

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08748

研究課題名（和文）Bile cell-free DNAを用いゲノム多様性を標的にした胆道癌新規治療

研究課題名（英文）Novel treatment of biliary tract cancer by targeting genomic diversity using Bile cell-free DNA

研究代表者

中川 圭（Nakagawa, Kei）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20542294

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）：胆管浸潤を伴う膵胆道癌において、外科的切除を受けた13例を収集した。切除標本からDNAを抽出し、全エクソームシーケンスを行なったところ、TP53, ABCA8, BRCA2, FGFR2, APC, SMAD4, NRASの病的変異を認めた。cf-DNAを抽出結果では、胆汁には血漿に比べ多くのcf-DNAが含まれ、より長いDNA fragmentを有することが明らかになった。胆汁cf-DNAは遺伝子解析に適した質と量を有しており、腫瘍由来の遺伝的変異を反映している。胆汁cf-DNAは、ゲノムのプロファイリングを検出するためのリキッドバイオプシーとして有用なツールと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌診断で入手可能なサンプルで、血液より感度高く遺伝子検索が可能であった。今後の予後予測因子や治療適応の可能性が広がった。サンプルの保管方法や処理について実績から提案が可能になった。今後汎用性のあるパネルシーケンスのためにターゲットを絞って検索する必要性が考えられた。カットオフや胆道癌の中での部位別の違いについて今後検証の課題を提案できた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to evaluate the quality of cf-DNA in bile as a liquid sample and to identify the possibility of obtaining genomic profiling for personalized therapy. Thirteen cases undergoing surgical resection in pancreatic biliary tract cancer with bile duct invasion were collected. DNA was extracted from the resected specimens and whole exome sequencing revealed pathological mutations in TP53, ABCA8, BRCA2, FGFR2, APC, SMAD4 and NRAS. cf-DNA was extracted from bile samples from 13 cases and plasma samples from 9 cases. The results showed that bile contained more cf-DNA and had longer DNA fragments than plasma. Furthermore, the most representative gene mutations, such as TP53, KRAS, NRAS, and SMAD4, could be detected in bile cf-DNA. In conclusion, bile cf-DNA has the quality and quantity suitable for genetic analysis and reflects tumor-derived genetic mutations. Bile cf-DNA was considered a useful tool as a liquid biopsy for detecting genomic profiling.

研究分野：肝胆膵癌の診断と集学的治療

キーワード：胆道癌 ゲノムプロファイリング 予後予測因子 プレシジョンメデジン

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム解析技術の進歩により、消化器癌の病態に関連する遺伝子変異が明らかとなり、遺伝子型に適合した個別化治療の導入が可能となった。胆道癌では、患者の約 40%に個別化医療の対象となる **actionable** なゲノム変異を有していると言われ、ゲノム変異の蓄積や不均一性は治療抵抗性の獲得に関与する。近年、**cell-free DNA (cf-DNA)**が、癌の病勢を示す新規バイオマーカーとして注目されており、さらに、ゲノムプロファイルを得るための重要なツールとしても有用である。しかし膵胆道癌における血漿 **cf-DNA** の有用性にはいくつかの問題がある。特に、血漿 **cf-DNA** の陽性率は、進行した症例であっても非常に低く、その陽性率は 10~40%と報告されている。また、血漿 **cf-DNA** の DNA 断片は、切除腫瘍組織から得られる DNA 断片と比較して小さいため、**SNV** だけでなく **amplification** や **fusion** などの遺伝子変異を検出することが困難な場合がある。

2. 研究の目的

本研究の目的および学術的独自性と創造性

本研究の目的は「胆汁内 **cfDNA** を用いた継時的な胆道癌ゲノム解析により、癌ゲノムの不均一性の獲得、クローン進化を追従することができ、それに即した分子標的薬や免疫治療を行うことで **sequential** な **genome targeting therapy** を提供すること」である。

3. 研究の方法

bile cfDNA は、**long fragment** の DNA 抽出が可能で、多種類のゲノム変異を検出できると報告されている。**Bile cfDNA** と切除検体から得られた DNA を比較することで、**bile cfDNA** が癌ゲノムの遺伝子情報を網羅的に反映しているかを検討する。これにより、**bile cfDNA** の **liquid biopsy** としての真の有用性が証明できる。当院は胆道癌特異的遺伝子変異を網羅した遺伝子パネル(**BTC panel**)を開発し、胆道癌前癌病変である胆管内乳頭腫瘍(**IPNB**)に対し、それを用いた **deep sequence** の結果をすでに報告(**Aoki Y. et al, J Pathology, 2020, Figure4**)しており、本研究でも同手法を用いた。

4. 研究成果

切除標本から DNA を抽出し、全エクソームシーケンスを行なったところ、**TP53, ABCA8, BRCA2, FGFR2, APC, SMAD4, NRAS** の病的変異を認めた。13 症例の胆汁サンプル及び 9 例の血漿サンプルより、**cf-DNA** を抽出した。その結果、胆汁には血漿に比べ多くの **cf-DNA** が含まれ、より長い **DNA fragment** を有することが明らかになった。さらに、最も代表的遺伝子変異である **TP53, KRAS, NRAS, SMAD4** などを、胆汁 **cf-DNA** から検出することが可能であった。以上より、胆汁 **cf-DNA** は遺伝子解析に適した質と量を有しており、腫瘍由来の遺伝的変異を反映している。胆汁 **cf-DNA** は、ゲノムのプロファイリングを検出

するためのリキッドバイオプシーとして有用なツールと考えられた。

今後も当科の膵胆道癌患者の胆汁及び血漿から **cf-DNA** の抽出を行う。現在、胆汁及び血漿 **cf-DNA** の全エクソーム解析を行っており、網羅的遺伝子解析の側面から胆汁 **cf-DNA** の有用性を示せる可能性がある。今後は、同一患者での胆汁 **cf-DNA** を継時的に採取し、**clonality** の変化を追跡することで、抗がん剤治療耐性の機序を明らかにすることを計画している。

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〕

胆汁cf-DNAは、DNA量及びfragment長の両方において、血漿cf-DNAよりも良好なDNAが検出できており、血漿cf-DNAよりもキッドバイオプシーとしての有用性が示唆された。
 膵胆道癌における胆汁cf-DNAの有用性を示す新規知見であり、現在論文投稿中である。

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	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