

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09020

研究課題名(和文)尿中循環DNAを用いて化学療法の効果予測や根治術後の再発リスク判定が行えるか？

研究課題名(英文)The possibility of urinary circulating tumor DNA predicting the effect of chemotherapy and recurrence risk after curative resection in colorectal cancer

研究代表者

太田 竜(Ohta, Ryo)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30839824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌症例で血漿、尿ctDNAの濃度をStage別に検証した。またKRAS変異をdigital PCRで解析し、血漿、尿ctDNAの感度、Stage別の差異を検討した。結果は有意に尿でctDNAが低濃度であった。血漿ctDNA濃度はStage依存的に上昇したが、尿ctDNAでは一定の傾向は認められなかった。digital PCRでは血漿と尿でKRAS変異同定感度は同等だった。Stage I-IIIでは有意に尿ctDNA感度が良好だった。血漿と尿ctDNAの統合解析により同定感度は有意に上昇した。またKRAS変異が同定されない症例の10.3%で血漿または尿ctDNAでKRAS変異が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、尿ctDNAは非侵襲的に血漿ctDNAと同等の解析が可能であり、血漿ctDNAとの統合解析にてより感度が上昇し、腫瘍組織では同定不能なheterogeneityを検出することが可能であることを証明した重要な研究であることが確認された。腫瘍組織の一部から検出した遺伝子変異の有無により分子標的治療薬導入の可否を決定する場合には正確な解析が行われていない可能性があるため、尿ctDNAを用いることにより効果が見込めない化学療法を回避することが可能となるためその学術的・社会的意義は大きいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Plasma and urinary ctDNA concentrations were verified by stage in colorectal cancer cases. Furthermore, KRAS mutations were analyzed by digital PCR, and the sensitivity of plasma and urinary ctDNA, and differences by stage were examined. The results showed significantly lower concentrations of ctDNA in urine. Plasma ctDNA concentrations increased in a stage-dependent manner, however, urine ctDNA concentrations did not show a consistent trend. Digital PCR had similar sensitivities to identify KRAS mutations in plasma and urine. Urinary ctDNA sensitivity was significantly better in Stage I-III. Integrated analysis of plasma and urine ctDNA significantly increased identification sensitivity. KRAS mutations were also identified in plasma or urine ctDNA in 10.3% of cases in which KRAS mutations were not identified.

研究分野：大腸癌遺伝子変異解析

キーワード：尿循環腫瘍DNA 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リキッドバイオプシーはがん患者の体液から採取したバイオマーカーの総称で、主に血液中の循環腫瘍 DNA (以下、ctDNA) から遺伝情報を獲得する方法である。腫瘍組織採取は不要であり、低侵襲かつリアルタイムで腫瘍の早期発見や予後予測のみならず、化学療法の効果判定や治療効果のモニタリングとして有用である。リキッドバイオプシーは一般に血液が頻用されているが、最近血液以外の体液における解析がすすめられている。尿を用いたリキッドバイオプシーは泌尿器腫瘍から導入され、近年膵癌や肺癌等にも応用され始めたが、大腸癌においては少数例の報告が散見されるのみである。

2. 研究の目的

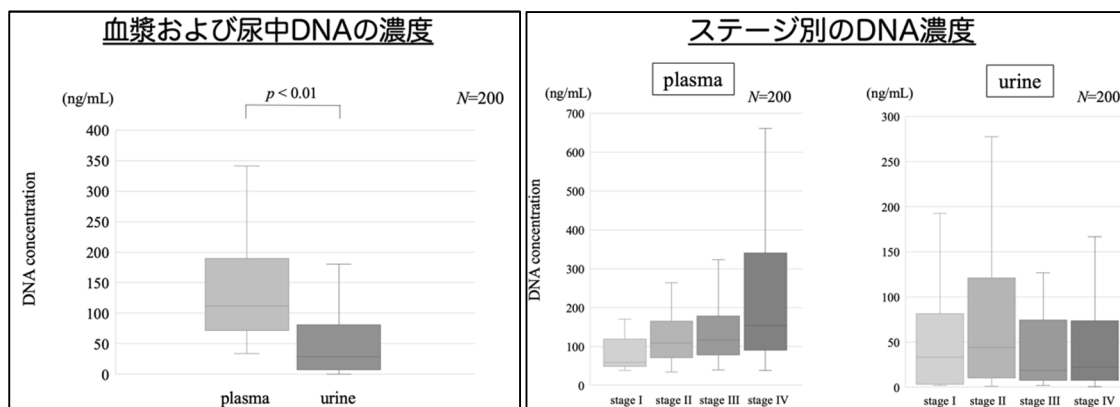
本研究では、非侵襲的な尿中 ctDNA を用いた大腸癌における KRAS 遺伝子変異の解析を行いその有用性について検討した。

3. 研究の方法

2018年8月から2020年7月までの期間に当科で原発巣または転移巣切除を行った大腸癌において、血漿、尿、腫瘍組織それぞれから DNA 抽出が可能であった症例を対象とした。血漿 ctDNA および尿中 ctDNA の濃度差を Stage 別に検証した。また抽出した各 DNA の KRAS 遺伝子変異を digital PCR を用いて解析し、腫瘍組織 KRAS 遺伝子変異例に対する血漿 ctDNA および尿中 ctDNA の感度や特異度とともに Stage 別の差異について比較検討した。

4. 研究成果

(1) 対象症例は 200 例存在し、男性 119 例、女性 81 例、年齢中央値は 71 歳であった。病期は Stage I: 28 例、Stage II: 52 例、Stage III: 73 例、Stage IV: 47 例であった。結果は、血漿と比較して有意に尿で ctDNA が低濃度であった (112 ng/ml vs. 29 ng/ml, $P < 0.01$)。Stage 別に ctDNA 濃度を比較すると、血漿 ctDNA 濃度は Stage 依存的に上昇したが、尿中 ctDNA では一定の傾向は認められなかった。



(2) exon-2 領域の KRAS 遺伝子変異 primer を用いて digital PCR を行ったところ、腫瘍組織 DNA の 84 例 (42.0%) に KRAS 遺伝子変異が同定された。腫瘍組織 KRAS 遺伝子変異例において、血漿 ctDNA の KRAS 遺伝子変異同定感度、特異度、正確度はそれぞれ 29.8%、94.8%、67.5%、尿中 ctDNA は 33.3%、93.1%、68.0%であった。Stage 別に検討すると、Stage I-III での感度は、血漿 ctDNA 21.3%、尿中 ctDNA 37.7%であり、有意に尿中 ctDNA の感度が良好であった ($P < 0.05$)。一方、Stage IV では血漿 ctDNA 52.2%、尿中 ctDNA 21.7%と血漿 ctDNA で感度が良好な傾向を示したが有意差は認められなかった。

組織と血漿でのKRAS遺伝子変異一致率			組織と尿でのKRAS遺伝子変異一致率		
N=200	Tissue KRAS mutant	Tissue KRAS wild	N=200	Tissue KRAS mutant	Tissue KRAS wild
ctDNA KRAS mutant (%)	25 (29.8)	6 (5.2)	trtDNA KRAS mutant (%)	28 (33.3)	8 (6.9)
ctDNA KRAS wild (%)	59 (70.2)	110 (94.8)	trtDNA KRAS wild (%)	56 (66.7)	108 (93.1)

進行癌と非進行癌でのKRAS遺伝子変異一致率

	Stage I-III			Stage IV		
	ctDNA	trtDNA	P value	ctDNA	trtDNA	P value
Sensitivity (%)	21.3	37.7	0.047	52.2	21.7	0.070
Specificity (%)	95.7	91.3	0.117	91.7	100	0.078
Accuracy (%)	66.0	69.9	0.214	70.2	69.9	0.133

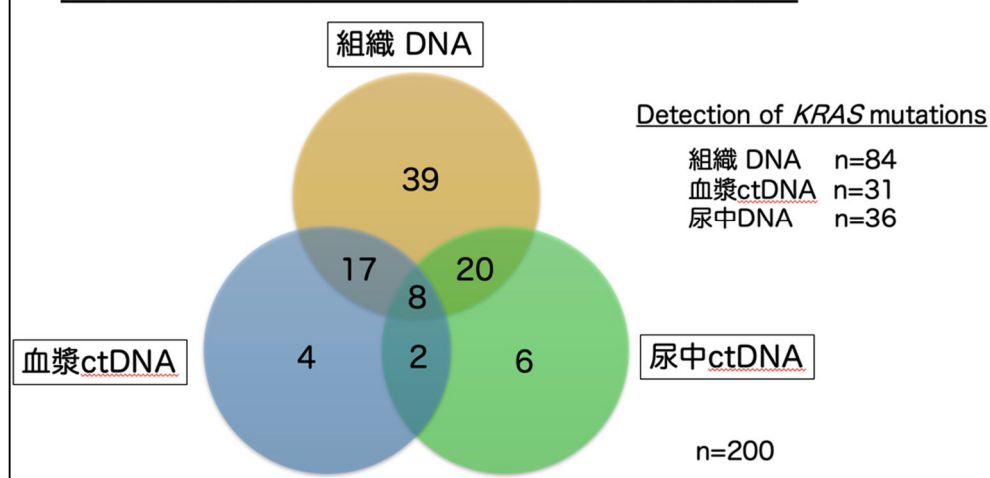
(3) 血漿 ctDNA と尿中 ctDNA を統合した解析によると、KRAS 遺伝子変異同定感度は 53.6% となり有意に上昇した。また腫瘍組織 DNA から KRAS 遺伝子変異が同定されなかった 116 例中、12 例 (10.3%) で血漿または尿中 ctDNA で KRAS 遺伝子変異が同定され、それぞれ血漿 ctDNA のみ 4 例、尿中 ctDNA のみ 6 例、血漿および尿中 ctDNA 2 例であった。

本研究より新規有用な 3 つの知見を得ることができた。1) 大腸癌における KRAS 遺伝子解析において、尿中 ctDNA は血漿 ctDNA と同等の解析が可能であった。尿中 ctDNA は血漿 ctDNA より低濃度であったが、その感度は良好であった。尿を用いたリキッドバイオプシーは血液採取を伴う血漿を用いるよりもさらに低侵襲であり、血液採取が困難な高齢者や貧血患者においても有用な解析法であると考えられた。2) 尿中 ctDNA と血漿 ctDNA の統合解析により KRAS 遺伝子変異同定感度が上昇した。尿中 ctDNA 解析を併施することにより、従来問題となっていた血漿 ctDNA 検出感度の低下を改善する手法と考えられた。3) 尿中 ctDNA は血漿 ctDNA とともに腫瘍組織で同定不能な遺伝子変異の検出に有用であった。リキッドバイオプシーは腫瘍組織から同定できない heterogeneity をリアルタイムに反復して取得することが可能であり、さらには本研究において尿中 ctDNA は血漿 ctDNA でも同定できない遺伝子変異が検出可能であり有用と考えられた。

進行癌と非進行癌でのKRAS遺伝子変異 統合解析

	ctDNA	trtDNA	P value	Combination	P value
Stage I-III	21.3%	37.7%	0.047	50.8%	0.003
Stage IV	52.2%	21.7%	0.07	60.9%	0.047
Total	29.8%	33.3%	0.74	53.6%	0.002

組織、血漿、尿でのKRAS遺伝子変異検出



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohta Ryo, Yamada Takeshi, Sonoda Hiromichi, Matsuda Akihisa, Shinji Seiichi, Takahashi Goro, Iwai Takuma, Takeda Kohki, Ueda Koji, Kuriyama Sho, Miyasaka Toshimitsu, Yokoyama Yasuyuki, Hara Keisuke, Yoshida Hiroshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Detection of KRAS mutations in circulating tumour DNA from plasma and urine of patients with colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 3151 ~ 3156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2021.07.017	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 太田 竜, 山田 岳史, 園田 寛道, 松田 明久, 進士 誠一, 代永 和秀, 岩井 拓磨, 武田 幸樹, 上田 康二, 栗山 翔, 宮坂 俊光, 吉田 寛
2. 発表標題 尿中循環腫瘍 DNAを用いた大腸癌KRAS遺伝子解析の有用性
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田竜
2. 発表標題 Detection of KRAS mutation in circulating cell-free DNA derived from urine in colorectal cancer
3. 学会等名 2020ESMO-GI (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田竜
2. 発表標題 大腸癌における尿中循環腫瘍DNAによるKRAS遺伝子発現の解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田 竜
2. 発表標題 尿中cell-free DNAを用いた大腸癌におけるKRAS遺伝子変異解析
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会総会
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)	

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