

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08663

研究課題名(和文)Liquid biopsyと腫瘍生検の遺伝子変異パターンによる直腸癌治療の最適化

研究課題名(英文)Optimization of Rectal Cancer Treatment by Gene Mutation Patterns in Liquid biopsy and Tumor Biopsy

研究代表者

長谷川 傑 (Suguru, Hasegawa)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：10362500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌患者の術前術後の周術期にリキッドバイオプシーを施行し、デジタルPCRによるセルフリーDNA中における変異型KRAS遺伝子および変異型BRAF遺伝子のmutant allele frequencyに関する解析をおこない、がんの再発の早期予測に対する有用性を検討した。その成果については、Scientific ReportsとCancer Medicineに論文発表した。早期再発におけるリキッドバイオプシーの意義を考えるうえで示唆に富む内容であり、さらに対象遺伝子を拡大させる必要性を感じさせる結果であった。今後は対象となる遺伝子変異を拡大させ、またAIを導入した解析を用いて検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌患者の術前術後にリキッドバイオプシーを施行し、デジタルPCRによる変異型KRAS遺伝子および変異型BRAF遺伝子に関する解析をおこない、がんの再発の早期予測に対する有用性を検討した。今回の結果のみからは再発の早期予測をすることは難しかった。さらに対象遺伝子を拡大させる必要性を感じさせる結果であった。今後は対象となる遺伝子変異を拡大させ、またAIを導入した解析を用いて検討する。

研究成果の概要(英文)：Liquid biopsy was performed in the perioperative period before and after surgery in patients with colorectal cancer, and the mutant allele frequencies of mutant KRAS and mutant BRAF genes in cell-free DNA were analyzed by digital PCR. The mutant allele frequencies of mutant KRAS and mutant BRAF genes in cell-free DNA were analyzed by digital PCR, and their usefulness for early prediction of cancer recurrence was examined. The results are highly suggestive of the significance of liquid biopsy in the early recurrence of cancer, and the results suggest the need to expand the number of target genes. In the future, we will expand the number of target gene mutations and use AI-based analysis.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 遺伝子変異 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対する手術療法は局所・遠隔再発の制御が課題である。外科治療を中心として術前に放射線治療や化学療法などの集学的治療を組み合わせることにより治療成績は向上してきたが、どのような症例に集学的治療をどう組み合わせるのかの最適化が今後の課題である。現在は主に治療前の画像診断をもとに治療方針が決定されているが、ここに分子生物学的情報の応用が期待されている。本研究では直腸癌患者の Liquid Biopsy(circulating tumor cell と circulating cell free DNA)とデジタル PCR や次世代シーケンサーを用いた治療前の生検癌組織の Genomic profile などの遺伝子的情報を用いて、大腸癌の遠隔・局所再発の予測因子の同定や放射線治療や化学療法に対する治療効果予測を行い、治療の最適化を行い、患者のみならず社会的にも必要最小限の負担により最大限の効果を目指す有望な研究と考えている。

2. 研究の目的

がん治療を困難にしている最大の理由は、がんの多様性にある。この多様性は、生物の進化と似たメカニズムで起こっていると考えられている。がん細胞は、治療を含めた様々な環境変化に応答し、その変化に適応するため進化した結果、ゲノムは時空間的な多様性を示している。がん細胞の多様性がどのように生じるのかを知ることが、がんの増殖・浸潤・転移の理解につながり、様々な治療の効果向上へ反映されると考えられる。この多様性のプロセスが、能動的か受動的か、偶発的か必然的か、連続的か断続的かについては不明な点も多い。担癌患者の末梢血には腫瘍細胞由来の circulating tumor DNA (ctDNA) が循環している。ctDNA を用いて分子診断を行うために採血することをリキッドバイオプシーと呼ぶ。そこで、がんに対する手術・化学療法・放射線療法・免疫療法などの治療前後のリキッドバイオプシー検体の遺伝子変化を次世代シーケンサーおよびデジタル PCR を用いて経時的に解析し、ストレス応答下におけるがんの進化のメカニズムについて明らかにする。

- (1)リキッドバイオプシーにより治療開始前から継続的・動的に ctDNA の遺伝子変異の評価を行うことにより、遺伝子変異の出現時期や変異部位が治療の効果や再発に与えるかを評価すること。
- (2)手術・化学療法・放射線療法の各治療法の経時的遺伝子変異の変化を検討して、治療ごとのがんのストレス応答による進化を評価することによって、がんに対する治療の順番・治療法の組み合わせ・薬剤の選択等の最適化、および治療効果予測を行う。

3. 研究の方法

大腸癌患者における手術・化学療法・放射線療法を施行した計約 200 名のリキッドバイオプシーを経時的に採取し、当科のバイオバンクで保管した。

- (1)サンプルは、解凍後に 1.5ml エッペンドルフチューブに入れて 1.6×1000 rcf(16000

g) 10分遠心する。細胞成分を含んだ pellet を吸わないようにして、血漿 800 μ l (200 \times 4回)を指定された場所に入れる。

(2)Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit を用いて型のごとく DNA を抽出する。電源を入れた際に sanitization をしておく。約 70 分。

(3)抽出した DNA を用いて、サンプル調整を行う。

1 サンプル当たり Master Mix 7.5 μ l , Taqman 0.375 μ l に 1.2 倍した量を用いる。サンプル数 \times 1.2 の量を premix して (4 サンプルであれば MasterMix36, Taqman1.8) 各チューブに premix 9 μ l と cfDNA 8.1 μ l を入れてよく混ぜ、タッピングする。

(4)デジタル PCR で解析するために Chip Loader を用いてチップを作成する。サンプルは 15 μ l 使用する。ローディング後の Immersion fluid は黒い四角の部分に上からゆっくりと滴下し、黒い四角の全体がカバーされるギリギリの量を入れる (入れすぎない)。チップリッドの接着の際には強く押しすぎない (fluid が漏れる原因になる)。

(5)PCR は 96 10分、(56 2分 98 30秒) \times 39cycles、56 2分、10 、約 3 時間。10 に設定する。ただし、チップを機械から取り出したら 1 時間以内に測定する。それぞれの遺伝子変異ごとに条件を検討する必要がある (KRAS:G12V は条件変更が必要)。読み取りの前にチップ表面を良く拭いてから行う。きれいに拭いてないと検出感度が低下する。読み取り後、USB に保存してパソコンにアクセスする。

上記により、サンプル中の目的とする遺伝子変異の量をデジタル PCR を用いて Mutant allele frequency(変異遺伝子の野生型遺伝子と変異遺伝子に対する割合)を算出、臨床データとの相関を検討する。

4 . 研究成果

上記の検討により、2つの論文作成が可能であった。

Oncological evaluation in the perioperative period using cfDNA with BRAF V600E mutation in patients with colorectal cancer. Scientific Reports 2021
BRAFV600E 変異を有する大腸癌患者の周術期の血液から cfDNA を抽出し、デジタル PCR システムを用いて解析した。BRAFV600E を有する cfDNA を測定することで再発を予測することは困難であったが、周術期の BRAF V600E の MAF は腫瘍径とは相関した。多くのがん細胞は早期から血液中に播種されるが、転移は非常に非効率的なプロセスを経ることが知られており、このことが早期再発の予測を困難にしていると思われる。

Relationship between perioperative oncological evaluation and recurrence using circulating tumor DNA with KRAS mutation in patients with colorectal cancer. Cancer Medicine 2022
KRAS 変異型大腸癌を対象として、周術期の血液から cfDNA を抽出し、デジタル PCR システムを用いて解析した。KRAS 変異を有する cfDNA を測定することで再発を予測することは困難であったが、周術期の KRAS 変異型の MAF は腫瘍径とは相関した。がん細胞は早期の段階から血液中に播種されるが、転移は非常に非効率的なプロセスを経ることが知られており、複数のプロセスから転移が成立する。したがって、複数の遺伝子の組み合わせが再発の早期予測に必要なことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Keita, Yoshida Yoichiro, Yamada Teppei, Hayashi Takaomi, Shimaoka Hideki, Yoshimura Fumihiro, Kajitani Ryuji, Munechika Taro, Matsumoto Yoshiko, Nagano Hideki, Komono Akira, Sakamoto Ryohei, Nakashima Ryo, Aisu Naoya, Yoshimatsu Gumpei, Hasegawa Suguru	4. 巻 11
2. 論文標題 Oncological evaluation in the perioperative period using cfDNA with BRAF V600E mutation in patients with colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92795-8	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 該当する

1. 著者名 Hayashi Takaomi, Yoshida Yoichiro, Yamada Teppei, Tanaka Keita, Shimaoka Hideki, Kajitani Ryuji, Munechika Taro, Nagano Hideki, Matsumoto Yoshiko, Komono Akira, Sakamoto Ryohei, Aisu Naoya, Yoshimatsu Gumpei, Yoshimura Fumihiro, Hasegawa Suguru	4. 巻 March21
2. 論文標題 Relationship between perioperative oncological evaluation and recurrence using circulating tumor DNA with KRAS mutation in patients with colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.4677	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 敬太, 吉田 陽一郎, 山田 哲平, 島岡 秀樹, 林 貴臣, 薦野 晃, 愛洲 尚哉, 吉松 軍平, 吉村 文博, 長谷川 傑
2. 発表標題 リキッドバイオプシーによる大腸癌BRAF V600Eの周術期経時的評価
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会
4. 発表年 2020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
研究分担者	山田 岳史 (Yamada Takeshi) (50307948)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	吉田 陽一郎 (Yoshida Yoichiro) (70580265)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	

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