

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07707

研究課題名(和文) 液状検体に対する分子バーコードを用いた超高感度システムによる膵癌早期診断法の開発

研究課題名(英文) Development of liquid biopsy for early diagnosis of pancreatic cancer using next generation sequence with molecular barcoding detection.

研究代表者

三方 林太郎 (Mikata, Rintaro)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：60596146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の解析では、血中K-RAS変異は7/68(10.3%)において検出された。血中K-RAS変異陰性の膵癌8症例でcirculating tumor cells (CTC)の解析も行い、Stage IIで3例(75%)、Stage IIIでは2例(50%)でCTCが検出された。十二指腸液の解析では、消化管由来と思われる遺伝子異常も検出され特異的な遺伝子異常の同定が難しかった。胆膵癌パネルを用いた胆汁NGS解析では、悪性胆道狭窄症早期症例(Stage I-II症例)で8/15(53%)においてOncogenic mutationが検出され、血液や胆汁遺伝子解析を用いた診断が早期診断に有用な可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では膵癌患者の血液、消化液等を利用しNGSを用いた超高感度システムによる遺伝子解析から早期診断のバイオマーカーを探索する目的である。予定していた十二指腸液のNGS解析は今後の集積が必要だが、血液検体を用いたCTC解析や胆汁を用いたNGS解析により、胆膵癌の早期診断につながりうる研究結果が得られた。難治癌であり早期診断が困難な胆膵癌の予後向上につながる可能性のある意義深い結果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：Blood K-RAS mutations were detected in 7/68 (10.3%) in the patients with pancreatic cancer. Circulating tumor cells (CTCs) were also analyzed in 8 pancreatic cancer patients negative for blood K-RAS mutation, and CTCs were detected in 3 (75%) of Stage II cases and 2 (50%) of Stage III cases. In the analysis of duodenal fluid, it was difficult to identify specific genetic abnormalities because genetic abnormalities thought to be derived from the gastrointestinal tract were also detected. NGS analysis of bile using the cholangiopancreatic Cancer Panel detected oncogenic mutations in 8/15 (53%) of early-stage cases of malignant biliary stricture (Stage I-II cases), suggesting that blood and bile gene analysis may be useful for early diagnosis for these cancers.

研究分野：消化器内科

キーワード：胆膵癌 NGS liquid biopsy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は5年生存率が7%と他疾患と比較し非常に悪く、最難治癌である。膵癌は近年増加傾向にあり、アメリカでは2020年に第3位、2030年に第2位になると予測されている。本邦死因の第4位であるが、今後さらなる増加が危惧されている。一方で、Stage 0(上皮内癌に相当)の5年生存率は85.8%、腫瘍径1cm以下の症例の5年生存率80.4%と報告され、早期診断が可能であれば、膵癌の予後が改善できることが示唆されている。また胆道癌も近年増加傾向で本邦死因の第6位であり、5年生存率が20%台と難治癌であり、膵癌と同様に早期診断が困難な疾患と考えられている。近年、次世代シーケンサー(Next-generation sequencing; NGS)による遺伝子変異解析技術が発展し、より高感度の分子バーコードを用いた遺伝子解析も可能となっている。しかし、胆膵癌の液状検体を用いて、NGSによる遺伝子解析から早期診断を目指す研究はまだ少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌などの胆膵腫瘍性病変を有する症例の血液、消化液等を対象としてNGSを用いた超高感度システムによる遺伝子解析から早期診断のバイオマーカーを探索し、内視鏡で採取可能な十二指腸液等の消化液を用いた早期診断法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

膵癌症例の血液サンプルを用いた解析では、KRAS 遺伝子変異を、G12A、G12C、G12D、G12R、G12S、G12V、G13D に対する混合プローブを用いたデジタルPCRにより検出した。また血中K-RAS変異が陰性であった一部の膵癌症例でcirculating tumor cells (CTC)の解析も行った。CTCはK2-EDTA採血管(BD Vacutainer®)にて採血し、Cell-surface vimentinを用いて解析を行った。胆膵癌の消化液(十二指腸液および胆汁)の解析では、In houseで作成した、60遺伝子280220塩基をターゲットとした胆膵癌パネルを用いた(表)。分子バーコードパネルは、胆膵癌に高頻度に認められる21遺伝子、7220塩基をターゲットとしてIn houseで設計した。シーケンサーはIon Protonを使用し、OncoKBの公開データを参照しアノテーションを行った。胆汁や十二指腸液は、治療や診断のために行われたERCPやEUS施行時に採取し、DNAを抽出した。

表

Signaling Pathways	Genes								
MAPK	<i>BRAF</i>	<i>EGFR</i>	<i>ERBB2</i>	<i>ERBB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>FGFR2</i>	<i>GNAS</i>	<i>HRAS</i>	<i>JAK3</i>
	<i>KRAS</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>MAP2K7</i>	<i>MAPK10</i>	<i>NF1</i>	<i>NRAS</i>	<i>NRG1</i>	<i>SOS2</i>	<i>SRC</i>
Epigenetic	<i>ARID1A</i>	<i>ARID1B</i>	<i>ARID2</i>	<i>BAP1</i>	<i>EPC1</i>	<i>KMT2A</i>	<i>KMT2C</i>	<i>PBRM1</i>	
PI3K	<i>AKT1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PTEN</i>	<i>STK11</i>	<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>			
DNA damage repair	<i>ATM</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>PALB2</i>	<i>TP53</i>			
TGF	<i>ACVR1B</i>	<i>ACVR2A</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TGFBR2</i>					
Wnt	<i>APC</i>	<i>AXIN1</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>RNF43</i>					
Mismatch repair	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>					
Axon Guidance	<i>ROBO1</i>	<i>ROBO2</i>	<i>SLIT2</i>						
Transcriptional	<i>ELF3</i>	<i>NFE2L2</i>							

activator		
Splicing factors	<i>RBM10</i>	<i>SF3B1</i>
NADPH Metabolism	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>
Myc	<i>MYC</i>	

4. 研究成果

2019年6月～2020年8月に当院でEUS-FNAもしくは手術を施行した膵癌症例68例を対象として血液サンプルの解析を行った(男性/女性:36/32例、平均年齢70歳、腫瘍径30.0 ± 11.7mm、Stage1,2/3,4:39/29例)。また手術検体10例、FNA検体19例、一部の症例で十二指腸液を採取し解析を行った。血中K-RAS変異は、7例(10.3%)において検出された。変異陽性例は全例StageIVで、陰性例と比較して腫瘍径が有意に大きく、WBC、CRPが有意に高値であった。血液検体ではK-RAS変異の陽性率がやや低かったが、手術検体では10例中7例、FNA検体では19例中16例でK-RAS変異が同定され既報と同程度であった。

血中K-RAS変異が陰性であった膵癌8症例(StageⅠ:4例、StageⅡ:4例)でCTCの解析も行った。結果はStageⅠで3例(75%)、StageⅡでは2例(50%)でCTCが検出され、膵癌の早期例でも検出可能であることが確認できた。

胆膵癌パネルを用いた胆汁NGS解析では、2018年4月～2021年3月にかけてERCPを行った悪性胆道狭窄症例43例(肝門部胆管癌24例、遠位胆管癌5例、胆嚢癌10例、肝内胆管癌4例)の胆汁を解析した。胆膵癌パネル(遺伝子数60)を用いてNGS解析を行い、全体で46.5%(20/43)の胆汁検体よりOncogenic mutationを検出し、このうちstageⅠ、Ⅱ症例では53%(8/15)においてOncogenic mutationが検出された。また胆汁細胞診別の陽性率を検討すると、Class4-5の症例では75%で腫瘍由来の変異が同定され、Class3以下の症例でも35%(11/31)にOncogenic mutationが検出された(表1)。これらの結果から、血液や胆汁遺伝子解析を用いた診断が早期診断に有用な可能性が示唆された。

表1

Clinical diagnosis	Cytology	Oncogenic mutations
Gallbladder cancer	Class I	<i>TP53</i>
cholangiocellular carcinoma	Class I	<i>TP53</i>
Gallbladder cancer	Class I	<i>TP53</i>
cholangiocellular carcinoma	Class II	<i>TP53 KRAS</i>
cholangiocellular carcinoma	Class II	<i>TP53 SMAD4</i>
cholangiocellular carcinoma	Class III	<i>BRCA2</i>
Gallbladder cancer	Class III	<i>ARID2, TP53</i>
cholangiocellular carcinoma	Class III	<i>TP53 ERBB2 PBRM1 ELF3</i>
cholangiocellular carcinoma	Class III	<i>TP53 ERBB3 BRAF</i>
cholangiocellular carcinoma	Class III	<i>KRAS</i>
cholangiocellular carcinoma	Class III	<i>ARID1A</i>

膵癌の十二指腸液 3 例の解析では、2 例で分子バーコード法を用いても遺伝子異常を検出することはできなかった。1 例で通常の NGS で検出された KRAS(p.G12R), TP53(p.Y220C)変異だけでなく、分子バーコード法にて、通常の NGS で検出できなかった ERBB2(p.S310F), KRAS(p.Q61H), CTNNB1(p.T41A)変異を検出しえた。胆道癌の十二指腸液 3 例の結果と合わせると、通常のパネルでは 2 症例 33%に oncogenic mutation が検出されたのに対し、分子バーコードでは 4 症例 67%で検出され、分子バーコードを用いて遺伝子変異検出率の向上が得られる可能性が示唆された。

<引用文献>

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014; 74:2913-21

Egawa S, Toma H, Ohigashi H, Okusaka T, Nakao A, Hatori T, Maguchi H, Yanagisawa A, Tanaka M. Japan Pancreatic Cancer Registry; 30th year anniversary: Japan Pancreas Society. *Pancreas*. 2012 41(7):985-92.

Hirotsu Y, Otake S, Ohyama H, Amemiya K, Higuchi R, Oyama T, Mochizuki H, Goto T, Omata M. Dual-molecular barcode sequencing detects rare variants in tumor and cell free DNA in plasma. *Sci Rep*. 2020 25;10(1):3391.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asano Koshō, Mikata Rintaro, Chiba Tetsuhiro, Kan Motoyasu, Maruta Shikiko, Yamada Toshihito, Miura Yoshifumi, Shima Yukiko, Sensui Miyuki, Nagashima Hiroki, Yokoyama Masayuki, Ohyama Hiroshi, Kusakabe Yuko, Yasui Shin, Sugiyama Harutoshi, Ohno Izumi, Kato Jun, Takano Shigetsugu, Ohtsuka Masayuki, Kato Naoya	4. 巻 21
2. 論文標題 Analysis of circulating cell-free DNA after endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 1030 ~ 1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2021.04.001	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 Ohyama Hiroshi, Hirotsu Yosuke, Amemiya Kenji, Oyama Toshio, Imuro Yuji, Kojima Yuichiro, Mikata Rintaro, Mochizuki Hitoshi, Kato Naoya, Omata Masao	4. 巻 28
2. 論文標題 Detection of actionable mutations in archived cytological bile specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 837 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.994	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅野公将, 三方林太郎, 加藤直也
2. 発表標題 膵癌におけるEUS-FNA前後のcell free DNAを用いた解析
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 大山広, 弘津陽介, 雨宮健司, 飯室勇二, 小山敏雄, 三方林太郎, 望月仁, 加藤直也, 小俣政男
2. 発表標題 EUS-FNAで得られた膵癌組織検体のゲノム解析は治療標的遺伝子変異を検出できる
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野公将, 三方林太郎, 千葉哲博, 加藤直也
2. 発表標題 膵癌EUS-FNA 前後でのcell free DNA を用いた解析
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大山広, 加藤直也, 小俣政男, 弘津陽介, 雨宮健司, 廣瀬純穂, 三方林太郎, 小山敏雄, 鷹野敦史, 飯室勇二, 望月仁
2. 発表標題 胆汁ゲノムプロファイル解析は手術不能悪性胆道狭窄例において分子標的治療薬探索に有用である
3. 学会等名 第57回日本胆道学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大山広, 弘津陽介, 雨宮健司, 鷹野敦史, 三方林太郎, 小山敏雄, 飯室勇二, 望月仁, 加藤直也, 小俣政男
2. 発表標題 胆膵癌に対するリキッドバイオプシー ; 分子バーコードとdeep sequencingとの対比
3. 学会等名 第25回日本外科病理学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦義史, 大山広, 三方林太郎, 杉山晴俊, 安井伸, 大野泉, 日下部裕子, 弘津陽介, 雨宮健司, 望月仁, 千葉哲博, 池田純一郎, 大塚将之, 小俣政男, 加藤直也
2. 発表標題 胆道疾患における胆汁を用いたLiquid biopsyの有用性の検討
3. 学会等名 JDDW 2021 (第63回日本消化器病学会大会)
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
研究 分 担 者	弘津 陽介 (Yosuke Hirotsu) (10793838)	地方独立行政法人山梨県立病院機構山梨県立中央病院 がん センター局ゲノム解析センター・ゲノム解析センター・チー フ研究員 (83504)	

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
---------	---------