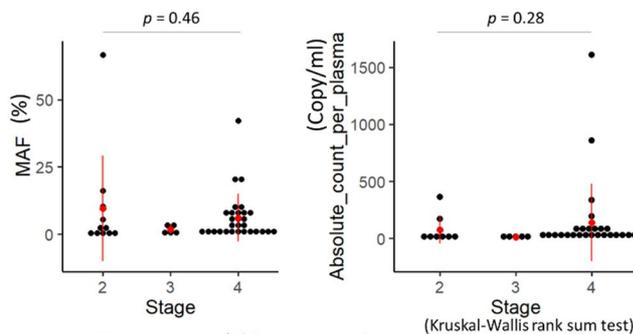


図 2: cfDNA のデジタルPCRによるKRAS変異検出(ステージ別)

表 1: cfDNA の遺伝子異常 (Digital NGS, 31 samples in 24 cases)

Case	Stage	Timing	Mutations				CNVs						
			KRAS		TP53_1		TP53_2		CCND2	CCND3	CDK4	FGFR1	MYC
			AA	MAF (%)	AA	MAF (%)	AA	MAF (%)					
1	4	D	G12D	2.4	R282W	2.3							
14	4	P	G12R	8.0	R273C	4.8							
15	4	D	G12R	12.4	R273C	8.2							
16	2	P	G12V	1.3									
17	4	P	G12V	7.2	A159V	0.2			Gain		Gain		
18	4	P	G12D	37.1	C176*	18.6	V274fs	0.1	Gain		Gain		
19	4	P	G12D	3.1					Gain				
20	4	P	G12D	0.9									
21	4	P	G12D	0.9									
22	4	P	G12D	0.9									
23	4	P	G12D	0.9									
24	2	P											

図 3: 分子バーコード(MB)有無での組織およびcfDNAの変異一致率

D, during therapy; P, pretherapy; MAF, mutant allele frequency; *, stop codon; AA, amino acid change; fs, frame shift mutation; CNVs, copy number variations

TP53 変異を 7 症例(28%)で検出した。また、copy number 異常を CCND2(1 例), FGFR1(1 例), MYC(2 例)に認め、CDK4 阻害剤や MEK 阻害剤の奏功が期待される症例が存在した (表 1)。

(3) 分子バーコードの効果を見るために、分子バーコード(MB)の有無で組織変異との一致率を比較した(図 3)。ROC 曲線では縦軸に組織変異との一致率、横軸は不一致率として示しているが、molecular barcode ありの解析(With MB)の方が左上にあり、有意に正確な解析法であった。その右のグラフは組織と一致した cfDNA の変異を青、不一致な変異をオレンジで示しているが、molecular barcode あり(With MB)では cut off を 0.2% と設定することで組織変異との一致率が 78.6%、不一致率が 0% と極めて良好な結果で、molecular barcode なし(Without MB)で同じ一致率を出そうとすると MAF の cut off は 0.5% となるが、不一致率が 18.2% となってしまい、また不一致率を 0% にしようとするとも MAF は 10% に設定することになり、そうすると一致率が 17.9% と著しく低下してしまう。

(4) 変異の全体像を示すと(図 4)、パネルの縦が遺伝子、横はサンプルで、パネルの上ではステージを色分けし、同一症例に複数回サンプリングしたものはグレーに塗りつぶしてある。パネル中心の○は組織で検出された変異、色のついた三角は cfDNA 中の変異で、左上の三角は molecular barcode あり(With MB)の解析で得られた変異、右下の三角は molecular barcode なし(Without MB)の解析で得られた変異。青の三角は組織と一致していた cfDNA 中変異で、KRAS, TP53 にみられ、緑は組織と一致していたが cut off で除外されてしまった変異。黄色は組織と異なる変異

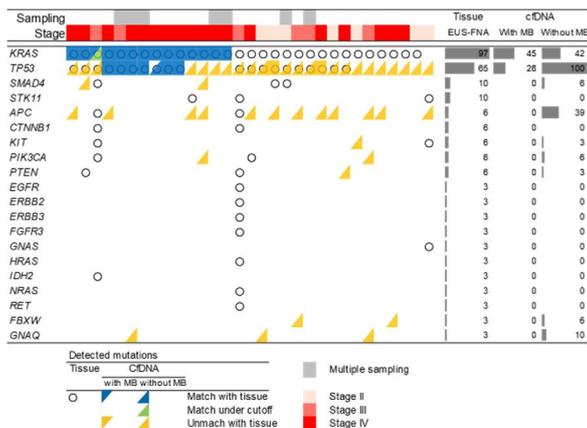


図 4: 変異検出の全体像 (組織とcfDNA)

で、多くは右下の三角、つまり組織と一致しない変異であり、これらはシークエンスエラーである可能性がある。KRAS, TP53, 全遺伝子について組織で得られた変異を 100%とした場合、cfDNA で組織と同じ変異が得られた割合は、cfDNA から molecular barcode ありの解析では KRAS が 47%、TP53 は 30%、全遺伝子では 26% 検出されていた。TP53 の molecular barcode なし(Without MB)の解析では組織より多くの変異が検出されていたが、多くは組織とは異なる変異であり、molecular barcode あり(With MB)の解析では多くが除外され、シークエンスエラーであったと考えられる。

(5) 5 症例で複数回の採血かつ dNGS を行い、全例で新たな遺伝子異常の同定あるいは MAF の上昇を認めた (表 1)。図 5 に示す症例は、3 回リキッドバイオプシー(LB)を行った症例で、化学療法中に肝転移が増悪し、青で示す CA19-9 も上昇していた。赤で示す KRAS の MAF は当初 0.7%であったが、8、12.4% と増加し、同時に MYC や CCND2 の増幅も検出されていた。

この症例では 2 次治療として GEM+nPTX を行っているが、将来的にはリキッドバイオプシーの結果を踏まえて、分子標的薬の使用という選択も実現するかもしれない。

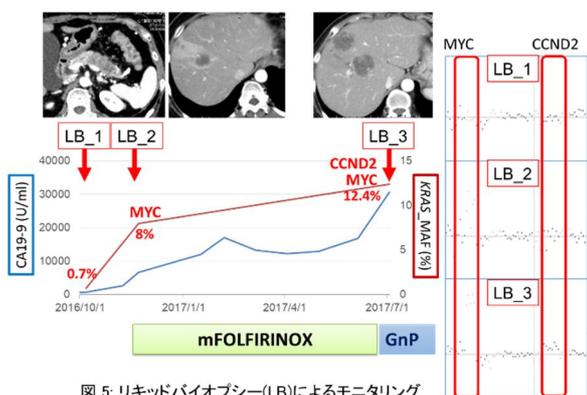


図 5: リキッドバイオプシー(LB)によるモニタリング

(5) まとめとして、分子バーコード併用次世代シークエンスによるリキッドバイオプシーにより、cfDNA の 45% から KRAS 変異を検出できた。また、分子バーコード(digital NGS)によりシークエンスエラーを大幅に軽減でき、変異のほか CNVs も検出でき、分子標的薬の治療標的探索に有用と考えられた。一方で、変異の検出感度は当初の予想より低く、デジタル PCR と比較すると劣る部分も見えてきた。コストはさらにかかるが、深い depth を得ることやさらに多くの DNA を投入することで改善する可能性があり、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Kadokura Makoto, Shindo Hiroko, Takahashi Ei, Hirose Sumio, Fukasawa Yoshimitsu, Kawakami Satoshi, Hayakawa Hiroshi, Maekawa Shinya, Mochizuki Kunio, Kawaida Hiromichi, Kono Hiroshi, Itakura Jun, Sato Tadashi, Ichikawa Daisuke, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Mutational Patterns in Pancreatic Juice of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and Concomitant Pancreatic Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001371	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa, H. Fukasawa, M. Sato, T. Takano, S. Kadokura, M. Shindo, H. Takahashi, E. Hirose, S. Kawakami, S. Fukasawa, Y. Maekawa, S. Inoue, T. Yamaguchi, T. Nakayama, Y. Kawaida, H. Kono, H. Mochizuki, K. Kondo, T. Ichikawa, D. Enomoto, N.	4. 巻 54
2. 論文標題 Carcinoembryonic antigen level in the pancreatic juice is effective in malignancy diagnosis and prediction of future malignant transformation of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01592-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Shindo Hiroko, Takahashi Ei, Fukasawa Yoshimitsu, Kawakami Satoshi, Hayakawa Hiroshi, Kuratomi Natsuhiko, Kadokura Makoto, Maekawa Shinya, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Digital next generation sequencing of cell free DNA for pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 508 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Yasuaki, Takano Shinichi, Maekawa Shinya, Yamaguchi Tatsuya, Yoshida Takashi, Kobayashi Shoji, Iwamoto Fumihiko, Kuno Toru, Hayakawa Hiroshi, Matsuda Shuya, Fukasawa Mitsuharu, Shindo Hiroko, Inoue Taisuke, Nakayama Yasuhiro, Ichikawa Daisuke, Sato Tadashi, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Fractionated small cell free DNA increases possibility to detect cancer related gene mutations in advanced colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 978 ~ 986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuratomi Natsuhiko, Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Maekawa Shinya, Kadokura Makoto, Shindo Hiroko, Takahashi Ei, Kondo Tetsuo, Ichikawa Daisuke, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 MiR-10a in Pancreatic Juice as a Biomarker for Invasive Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm by miRNA Sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3221 ~ 3221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22063221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Shindo Hiroko, Takahashi Ei, Hirose Sumio, Fukasawa Yoshimitsu, Kawakami Satoshi, Hayakawa Hiroshi, Kuratomi Natsuhiko, Kadokura Makoto, Maekawa Shinya, Sato Tadashi, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical significance of genetic alterations in endoscopically obtained pancreatic cancer specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3723	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukasawa Yoshimitsu, Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Maekawa Shinya, Kadokura Makoto, Shindo Hiroko, Takahashi Ei, Hirose Sumio, Kawakami Satoshi, Hayakawa Hiroshi, Yamaguchi Tatsuya, Nakayama Yasuhiro, Inoue Taisuke, Sato Tadashi, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Form-Vessel Classification of Cholangioscopy Findings to Diagnose Biliary Tract Carcinoma's Superficial Spread	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3311 ~ 3311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21093311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuno Toru, Tsukui Yuya, Takano Shinichi, Maekawa Shinya, Yamaguchi Tatsuya, Yoshida Takashi, Kobayashi Shoji, Sato Tadashi, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Genetic alterations related to endoscopic treatment of colorectal tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 75 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mateos R N., Nakagawa Hidewaki, Hirono Seiko, Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Yanagisawa Akio, Yasukawa Satoru, Maejima Kazuhiro, Oku-Sasaki Aya, Nakano Kaoru, Dutta Munmee, Tanaka Hiroko, Miyano Satoru, Enomoto Nobuyuki, Yamaue Hiroki, Nakai Kenta, Fujita Masashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Genomic analysis of pancreatic juice DNA assesses malignant risk of intraductal papillary mucinous neoplasm of pancreas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 4565 ~ 4573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石田泰章, 高野伸一, 榎本信幸
2. 発表標題 大腸癌の個別化治療をめざした腫瘍由来濃縮cfDNAによる高感度リキッドバイオプシーの開発
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野伸一, 深澤光晴, 榎本信幸
2. 発表標題 膵癌の個別化医療を目指したデジタル次世代シーケンスによるリキッドバイオプシー
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野伸一, 深澤光晴, 榎本信幸
2. 発表標題 膵癌のPrecision medicineを目指したEUS-FNA検体の次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野伸一, 深澤光晴, 榎本信幸
2. 発表標題 切除不能膵癌の予後予測および治療標的の同定を目指したEUS-FNA検体の次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第97回 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田泰章, 高野伸一, 榎本信幸
2. 発表標題 大腸癌の個別化治療をめざした腫瘍由来濃縮cfDNAによる次世代シーケンス解析の試み
3. 学会等名 第27回 JDDW
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野伸一, 深澤光晴, 榎本信幸
2. 発表標題 膵癌の個別化医療を目指したデジタル次世代シーケンスによるリキッドバイオプシー
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野伸一、深澤光晴、榎本信幸
2. 発表標題 膵癌のPrecision medicineを目指したEUS-FNA検体の次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深澤佳満、高野伸一、榎本信幸
2. 発表標題 新しい経口胆道鏡所見分類法の生検病理と遺伝子解析による妥当性評価
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田泰章、高野伸一、榎本信幸
2. 発表標題 大腸癌の個別化治療をめざした腫瘍由来濃縮cfDNAによる高感度リキッドバイオプシーの開発
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高野伸一、深澤光晴、榎本信幸
2. 発表標題 個別化医療を目指した分子バーコード併用次世代シーケンスによる膵癌リキッドバイオプシー
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田泰章、高野伸一、榎本信幸
2. 発表標題 腫瘍分画濃縮cfDNAの次世代シーケンスによる高感度網羅的リキッドバイオプシーの開発
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉富夏彦、高野伸一、榎本信幸
2. 発表標題 膵液での悪性IPMN診断を目指した次世代シーケンスによる網羅的microRNA解析
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野伸一、深澤光晴、榎本信幸
2. 発表標題 膵癌の個別化医療を目指したEUS-FNA検体による次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第98回 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 伸一, 深澤 光晴, 進藤 浩子, 高橋 英, 深澤 佳満, 川上 智, 早川 宏, 倉富 夏彦, 門倉 信, 榎本 信幸
2. 発表標題 遺伝子解析を見据えたEUS-FNA検体採取法についての検討
3. 学会等名 第28回 JDDW
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野伸一、深澤光晴、榎本信幸
2. 発表標題 予後不良な膵癌の個別化医療を目指したEUS-FNA検体による次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第28回 JDDW
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉富夏彦、高野伸一、榎本信幸
2. 発表標題 膵液による悪性IPMN診断を目指したmicroRNAの次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第28回 JDDW
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 泰章, 高野 伸一, 山口 達也, 前川 伸哉, 小林 祥司, 吉田 貴史, 岩本 史光, 久野 徹, 石田 剛士, 高岡 慎弥, 佐藤 公, 榎本 信幸
2. 発表標題 進行大腸癌患者の血清を用いた腫瘍由来循環DNA濃縮による癌関連遺伝子検出向上の試み
3. 学会等名 第28回 JDDW
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野伸一、深澤光晴、榎本信幸
2. 発表標題 治療標的探索を目指した膵癌の EUS-FNA検体による遺伝子解析
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉富夏彦、高野伸一、榎本信幸
2. 発表標題 Comprehensive analysis of microRNA expression in the pancreatic juice for diagnosis of malignant intraductal papillary mucinous neoplasm
3. 学会等名 第101回 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------