

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17508

研究課題名（和文）PIポリアミドを用いた血中循環腫瘍DNA濃縮による高感度遺伝子型判定法の開発

研究課題名（英文）Enrichment technique to allow early detection and monitor emergence of KRAS mutation in response to treatment

研究代表者

北川 善康（Kitagawa, Yoshiyasu）

千葉県がんセンター（研究所）・内視鏡科・医長

研究者番号：10838577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：血液中の微量ctDNAを濃縮する技術を開発し、膵臓がんの早期発見における有用性を検討した。＜検討1＞膵臓がん患者14例の血清サンプルからctDNAの検出を行った。患者背景は、Stage / / : 1/12/1、手術検体KRAS 12D/12V：11/3であった。濃縮後にctDNAの測定を行なったが、検出されなかった。＜検討2＞膵臓がん患者（21例）と健常者（21例）の血清サンプルを用い、ctDNA（KRAS G12）の検出を検討した。濃縮後ctDNAコピー数は、膵臓癌患者と健常者間に有意差はなかった。血清サンプルを用いたmutant KRASの検出は膵臓がんの早期発見に寄与しない可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、血液中を循環している微量な腫瘍由来DNA（ctDNA）を濃縮する技術を開発した。本研究では、この濃縮法を用いたctDNA解析が膵臓がん患者の早期発見に役立つか検討を行った。当センターで外科手術を受けたステージ～の膵臓がん患者を対象とし、手術前に採取された保存血清を用いて、ctDNA解析を行った。濃縮後にデジタルPCRでctDNAの測定を行ったが、ctDNAは検出されなかった。この濃縮法によるctDNA解析は、膵臓がんの早期発見に寄与しない可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We developed an enrichment method utilizing pyrrole-imidazole (PI) polyamides and their ability to bind the minor groove of B-DnA. In this study, we investigated the clinical feasibility of incorporating PI polyamides to detect KRAS mutations in ctDNA from pancreatic cancer patients. <Study 1> After enrichment, we performed ctDNA analysis in 14 pancreatic cancer patients with KRAS mutations who underwent surgery at our hospital, but ctDNA was not detected. <Study 2> We performed ctDNA analysis in 21 pancreatic cancer patients and 21 healthy volunteer. After enrichment, no significant difference was observed in the copy number of ctDNA (KRAS G12) between pancreatic cancer patients and healthy volunteer. Therefore, this enrichment technique might be not suitable as a marker for early diagnosis of pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科

キーワード：ctDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍由来循環腫瘍 DNA (ctDNA) を用いたがんのクリニカルシーケンスが注目されている。これまでに複数の研究グループが「無細胞状態で血中を循環する DNA (cfDNA) に含まれる ctDNA は、腫瘍ゲノム全体の代用となる」ことを報告している。そのためリキッドバイオプシーとして ctDNA を利用することが、腫瘍ゲノム解析の一つのブレイクスルーとして注目されている。次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスは、網羅性に優れるが、検出感度が低いのが問題である。一方、デジタル PCR は、検出感度に優れた ctDNA 解析技術である。しかし、リキッドバイオプシーによる ctDNA 解析の分析感度は、循環血液中の腫瘍由来変異フラグメント及び正常細胞由来フラグメントの量の劇的な変化に影響される。このことは特に腫瘍特異的 DNA の量が、解析可能な技術に対し少なすぎる場合 (がん初期のステージや微小残存病変) 偽陰性の要因となる。我々は、標的遺伝子の DNA 配列に特異的に結合するピロールイミダゾール含有ポリアミドにビオチンを付加修飾した複合体 (PI polyamide-biotin) を用いることで、血液中の微量 ctDNA を濃縮する技術を開発した。この方法をがん患者の血液サンプルに用いることで、簡便に血中の cfDNA に含まれる過剰な野生型の対立遺伝子の存在下においても微量な標的変異遺伝子の体細胞変異を同定することが期待できる。そこで、我々が独自開発した PI polyamide-biotin による変異 ctDNA の超濃縮法が確立されれば、がんの早期診断や術後再発解析などの精度向上が可能となり当該分野に大きな影響を与える。

2. 研究の目的

申請者は、組織から KRAS 変異陽性が確認されている大腸がん患者の保存血液を用いてパイロット研究を行い、デジタル PCR による ctDNA の検出感度が PI polyamide-biotin 濃縮後に向上し、早期大腸癌においても ctDNA が検出できることを確認した。

本研究課題は、PI polyamide-biotin を用いた微量 ctDNA の濃縮法について、特に膵臓がん患者を対象に、がんの早期診断・術後再発の指標・予後推定としての有用性を検討し、臨床応用を目指すものである。

3. 研究の方法

膵臓がん患者 (外科切除例) の血液を用いた PI polyamide-biotin による KRAS 遺伝子型判定

千葉県がんセンターが運営するバイオバンクにストックされ、包括的同意が得られた膵臓がん患者で検査後の残余検体が保存されている症例を検索し、まずは膵臓がん患者の 90% に認められる KRAS 変異の遺伝子型が明確なサンプルをピックアップする。作成したプロトコールに基づき PI polyamide-biotin (G12V-b, G12D-b) によるプルダウンアッセイを行う。患者の臨床データと KRAS 遺伝子型を統合し、PI polyamide-biotin を用いた微量 ctDNA の濃縮法について検討する。

膵臓がん患者と健常者の血清サンプルを用いた検討

J-MICC STUDY との共同研究にて、コホート登録時の採血後 2 年以内に膵臓がんと診断された研究対象者 (21 例) と健常者 (21 例) の血清サンプルを使用し、ctDNA (KRAS G12) の検出について検討する。

4. 研究成果

当センターで外科的治療を受けた膵臓がん患者 80 症例のパラフィン包埋組織ブロックから薄切標本を作成し、DNA を抽出後に、KRAS 変異遺伝子の測定を行った。結果、80 例中、65 例において KRAS 変異遺伝子を検出した (G12D: 38 例、G12V: 22 例、G12R: 5 例)。組織検体で KRAS 変異遺伝子型を判定した膵臓がん患者 14 例の保存血清サンプル (500 μ L) を使用し、ctDNA の検出を行った。患者背景は、Stage / / : 1/12/1、手術検体 KRAS G12D/G12V : 11/3 であった。PI polyamide-biotin を用いた濃縮操作後に、デジタル PCR を用いて、ctDNA (KRAS G12D/G12V) の測定を行なったが、ctDNA は検出されなかった。

用意した血清サンプル (150 μ L) から、cfDNA を抽出し、PI polyamide-biotin による ctDNA の濃縮操作を行い、デジタル PCR によって ctDNA (KRAS G12) を測定した。膵臓がん患者 (21 例) の背景は、男性 16 名 : 女性 5 名、平均年齢 65.4 歳、抽出した cfDNA 量 1480 \pm 801pg/Sample であった。健常者 (21 例) の背景は、男性 16 名 : 女性 5 名、平均年齢 65.5 歳、抽出した cfDNA 量 1383 \pm 1333pg/Sample であった。サンプル毎の Mutant KRAS のコピー数は、膵臓癌患者で 2.58 \pm 5.14Copies/Sample、健常者で 1.70 \pm 2.36Copies/Sample であった。cfDNA 中の Mutant KRAS のコピー数は、膵臓癌患者で 0.00624 \pm 0.00734Copies of Mutant KRAS/pg of cfDNA、健常者で 0.00664 \pm 0.00753Copies of Mutant KRAS/pg of cfDNA であり、濃縮後の ctDNA (KRAS G12) のコピー数は、膵臓癌患者と健常者間に有意な差は認めなかった。

の結果より、PI polyamide-biotin を用いた ctDNA の濃縮による mutant KRAS の検出は早期膵臓がんの発見に寄与しない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kitagawa Yoshiyasu, Ishigaki Asuka, Nishii Rino, Sugita Osamu, Suzuki Takuto	4. 巻 12
2. 論文標題 Randomized study of two endo-knives for the traction-assisted endoscopic submucosal dissection of early esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08348-0	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 Kitagawa Yoshiyasu, Suzuki Takuto, Nakamura Kentaro, Nankinzan Rino, Yamaguchi Taketo	4. 巻 52
2. 論文標題 Endoscopic submucosal dissection by transnasal endoscope for esophageal cancer with pharyngo-esophageal anastomotic stricture after total pharyngo-laryngo-esophagectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endoscopy	6. 最初と最後の頁 E445 ~ E447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-1158-8948	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 Kitagawa Yoshiyasu, Suzuki Takuto, Nankinzan Rino, Ishigaki Asuka, Furukawa Kiyoto, Sugita Osamu, Hara Taro, Yamaguchi Taketo	4. 巻 32
2. 論文標題 Comparison of endoscopic visibility and miss rate for early gastric cancers after Helicobacter pylori eradication with white light imaging versus linked color imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestive Endoscopy	6. 最初と最後の頁 769 ~ 777
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/den.13585	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 Suzuki T, Kitagawa Y, Nankinzan R, Yamaguchi T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Usefulness of cold polypectomy under linked color imaging.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endosc Int Open.	6. 最初と最後の頁 E87-E91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-1035-9411.	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 Kitagawa Y, Suzuki T, Nankinzan R, Ishigaki A, Furukawa K, Sugita O, Hara T, Yamaguchi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Comparison of endoscopic visibility and miss rate for early gastric cancers after Helicobacter pylori eradication with white-light imaging versus linked color imaging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dig Endosc.	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) 10.1111/den.13585.	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 Kitagawa Y, Okumura K, Watanabe T, Tsukamoto K, Kitano S, Nankinzan R, Suzuki T, Hara T, Soda H, Denda T, Yamaguchi T, Nagase H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Enrichment technique to allow early detection and monitor emergence of KRAS mutation in response to treatment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47700-9.	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 Nankinzan R, Suzuki T, Kitagawa Y, Yamaguchi T.	4. 巻 51
2. 論文標題 Endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal cancer overlying a submucosal tumor originating from the muscularis propria.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endoscopy.	6. 最初と最後の頁 E358-E359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-0919-4278.	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 北川善康, 西井理乃, 鈴木拓人
2. 発表標題 糸付きクリップ法を併用した食道 ESD における高周波ナイフの無作為化比較試験
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

1. 発表者名 北川善康, 古賀邦林, 石垣飛鳥, 杉田統, 鈴木拓人
2. 発表標題 H. pylori感染胃炎の内視鏡的診断におけるTexture and Color Enhancement Imagingの有用性
3. 学会等名 JDDW2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y.Kitagawa
2. 発表標題 RANDOMIZED STUDY OF TWO ENDO-KNIVES FOR THE TRACTION-ASSISTED ENDOSCOPIC SUBMUCOSAL DISSECTION OF ESOPHAGEAL CANCER
3. 学会等名 DDW2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北川善康
2. 発表標題 Helicobacter pylori /除菌後胃癌に対するBLIおよびChromo-LCI拡大内視鏡の有用性
3. 学会等名 第99回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川善康
2. 発表標題 H. pylori除菌後胃癌の範囲診断におけるNBI・BLI併用拡大内視鏡の有用性～現感染例との比較～
3. 学会等名 JDDW2020年
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川善康, 鈴木拓人, 山口武人
2. 発表標題 H. pylori除菌後胃癌の発見率向上に向けたlinked color imagingの有用性
3. 学会等名 第97日本消化内視鏡学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川善康, 南金山理乃, 鈴木拓人, 山口武人
2. 発表標題 H. pylori 除菌後胃癌の発見率向上に向けたlinked color imagingの有用性
3. 学会等名 第108回日本消化器内視鏡学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川善康, 石垣飛鳥, 古川潔人, 南金山理乃, 杉田統, 鈴木拓人, 山口武人
2. 発表標題 H. pylori 除菌後胃癌の見落とし率低下に向けたlinked color imagingの有用性
3. 学会等名 Japan Digestive Disease Week 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川善康, 鈴木拓人, 南金山理乃, 山口武人
2. 発表標題 H. pylori 除菌後胃癌の見落とし率低減に向けたlinked color imagingの有用性
3. 学会等名 第109回日本消化器内視鏡学会関東支部例会
4. 発表年 2019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
---------	---------