

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09047

研究課題名(和文) 膵・胆道癌における染色体不安定性を標的とした革新的診断・免疫治療法の開発

研究課題名(英文) Early detection and precision medicine for hepatobiliary cancer targeting chromosomal instability

研究代表者

林 洋毅 (Hayashi, Hiroki)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：30422124

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・胆道癌に対して早期診断および層別医療を可能にするバイオマーカーとして染色体不安定性に着目して、多検体解析可能なサロゲートマーカーであるテロメア癒合DNAをデジタルPCRプラットフォームで定性的、定量的に検出するプロトコルをほぼ確立した。サブテロメア領域は反復配列が多く再現性のある結果を得るためのprimer/probeの設計に難渋したが、膵癌でchromothripsisの後発部位である18番染色体に生じるテロメア癒合DNAをデジタルPCRを用いて検出することができた。今後は得られたプロトコルを用いて多検体解析を行い、臨床病理学的特徴との関連性について検討を加える予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、胆道癌に対して免疫チェックポイント阻害剤であるデュルバルマブが保険適応となり、胆管癌に対しても免疫チェックポイント阻害剤の有効性を予測するバイオマーカーの開発が急務である。本研究によって得られた染色体不安定性の定性的・定量的評価が免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測となれば、胆道癌における化学療法の層別化に大きな福音となりうる。免疫チェックポイント阻害剤は高額でもあり、治療効果を予測した上で症例を選択すれば、医療経済的な側面でも意義のあるものになりうる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on chromosomal instability as a biomarker that enables early diagnosis and stratified treatment for pancreatic and biliary tract cancer, qualitative and quantitative analysis of telomere fusion DNA, a surrogate marker that can be analyzed in multiple samples, using a digital PCR platform were performed. We have almost established a protocol applicable for high-throughput analysis. At the beginning of this project, it was difficult to design a optimal primer/probe to obtain reproducible results because the subtelomeric region has many repetitive sequences. In the future, we plan to conduct multi-specimen analysis using the obtained protocol and evaluate the relationship with clinicopathological features.

研究分野：膵・胆道癌の集学的治療

キーワード：膵癌 胆管癌 胆嚢癌 バイオマーカー テロメア

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌・胆道癌は依然として難治である。根治が望める唯一の治療は遺残のない切除であるため、手術治療を主軸とした集学的治療の改良が急務である。具体的なアプローチ法としては、切除可能な早期に診断し、遺残のない切除に加えて有効性の高い key drug を用いて術前・術後補助療法を行う、切除不能例に対して有効性の高い key drug 用いた化学療法を行い、良好な病勢制御を得た後にコンバージョン手術を企図する、の2点である。これらを具現化するためには、早期診断マーカーおよび薬剤感受性マーカーの開発が必須であり、その社会的要請度は極めて高い。早期診断マーカーに基づいた化学療法の適応(術前治療として行うか? コンバージョン手術を企図として行うか?) 薬剤感受性マーカーに基づいたレジメン選択が可能になれば、“膵・胆道癌の集学的プレジジョン医療”の臨床実装が可能になる。

近年の大規模な全ゲノム・エクソームシーケンスの解析により、膵・胆道癌がなぜ難治なのか? という問いに対する答えが垣間見えるようになった。膵癌は big 4 とよばれる KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4 に高頻度に遺伝子異常を認めるもの、それぞれの遺伝子およびその異常は undruggable、つまり生化学的構造などの理由による分子標的治療の候補になりにくい、という課題が挙げられる。胆管癌については、肝内胆管癌、胆嚢癌、肝外胆管癌のそれぞれが異なる遺伝子変異プロファイルを有し、肝内胆管癌については IDH1 遺伝子や FGFR 融合遺伝子が分子標的治療候補となりうるものの、実際の遺伝子異常が生じる頻度は稀であり、さらに膵癌のような高頻度に生じる遺伝子異常がないことから、標的を絞りにくい、という課題がある。これらの課題を克服するべく、癌種特異的な遺伝子異常を標的とするこれまでの診断・治療のアプローチとは異なる、本研究では悪性形質転換を引き起こした、いわゆる“癌化”した細胞特有に生じるテロメア異常に着目した。

## 2. 研究の目的

研究の目的は以下の2点である。

「染色体不安定性という現象を簡便な手法で検出するサロゲートマーカーを開発する」

「膵・胆道癌において染色体不安定性と病期診断、薬剤感受性との関連を明らかにする」

独創的な点は、染色体不安定性のサロゲートマーカーとしてテロメア癒合 DNA に着目し、コンパニオン診断薬としての可能性を検証することである。さらに、染色体不安定がもたらす同時多発的に生じる多数の遺伝子変異(hypermuation)と腫瘍免疫との関連に着目し、免疫チェックポイント阻害剤の感受性を検証し、薬剤感受性マーカーとしての有用性を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1)

NCBI のゲノムデータベースから各染色体領域のサブテロメア領域の配列をサーチし、テロメア癒合 DNA 検出のための primer/probe の組み合わせを設計する

(2)

設計した primer/probe とデジタル PCR プラットフォームを用いてテロメア癒合 DNA を定性的、定量的に検出する。

## 4. 研究成果

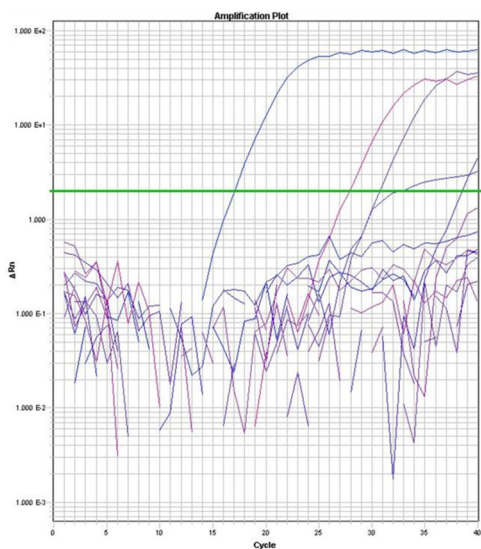
primer と probe の条件検討を行ってきたが、サブテロメア領域には反復配列が多く、再現性を持って特異的な増幅を得るための条件検討に時間を要した。結果として、染色体末端を1ペアごとと解析を行う方針とし、既報(Notta F, 2016)を参照に膵癌で chromothripsis の好発部位とされる18番染色体に標的を絞って条件検討を重ね、18番染色体のサブテロメア領域に特異性の高い primer 配列を決定した。さらにテロメア反復配列 probe とし、TTAGGG 以外に複数の配列を設計し、マルチプレックス反応でテロメア癒合 DNA を検出できるようにした。

まず、新規の primer/probe を用いて既報(Hata T, 2018)にしたがってリアルタイム PCR (qPCR) で増幅曲線が得られるか否か検討を加えた。PCR のテンプレートには膵癌細胞株(8種類)から抽出した DNA10ng ならびに正常膵組織(6種類)から抽出した DNA10ng を用いた。結果として、膵癌細胞株 8 株中 3 株で明瞭な増幅曲線が得られた。一方正常膵組織 6 例からはいずれも増幅曲線は得られなかった(図1)。

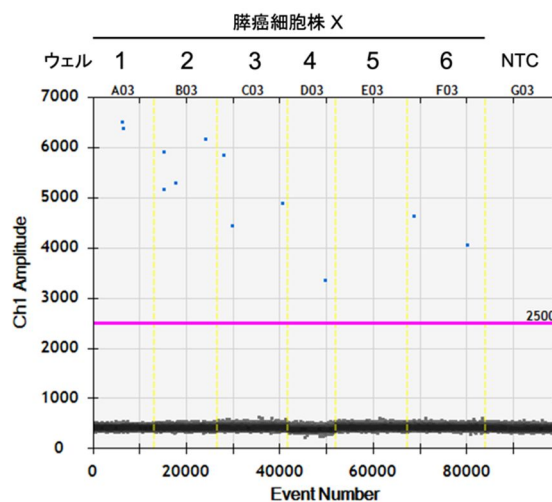
次に、リアルタイム PCR で増幅曲線が得られた膵癌細胞株を用いて、テンプレートを 0.5ng/well に希釈した上でデジタル PCR を 6 ウェル分を行った。陽性ドロップレット数には若干の際があるが、6 ウェル中 5 ウェルでテロメア癒合 DNA を検出できた(図2)。

今後は陽性ドロップレット数、コピー数、陽性ウェル数をスコア化して、多検体を用いてスコ

アを比較検討することで、両悪性の鑑別に有用なカットオフ値を設定していく予定である。さらに、設定したカットオフ値を用いて病期診断との関連性について検討を加えていく予定である。



(図1) 18番染色体のサブテロメア領域を標的としたテロメア癒合DNAの増幅曲線。増幅が得られたサンプルは全て膀胱細胞株であった。



(図2) 膀胱細胞株Xから抽出したDNAをテンプレートとして18番染色体のテロメア癒合DNAデジタルPCRを用いて6ウェル分増幅させた。NTC: no template control.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	畠 達夫  (Hata Tatsuo)  (30806237)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師   (11301)	
研究分担者	青木 修一  (Aoki Shuichi)  (30844451)	東北大学・大学病院・助教   (11301)	

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