

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K17402
研究課題名（和文）膵癌診療におけるliquid biopsyの確立と超早期診断への応用

研究課題名（英文）Liquid biopsy for early detection of pancreatic cancer

研究代表者

藤森 尚（Fujimori, Nao）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60808137

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）：2019年12月から2021年4月の期間に、膵癌17症例の末梢血から遊離DNA（cell-free DNA；cfDNA）を抽出し（平均濃度233.1pg/μl）、前向きに追跡した。長期間の追跡が可能であった症例では、いずれも一旦低下したcfDNAが再上昇に転じた。cfDNA由来の網羅的遺伝子発現解析（cfDNA-seq）の経時的変化に着目すると、ALK、BCL2L2、FGFR4など一部の遺伝子変異が、症例や化学療法前後に問わず一致していた。また、外科切除検体由来のDNA-seqとcfDNA-seqを比較すると、病状の進行と共に両者の遺伝子発現の差異が大きい結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非侵襲的に繰り返しのサンプリングが行えるリキッドバイオプシーは、組織採取が難しい膵癌において特に期待されている。実臨床において、血液を使用するがん遺伝子パネル検査が保険収載されたが、膵がん診療における有用性は定まっていない。本研究から、リキッドバイオプシーはサンプル採取の状況に遺伝子発現の結果が大きく左右されることが明らかとなった。すなわちリキッドバイオプシーの結果を解釈する際には十分注意を払う必要があり、今後の臨床応用の一助となる結果であった。がんの原発巣組織とリキッドバイオプシーにおける遺伝子変異の相同性についての更なる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to evaluate the usefulness of liquid biopsy for pancreatic cancer. Seventeen patients with pancreatic cancer between December 2019 and April 2021 were prospectively enrolled in this study. Cell-free DNA (cfDNA) could be extracted from the peripheral blood of all patients and mean concentration of cfDNA was 233.1pg/μl. In patients with long-term follow-up, the once-decreased cfDNA due to chemotherapy turned to re-elevation as disease progression. We performed comprehensive gene expression analysis (cfDNA-seq) and evaluated temporal changes in the results of cfDNA-seq in each patient. Some gene mutations such as ALK, BCL2L2, and FGFR4 were consistent regardless of the patient or induction of chemotherapy. Finally, we compared cfDNA-seq from peripheral blood with DNA-seq from surgically resected specimen. As a result, the difference in gene mutation between two groups increased as the disease progressed.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 リキッドバイオプシー cell-free DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

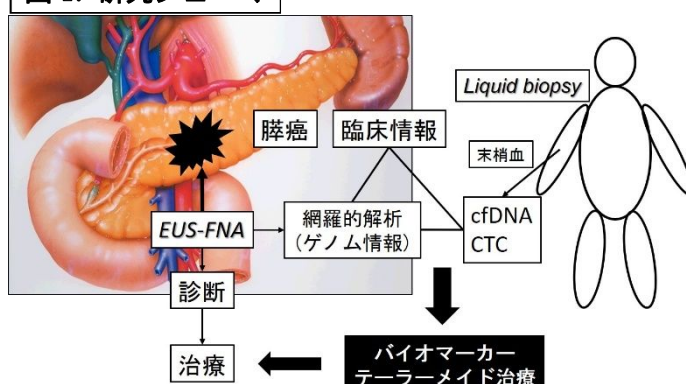
(1) 膵癌の10年生存率は4.9%と極めて不良であり、新たな診断・治療法開発が全世界的に切望されている。ごく一般的な腫瘍マーカーであるCA19-9以上に有用なバイオマーカーがなく、テララメド治療が確立していないことが膵癌診療の大きな課題である。超音波内視鏡下穿刺(Endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration; EUS-FNA)は経消化管的に対象物をリアルタイムに描出しながら針生検を行う手法であり、膵癌の確定診断及び組織採取法として有用である。手術検体が得られない切除不能膵癌症例において、癌細胞を採取できる唯一の方法がEUS-FNAであり、我々は膵腫瘍の診断におけるEUS-FNAの有用性をこれまで報告してきた(Fujimori N et al. *Scand J Gastroenterol* 2016)。また、新たなバイオマーカーを探索すべく、膵癌や膵神経内分泌腫瘍に代表される膵腫瘍の組織検体を用いた次世代シーケンサー(Next generation sequencing; NGS)による網羅的遺伝子発現解析プロジェクトが進行中であり、膵癌も同様の手法で解析が可能である。

(2) 一方、上述のがんバイオマーカー同定には、末梢血などの体液からサンプルを抽出するリキッドバイオプシーが、その低侵襲性と利便性から急速に広がりつつある。血中の遊離DNA(cell-free DNA; cfDNA)の解析はリキッドバイオプシーの一つであり、cfDNAの一部は生体内のがん由来であることが想定されている。組織検体と異なり繰り返しのサンプル採取が容易であることから、リキッドバイオプシーを行うことで、がんのゲノム異常を経時的に評価することが可能となる。一方で、cfDNA濃度の上昇は、がんでない個体でも見られることや、膵癌はcfDNA検出が難しいがんの一つであることも報告されており、膵癌診療におけるリキッドバイオプシーの意義については未だ明らかでない。我々はリキッドバイオプシーに関する先行研究を行い、外科手術前後、切除後再発時、化学療法の導入前後など、膵癌患者の様々な時点や病期(ステージ)において血漿サンプル中にcfDNAが存在することを明らかにした。その中に外科手術前と比べて術後cfDNA値が著明に低下する症例が存在することを見出した。血中のcfDNAが膵癌の治療・再発や長期予後に関連する可能性を示す結果と考える。これら予備検討の結果から、cfDNAの真の意義を明らかにし、膵癌が持つ最大の謎である「がんの不均一性」を解明すべく本研究計画を立案した。研究シエマを図1に示す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵癌患者の末梢血中のcfDNAを前向きに複数回測定することで、リキッドバイオプシーの有用性を明らかにすることである。EUS-FNAなどの生検検体からは、採取した部位のがん情報が得られるのに対し、cfDNAからは理論上全身のがん病変に由来する情報が得られる。既存のFNA組織や手術組織とcfDNAのゲノム情報を比較することで、転移に関わる遺伝情報を収集でき、これまで得られなかった超早期の膵癌再発マーカーや治療抵抗因子を同定することが期待される。

図1. 研究シエマ



3. 研究の方法

(1) サンプル採取：当院倫理委員会の承認を得た後、2019年12月より患者集積とサンプル採取を開始した。各患者におけるサンプル採取タイミングは以下のようにした。

・外科手術症例：切除可能膵癌や切除可能境界膵癌に対して、術前化学療法(NAC)前後の遺伝学的情報の経時的变化を評価するため、診断時(NAC前)、手術前(NAC後)、術後は約3か月毎に、通常の血液検査時に追加して末梢血10mlを採取した。

・術後再発症例及び切除不能症例：膵癌に対する標準的な化学療法(塩酸ゲムシタピン+ナブパクリタキセル併用療法、もしくはmodified FOLFIRINOX療法)が導入できる症例を対象とした。化学療法前、化学療法導入後に、外科手術症例と同様約3か月毎に末梢血10mlを採取した。

(2) cfDNA抽出：採取した末梢血より血漿を抽出し、外部委託先へ輸送した。cfDNAを抽出し、cfDNAを定量化した。(1)のタイミングで得たサンプルからcfDNA濃度の経時的变化を評価した。

(3) NGSによる全ゲノムシーケンス解析(cfDNA-seq)

リキッドバイオプシーの有用性を評価するためには、切除組織との遺伝子発現比較解析が重要と考え、NGS解析は、術後再発症例を主にその対象とした。症例を選択し、(2)で抽出したcfDNAからcfDNA-seqを行った。更に外科切除組織由来のDNA-seqと末梢血由来のcfDNA-seqを比較解析した。

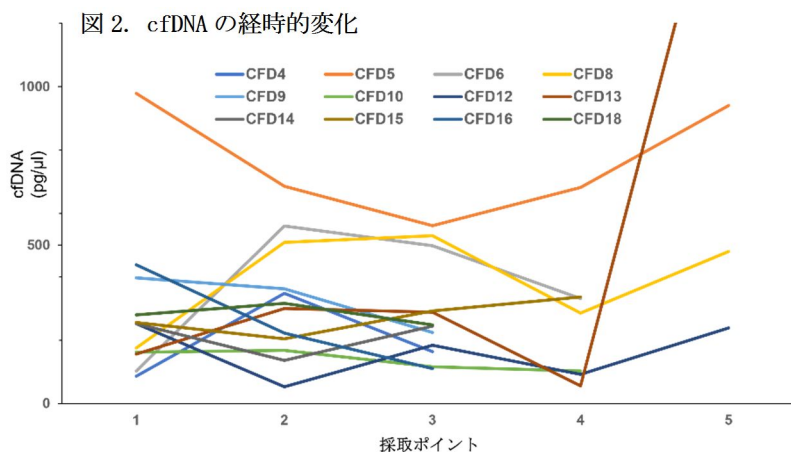
4. 研究成果

(1) 膵神経内分泌腫瘍術後組織の遺伝子解析と再発因子の同定

膵神経内分泌腫瘍は膵に発生する悪性腫瘍として、膵癌に次ぐ発生頻度を有している。膵癌に着手する前に、膵神経内分泌腫瘍の切除検体組織から網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)を行った。結果として、術後再発群で有意に発現が増加する遺伝子群(CLEC3A, MMP7, LCN2)を同定し、それらはいずれも細胞接着・遊走に関わる因子であることを明らかにした。これらの遺伝子発現について、別検体を用いて検証したところ、やはり再発群において非再発群より有意に増加していること確認し、新たな再発予測マーカーとして報告した(Miki M, Fujimori N, et al. *Cancer Med.* 8:3748-3760. 2019)。本手法を膵癌切除組織検体や生検検体にも応用した。

(2) cfDNA 抽出と cfDNA 濃度の経時的变化

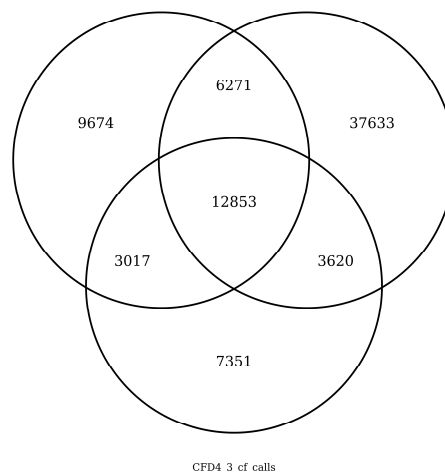
2019年12月から2021年4月の期間に、当科で診療した膵癌17症例(男女比:10/7、平均年齢65歳)に対して研究登録の同意を得た後、サンプル採取を行った。NAC症例、術後再発症例、遠隔転移症例がそれぞれ、2例、14例、2例ずつであった。17症例全例の末梢血サンプルから、cfDNA抽出が可能であり、cfDNAの平均濃度は233.1pg/μlであった。最終的に切除組織とcfDNAの比較解析を目標としたため、対象を術後再発症例に絞り、経時的变化を追跡した。術後再発12症例において、化学療法前後の少なくとも3時点でcfDNAを抽出し、経時的变化を評価しえた。各サンプルのcfDNA濃度の経時的变化を図2に示す。cfDNAの増減は症例により様々であったが、興味深いことに5ポイント以上の採取が可能であった症例、すなわち長期間の追跡が可能であった症例はいずれも一旦低下したcfDNAが再上昇に転じていた。病状進行と共にcfDNA濃度が増加し、バイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。



(3) cfDNA-seq と外科切除検体との比較

cfDNAが得られた症例の中から、術後再発かつcfDNAの経時的变化(少なくとも3サンプル以上の検体採取)が評価できる症例を抽出し、5症例17サンプルから、ライブラリー作成とcfDNA-seqを行った。遺伝子カウント数の代表症例として、症例4のベン図(Venn diagram)を図3に示す。遺伝子カウント数とその種類が経時的に変化しており、一部の遺伝子変異は経時的に保たれていることが明らかとなった。一方、サンプル採取のタイミングで発現遺伝子が大きく変動する点は臨床応用において大きな課題となることが示唆された。続けて、臨床的に有用な遺伝子バリエーションが存在するか、またそれが経時的に変化するかを評価するために、代表的ながん遺伝子パネル検査である

図3. cfDNA-seqにおける遺伝子カウント数のベン図



FoundationOneの遺伝子群(324遺伝子)を用いたターゲットシーケンスと対比した。結果として、ALK, BCL2L2, FGFR4など一部の遺伝子変異が、症例や治療前後に問わず一致していた。最後に末梢血由来のcfDNA-seqと外科切除検体由来のDNA-seqを各4症例ずつで比較解析した。結果として、病状の進行と共にcfDNA-seqの遺伝子発現の変動が大きいたことが明らかとなった。化学療法の修飾と共に、腫瘍の不均一性を反映したものと考察した。また、外科切除検体との比較解析でも、リキッドバイオプシーの各時点で変異遺伝子は変動していた。一方で、cfDNA-seqの経時的变化で共通する遺伝子変異数に注目すると、例えば膵癌のbig 4遺伝子パスウェイに関連するものでは、いずれの症例も30前後になることが明らかとなった。今後は如何に解析集団を絞って効率的に変異を同定できるかが臨床応用の鍵となる。また、上述の如く、リキッドバイオプシーにおいてはサンプル採取の状況(病勢、化学療法の既往)に遺伝子発現の結果が大きく左右されることに十分な注意が必要であり、原発巣組織とリキッドバイオプシー検体における遺伝子変異の相同性についての更なる検討が必要である。

本研究成果の一部として、膵癌切除可能性を予測する臨床病理学的因子について原著論文に纏め、報告した(*Discover Oncology*, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito Tetsuhide, Fujimori Nao, Honma Yoshitaka, Kudo Atsushi, Hijioka Susumu, Katsushima Shinji, Kimura Yasutoshi, Fukutomi Akira, Hisamatsu Seiichi, Nakajima Akihiro, Shimatsu Akira	4. 巻 17
2. 論文標題 Long term safety and efficacy of lanreotide autogel in Japanese patients with neuroendocrine tumors: Final results of a phase II open label extension study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 e153 ~ e161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajco.13371	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 Fujimori Nao, Miki Masami, Lee Lingaku, Matsumoto Kazuhide, Takamatsu Yu, Takaoka Takehiro, Teramatsu Katsuhito, Suehiro Yuta, Murakami Masatoshi, Igarashi Hisato, Oono Takamasa, Ohtsuka Takao, Nakamura Masafumi, Koga Yutaka, Oda Yoshinao, Ito Tetsuhide, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Natural history and clinical outcomes of pancreatic neuroendocrine neoplasms based on the WHO 2017 classification; a single-center experience of 30 years	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 709 ~ 715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2020.04.003	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 Ohno Akihisa, Fujimori Nao, Miki Masami, Oono Takamasa, Igarashi Hisato, Matsuda Ryota, Koga Yutaka, Oda Yoshinao, Ohtsuka Takao, Nakamura Masafumi, Ito Tetsuhide, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Collision of a pancreatic ductal adenocarcinoma and a pancreatic neuroendocrine tumor associated with multiple endocrine neoplasm type 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 358 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01234-0	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 Murakami Masatoshi, Fujimori Nao, Nagao Yoshihiro, Yoshizumi Tomoharu, Matsumoto Kazuhide, Yasumori Sho, Teramatsu Katsuhito, Takamatsu Yu, Oono Takamasa, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Colonic varices: a rare complication of pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01225-1	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 藤森 尚、村上 正俊、末廣 侑大、松本 一秀、寺松 克人、高松 悠、高岡 雄大、竹野 歩、大野 隆真、小川 佳宏	4. 巻 97
2. 論文標題 膵がんの日常診療 - 診断の進め方	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床と研究	6. 最初と最後の頁 537-542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Miki Masami, Oono Takamasa, Fujimori Nao, Takaoka Takehiro, Kawabe Ken, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Saito Daisuke, Nakamura Masafumi, Ohkawa Yasuyuki, Oda Yoshinao, Suyama Mikita, Ito Tetsuhide, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 CLEC3A, MMP7, and LCN2 as novel markers for predicting recurrence in resected G1 and G2 pancreatic neuroendocrine tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3748-3760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2232	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 Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Kimura Ryuichiro, Matsuda Ryota, Mori Yasuhisa, Nakata Kohei, Kakiyama Daisuke, Fujimori Nao, Ohno Takamasa, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 26
2. 論文標題 Neoadjuvant Chemotherapy with Gemcitabine Plus Nab-Paclitaxel for Borderline Resectable Pancreatic Cancer Potentially Improves Survival and Facilitates Surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1528 ~ 1534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07309-8	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 藤森 尚、伊藤 鉄英、大野 彰久、松本 一秀、寺松 克人、高松 悠、三木 正美、高岡 雄大、大野 隆真、小川 佳宏	4. 巻 31
2. 論文標題 膵癌・膵神経内分泌腫瘍 膵嚢胞性腫瘍を除いて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 消化器内視鏡	6. 最初と最後の頁 676-682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Murakami Masatoshi, Fujimori Nao, Ohno Akihisa, Matsumoto Kazuhide, Teramatsu Katsuhito, Takamatsu Yu, Takeno Ayumu, Oono Takamasa, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Nakamura Masafumi, Ishigami Kousei, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Predictive factors of operability after neoadjuvant chemotherapy in resectable or borderline resectable pancreatic cancer: a single-center retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Discover Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12672-021-00462-1	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 藤森 尚、寺松 克人、高松 悠、上田 孝洋、平畠 啓介、大野 彰久、村上 正俊、安森 翔、松本 一秀、竹野 歩、大野 隆真、小川 佳宏	4. 巻 43
2. 論文標題 Liquid biopsyの膵癌切除後のサーベイランスへの応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 71-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Fujimori Nao, Minoda Yosuke, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 34
2. 論文標題 What is the best modality for diagnosing pancreatic cancer?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 744 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/den.14283	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 1件)

1. 発表者名 藤森 尚、三木 正美、大野 彰久、松本 一秀、寺松 克人、高松 悠、高岡 雄大、大野 隆真、五十嵐 久人、藤山 隆、伊藤 鉄英
2. 発表標題 切除不能膵神経内分泌腫瘍に対する薬物療法におけるランレオチドの位置付け
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高岡 雄大、大野 隆真、大野 彰久、松本 一秀、寺松 克人、高松 悠、三木 正美、藤森 尚、五十嵐 久人、伊藤 鉄英、小川 佳宏
2. 発表標題 膵癌におけるインスリン分泌能の後方視的検討
3. 学会等名 第61回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujimori N, Takamatsu Y, Miyagahara T, Suehiro Y, Kaku T, Kawabe K, Oono T, Ogawa Y
2. 発表標題 Safety and efficacy of endoscopic duodenal stent for malignant gastric outlet obstruction; a multi-center retrospective study
3. 学会等名 Asian Pacific Digestive Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤森 尚、大野 隆真、中村 雅史
2. 発表標題 慢性膵炎の経過観察はいつまで必要か? ~小膵石診断8年後に切除可能膵癌を合併した症例から~
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 松本 一秀、藤森 尚、蓑田 洋介、原 真児登、梯 祥太郎、安森 翔、村上 正俊、寺松 克人、高松 悠、長友 周三郎、西岡 慧、小森 圭司、日置 智惟、川元 美緒、大野 隆真、伊原 栄吉、国府島 庸之、小川 佳宏
2. 発表標題 膵癌患者由来オルガノイド樹立におけるEUS-FNABと経皮的肝腫瘍生検の有用性の検討
3. 学会等名 第63回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺松 克人, 大野 隆真, 松本 一秀, 村上 正俊, 高松 悠, 竹野 歩, 藤森 尚, 安森 翔, 原 真児登, 梯 祥太郎, 大野 彰久
2. 発表標題 末梢血リンパ球亜型と肺癌予後との検討
3. 学会等名 第52回日本痔臓学会大会
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

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