

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17614

研究課題名（和文）吸水性スポンジを用いたctDNAモニタリングによるGISTの治療耐性診断法の開発

研究課題名（英文）Diagnostic Method for Treatment Resistance of GIST by ctDNA Monitoring Using an PVA Sponge

研究代表者

山下 公太郎（Yamashita, Kotaro）

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20747159

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）：昨年度は吸水性PVAスポンジ法によるPCRのfeasibility studyを実施した。吸水性PVAスポンジ法を用いたPCRの条件設定を検討し、より安定的で定量性の高いカラム法を開発した。また、実臨床にて多量のサンプルを対象に効率よく測定を実施するための手法としてダイレクト法を開発した。今年度はさらに、健常人やGIST患者、がん患者の血液サンプルを用いて、既存のcfDNA測定キットと比較してPVAスポンジ法（カラム法）によるcfDNA回収効率の優位性を示すとともに、いくつかのサイズのサンプルcfDNAを用いてサイズによらずPVAスポンジ法によりcfDNAの回収測定が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究開発により、簡便な方法で血液中のcfDNAやctDNAが回収、測定、解析可能となれば、今回対象としたGISTのみならず他の癌腫を対象とした癌の存在診断や再発診断に有用である可能性が高く、多くの国民やがん患者にとってその学術的意義や社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Last year, we conducted a feasibility study of real-time PCR using the PVA sponge method. We examined the condition setting of real-time PCR using the PVA sponge method, and developed a more stable and quantitative column method. In addition, we developed a direct method for efficient measurement of a large number of samples in a real clinical setting.

In this year, we further demonstrated the superiority of the PVA sponge method (column method) over existing cfDNA assay kits using blood samples from healthy subjects, GIST patients, and cancer patients, and also demonstrated that the PVA sponge method is more efficient in collecting cfDNA than the existing cfDNA assay kits, and that the PVA sponge method can be used with several sizes of cfDNA samples regardless of the size of the samples. The method was shown to be capable of recovering and measuring cfDNA.

研究分野：上部消化管

キーワード：ctDNA GIST

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、組織の壊死やアポトーシスにより血液中へと放出される塩基長 70~200bp 前後の DNA 断片である cell free DNA(cfDNA)が注目を集めており、がん患者の血中 cfDNA には、がん細胞由来の circulating tumor DNA(ctDNA)が存在することが明らかにされている。血液サンプルを利用して ctDNA を解析することにより、腫瘍組織の増殖状況やがん細胞の遺伝子プロファイルを把握することができる可能性があり、リキッドバイオプシーとしてがんの早期診断や再発モニタリング等への応用が期待されている。

しかしながら、ctDNA モニタリングを日常臨床で標準化するには、患者間・実験者間のバイアス最小化、検体間バイアス補正のための品質管理・定量の必要性、遺伝子検査プロセスの簡略化、コントロールに対する相対定量ではなく絶対定量可能な手法の開発等が超えるべきハードルとして存在する。

我々は吸水性 PVA スポンジを用いることにより DNA 抽出精製の工程をスキップし簡便かつ迅速、安価にリアルタイム PCR 測定を行う手法を確立し、国内特許出願済みであり、本手法を用いた ctDNA モニタリングの実用化を目指した本研究を開始することとした。

本研究の対象疾患である消化管間質腫瘍(GIST)は原因遺伝子変異が同定されている疾患(c-kit 遺伝子や PDGFRA 遺伝子の突然変異)であり、さらに治療耐性獲得時には特定の部位に二次遺伝子変異が起こることが明らかにされている。また、二次遺伝子変異のタイプによって 2 次治療 3 次治療薬の治療効果に差があることが近年注目されている。Imatinib 治療中 GIST 患者において、Kit 遺伝子の exon13/14 あるいは 16/17/18 に起こる二次変異を血液検体から早期に検出することができれば、Imatinib 耐性の早期診断につながるばかりか、二次治療の至適薬剤選択にもつながるため、GIST 治療における本手法の開発は非常に意義深く、Precision Medicine の実現が期待される。

2. 研究の目的

本研究は PVA スポンジを用いた ctDNA モニタリングが GIST の Imatinib 耐性獲得の超早期発見に寄与するかを多数例で検証することを目的とする

3. 研究の方法

吸水性 PVA スポンジ法によるリアルタイム PCR の feasibility study

まずは吸水性 PVA スポンジ法を用いたリアルタイム PCR の条件設定をさらに検討する。健常人や GIST 患者、がん患者の血液サンプルを用いて血漿中 cfDNA, ctDNA の捕捉・定量の最適な手法を確立する。

GIST 患者における吸水性 PVA スポンジ法による ctDNA 変異スクリーニング

今回、当院にて Imatinib 治療中の GIST 患者の血液検体を 3 か月毎に回収し、本手法を用いて c-Kit 遺伝子 exon13/14, 16/17/18 の突然変異をスクリーニングする。当該症例の画像所見による治療効果やその他の臨床情報と比較検討し、本手法の有用性について評価する。2022 年 3 月までを目途に本研究にて一定の成果が得られれば、企業連携のうえ、体外診断キットとして製造販売承認、薬事承認申請を目指したい。

他のがん種への適応拡大

今回、発症に関連する 1 次変異、再発に関連する二次遺伝子変異のタイプや部位が同定されている GIST が本研究の対象として最適であると考えた。しかしながら同定された遺伝子変異をターゲットに本手法で ctDNA スクリーニングを行うことは他のがん種の再発早期診断手法としても有用である可能性が高い。我々はこれまでに、食道癌における遺伝子変異の網羅的解析により変異頻度の高い 53 個の遺伝子を抽出するとともに(Gastroenterology 2016)、血漿中 ctDNA におけるこれらの遺伝子変異とその変異頻度が食道癌の再発診断・再発予測に有用であることを少数例ながら明らかにしてきた(Oncotarget 2016)。こういった他がんへの適応拡大も視野にまずは GIST にて本手法の有用性を検証したい。

4. 研究成果

今回検討した PVA スポンジ法（従来法、カラム法、ダイレクト法）の概略を図 1 に示す。いずれの方法も PVA スポンジにサンプルを導入し検体を抽出するが、従来法ではスポンジから用手的に押し絞る、カラム法では遠心分離を行う、ダイレクト法ではスポンジをそのまま検体として PCR を実施するといった相違点がある。

PVA スポンジ法（従来法）における DNA 精製効率を既存の測定法（QIAanmp DNA Blood Mini Kit）と比較検討した。同量のサンプル DNA を用いた解析にて、既存の測定法に比較して PVA スポンジ法では約 3 倍の DNA が検出され、DNA 検出効率における PVA スポンジ法の優位性が示された（図 2）。また、PVA スポンジそのものによる DNA 検出阻害がないことを確認した（図 3 上段）。

従来法では用手的にスポンジを押し絞り検体内に DNA を抽出する必要があり、手間を要するとともに工程の不安定さが問題と考えられた。そこで、PVA スポンジに添加したサンプルをカラムを用いて遠心分離し検体を抽出するカラム法を考案した。図 3（左下）に従来法とカラム法との DNA 検出における安定性の比較を示す。カラム法では従来法に比べて各検体間のばらつきが少なく、より安定的な方法であると考えられた。しかしながら多量のサンプルを効率よく測定することが求められる臨床応用には遠心分離等の作業工程をさらに短縮することが望ましいと考えられた。この課題を解決するために考案した、サンプルを添加した PVA スポンジをダイレクトに検体として用いるダイレクト法では、血清成分によると考えられるリアルタイム PCR での検出阻害を認めたが、阻害物質を含むサンプルからの増幅が可能である既存キットのリアルタイム PCR 試薬を併用することにより安定した結果を得ることができた（図 3 右下）。精製効率や測定の安定性の面からはカラム法が優れた方法であるが、作業の簡略化や多くのサンプルを処理するといった面からはダイレクト法が有用であると考えられた。

さらに、PVA スポンジ法により実際のがん患者の血液中より cfDNA の定量が可能であるかを検証するため、食道癌患者の血漿サンプルを用いて PVA スポンジ法にてリアルタイム PCR を用いて解析を行った結果を表 1 に示す。未だ小数例の検討ではあるが、ステージの進行した症例では cfDNA コピー数が多い傾向を認めた。

今後 GIST 患者を対象として臨床検体の解析を進め、本手法による ctDNA モニタリングの有効性について検討を進める予定である。

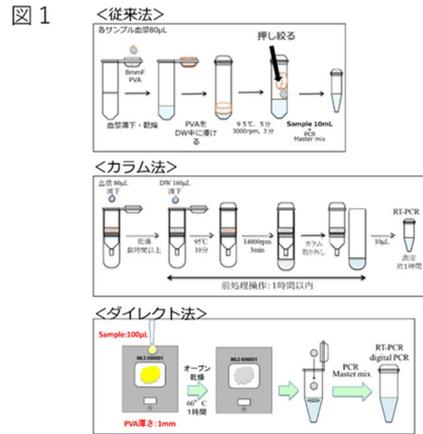


図 2 QIAanmp DNA Blood Mini Kitによる精製との比較
※サンプルとして、各DNA精製溶液を 5 μLずつPCRへ持ち込んだ

＜QIAanmp DNA Blood Mini Kit＞			
Sample	Ct値	Ct値平均	Ct値標準偏差
標準ヒト血清	36.5 37.1 37.5	37.1	0.5

↓

＜PVA スポンジ法＞			
Sample	Ct値	Ct値平均	Ct値標準偏差
標準ヒト血清	35.5 35.4 35.6	35.5	0.1

1.6サイクル差 = 2^{1.6}倍
↓
DNA量で考えると約3倍
PVA スポンジ法の方が検出量が多い

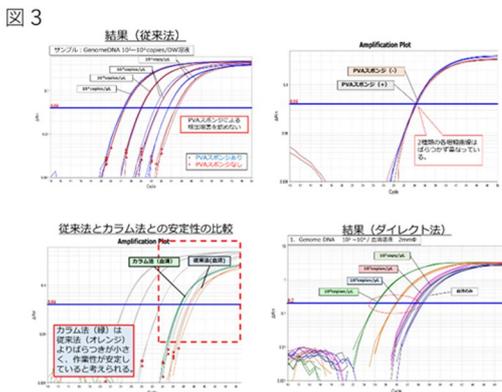


表1 食道癌患者におけるcfDNAコピー数

健常者	cT (検出限界の値が)	cN (リンパ節転移)	cM (遠隔転移) 1 (多発肝、皮膚)	ステージ	Ct値平均	コピー数平均 (血漿1μLあたり)
P1	3	4	1	4	30.6	153
P2	2	1	0	2b	35.7	4
P3	3	2	0	3b	35.3	5
P4	4	1	0	3c	34.6	8
P5	3	3	1 (多発LN、肺)	4	32.6	46
P6	3	4	1 (多発LN)	4	32.6	36
P7	3	3	1 (骨転移)	4	31.1	104
P8	3	1	1	4	33.7	16
P9	4b	2	0	3c	35.4	4

※3回実験を繰り返した結果の平均値を示す

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 競円佳
2. 発表標題 PVAスポンジを用いた血液中遊離DNA(cfDNA)のがん診断への応用技術開発
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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