

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08803

研究課題名（和文）網羅的ctDNA変異解析モニタリングによる膵癌個別化集学的治療の開発

研究課題名（英文）Development of personalized multimodal therapy for pancreatic cancer through comprehensive ctDNA mutation analysis monitoring

研究代表者

廣野 誠子（Hirono, Seiko）

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60468288

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）：GEM・nab-PTX併用療法による術前化学療法後に外科的切除を行った膵癌症例28例を対象に、術前治療前、治療後、手術後に血液を採取し、ctDNA変異解析のモニタリングを行った結果、術前治療前と後にctDNAを検出した症例と検出しなかった症例で生存期間に差は認めなかったが、手術後にctDNAを検出した症例は有意に生存期間は不良であったことから、膵癌の予後を規定する因子として術後ctDNA変異の評価が最も有用であった。

術後3ヶ月毎のctDNA変異解析のモニタリングにより再発症例13例中8例で画像よりも早期にctDNA変異を検出し、ctDNA変異解析が術後再発の早期診断に有用であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、膵癌患者の長期生存には、術前化学療法後に外科的切除を施行し、さらに術後補助療法を行う集学的治療が必須で、上記で示したように膵癌治療中にctDNA変異解析をモニタリングすることで治療効果の評価が可能であることがわかった。今後さらなる症例数の蓄積と生存期間の観察期間の延長による解析が必要であるが、本研究の成果は、膵癌患者の長期生存に大いに貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：Blood samples were collected before and after preoperative chemotherapy and after surgery from 28 cases of pancreatic cancer who underwent surgical resection following GEM/nab-PTX combination therapy. Monitoring of ctDNA mutation analysis revealed no difference in survival between cases with and without detectable ctDNA before and after preoperative treatment. However, cases with detectable ctDNA after surgery had significantly poorer survival, indicating that the evaluation of postoperative ctDNA mutations was most useful as a prognostic factor for pancreatic cancer. Monitoring ctDNA mutation analysis every three months after surgery detected ctDNA mutations earlier than imaging in 8 out of 13 recurrent cases, demonstrating that ctDNA mutation analysis is useful for the early diagnosis of postoperative recurrence.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 ctDNA変異解析 化学療法

1．研究開始当初の背景

難治癌である膵癌患者の生存期間延長に向けた研究成果が徐々に明らかになってきた一方、化学療法に対して十分な治療効果が認められない膵癌や、外科的切除後補助化学療法を施行しても再発・転移が生じる膵癌症例も多い。すなわち、膵癌に対する化学療法の感受性と耐性メカニズムの解明に關与する分子マーカーの開発が急務である。膵癌は腫瘍不均一性をもつため、生検組織の遺伝子異常解析では薬剤に対する感受性を評価することはできず、また治療に対する反応性・耐性を評価するためには、治療中繰り返し遺伝子解析を行う必要があり、高侵襲な組織生検を繰り返すことは不可能である。近年、原発巣の腫瘍から血中に循環する腫瘍細胞の DNA (circulating cell-free tumor DNA; ctDNA)を用いた非侵襲的な遺伝子解析が注目され、癌の診断・治療予測への応用が期待されている。とくに、Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq)は、197 種類の遺伝子の癌特異的に変異を認める領域を同時にシーケンスし、ctDNA の変異を高効率に検出できる超高感度な ctDNA 定量法として開発された。

2．研究の目的

本研究は、膵癌症例を対象に、gemcitabine (GEM)・nab-paclitaxel (nab-PTX)併用療法による術前治療開始前、治療後、外科的切除後の血液を用いて、ctDNA 変異解析のモニタリングを行うことで、術前治療の効果予測を行うことを第一の目的とする。膵癌の外科的切除後3ヶ月毎の血液を用いて網羅的 ctDNA 変異解析をモニタリングすることで、術後再発を早期に診断することを第二の目的とする。

3．研究の方法

1) 膵癌患者からの血液と組織採取

術前治療として GEM・nab-PTX 併用療法を受ける膵癌患者症例を対象とし、術前治療開始前、治療後、外科的切除後1ヶ月目、以後術後3ヶ月毎にCTによる画像診断にて再発を認めるまで血液を採取する。

2)血液サンプルから cell-free DNA (cfDNA)抽出と膵癌組織から DNA 抽出

血液サンプルを 1800g で 5 分間遠心し、分離した血漿から AVENIO cfDNA Isolation Kit を用いて cfDNA を抽出し、Qubit Assay による cfDNA の定量と Agilent Bioanalyzer による cfDNA の quality の確認を行う。また、マイクロダイセクションした膵癌組織から QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA を抽出し、同様に DNA の定量と quality の確認を行う。

3)CAPP-Seq による ctDNA 変異頻度の定量化

ctDNA Library Prep Kit を用いて膵癌患者の cfDNA に adaptor を ligation し、PCR にて増幅した後、ctDNA Surveillance Panel (197 標的遺伝子)を用いて標的領域を hybridization し、DNA 断片を回収する(target enrichment)。回収した DNA 断片の配列を NextSeq Sequencer でシーケンスし、標的領域の一塩基多型、挿入欠失、コピー数多型、融合領域の 4 種類の ctDNA の変異頻度を定量化する。膵癌組織の DNA も、CAPP-Seq により網羅的 DNA 変異解析を行う。

4．研究成果

1) 膵癌に対する GEM・nab-PTX 併用療法による術前化学療法の安全性と有効性の検討

われわれは、多施設共同前向き第 Ⅲ 相試験(NAC-GA trial)により、切除可能な膵癌に対する術前治療として GEM・nab-PTX 併用療法が安全で有効であることを証明した(AGSurg 2023)。

2) 術前治療ならびに外科的切除の前後における ctDNA と生存期間の関係

GEM+nab-PTX 併用療法による術前化学療法後に外科的切除を行った膵癌症例 28 例を対象に、術前治療前、術前治療後、手術後に血液を採取し、ctDNA 変異解析のモニタリングを行った結果、術前治療前と術前治療後に ctDNA を検出した症例と検出しなかった症例で生存期間に差は認めなかった(図 1,2)が、手術後に ctDNA を検出した症例は検出しなかった症例よりも有意に生存期間は不良であった(図 3)。本結果から、膵癌患者の予後を規定する因子として術後 ctDNA 変異の評価が最も有用であることがわかった(*Ann Surg Oncol* 2022)。

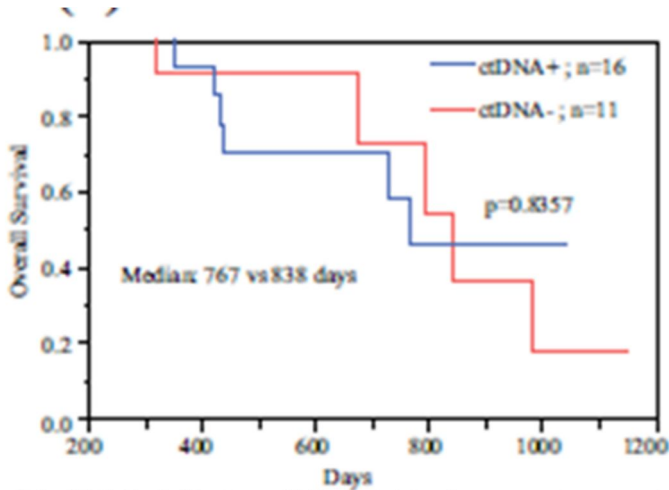


図1 術前治療前ctDNA検出の有無によるoverall survival

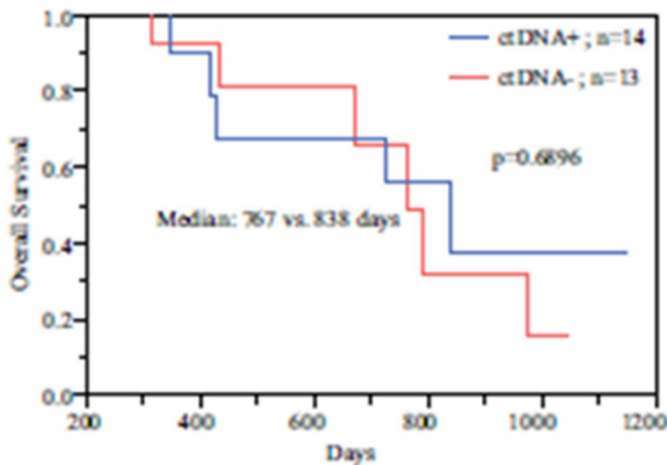


図2 術前治療後ctDNA検出の有無によるoverall survival

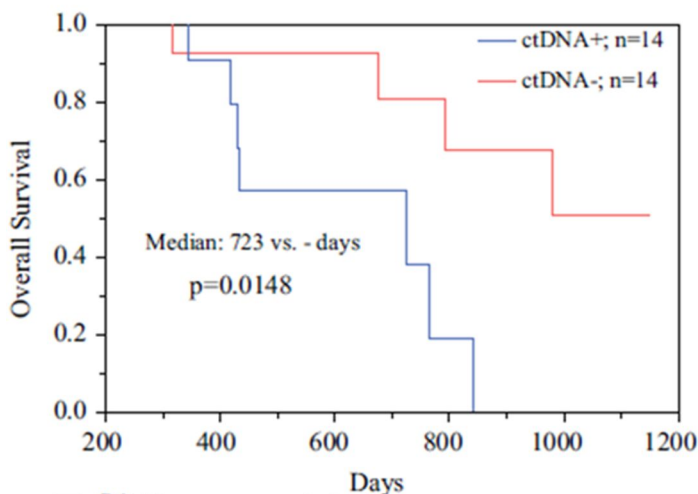


図3 術後ctDNAの有無によるoverall survival

3) 外科的切除を受けた膵癌患者に対する CAPP-Seq による術後 ctDNA 変異解析のモニタリング GEM・nab-PTX 併用療法による術前化学療法後、外科的切除術を受けた膵癌症例 28 例を対象に、術後 3 ヶ月毎に採血を行い、ctDNA 変異解析のモニタリングが術後再発の早期診断に有用であるかを現在検討中であるが、術後再発症例 13 例中 8 例において画像所見ならびに血清腫瘍マーカー CEA および CA19-9 の上昇よりも早期に ctDNA 変異を検出しており(図 4)、ctDNA 変異解析のモニタリングが術後再発の早期診断に有用である可能性が高い。最終登録患者の術後 2 年の観察期間を経た 2024 年 6 月に解析し、論文化する。

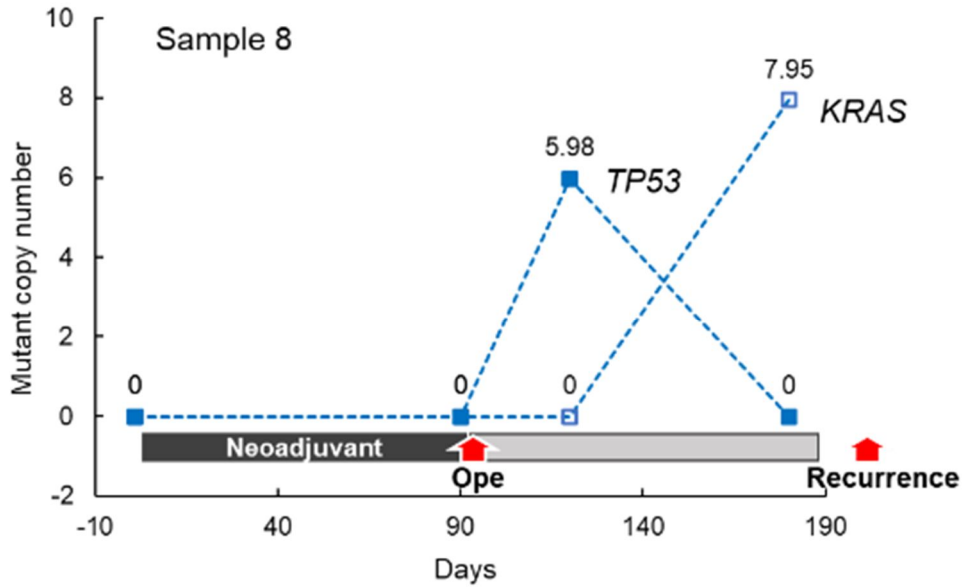


図4. 再発前にKRASおよびTP53 mutationの出現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okada KI, Kouda K, Kawai M, Hirono S, Miyazawa M, Kitahata Y, Kawanishi M, Natsume Y, Wan K, Yamaue H	4. 巻 235
2. 論文標題 Supervised Exercise Therapy and Adjuvant Chemotherapy for Pancreatic Cancer: A Prospective, Single-Arm, Phase II Open-Label, Nonrandomized, Historically Controlled Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Am Coll Surg	6. 最初と最後の頁 848-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/XCS.0000000000000408.	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 Kwon W, Heo JS, Han IW, Kang CM, Hwang HK, Kim SC, Park SJ, Yoon YS, Kim YH, Lim CS, Lee SY, Park T, Takami H, Watanabe N, Shimizu Y, Okuno M, Yamaue H, Kawai M, Hirono S, Nagakawa Y, Osakabe H, Sugiura T, Toyama H, Ohtsuka M, Unno M, Endo I, Kitago M, Jang JY.	4. 巻 30
2. 論文標題 Features of T1 pancreatic cancer and validation of the eighth edition AJCC staging system definition using a Korean-Japanese joint cohort and the SEER database	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci	6. 最初と最後の頁 1129-1140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.1316.	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 該当する
1. 著者名 Kawai M, Okada KI, Miyazawa M, Kitahata Y, Motobayashi H, Ueno M, Hayami S, Miyamoto A, Hirono S, Yamaue H	4. 巻 173
2. 論文標題 Positive drain fluid culture on postoperative day 1 predicts clinically relevant pancreatic fistula in early drain removal with higher drain fluid amylase after pancreaticoduodenectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 511-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2022.10.008.	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 Okada KI, Kawai M, Hirono S, Miyazawa M, Kitahata Y, Ueno M, Hayami S, Ikoma A, Sonomura T, Wan K, Shimokawa T, Yamaue H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Radiological Shape of the Tumor Predicts Progression and Survival in Resected Extrahepatic Cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Gastrointest Surg	6. 最初と最後の頁 1113-1121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11605-023-05614-y.	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 Okada KI, Kawai M, Hirono S, Hayami S, Miyazawa M, Kitahata Y, Ueno M, Kobayashi R, Miyamoto A, Wada Y, Asamura S, Yamaue H	4. 巻 42
2. 論文標題 Pancreatectomy with artery En-bloc resection for pancreatic neck/body cancer: A single-arm pilot study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 217-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15476	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 Yachida S, Totoki Y, Noe M, Nakatani Y, Horie M, Kawasaki K, Nakamura H, Saito-Adachi M, Suzuki M, Takai E, Hama N, Higuchi R, Hirono S, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive genomic profiling of neuroendocrine carcinomas of the gastrointestinal system.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discov	6. 最初と最後の頁 692-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-21-0669.	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 Hirono S, Kawai M, Okada KI, Miyazawa M, Kitahata Y, Kobayashi R, Hayata K, Ueno M, Yamaue H	4. 巻 47
2. 論文標題 Complete circumferential lymphadenectomy around the superior mesenteric artery with preservation of nerve plexus reduces locoregional recurrence after pancreatoduodenectomy for resectable pancreatic ductal adenocarcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 2586-2594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2021.06.005.	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 Kawai M, Hirono S, Okada KI, Miyazawa M, Kitahata Y, Kobayashi R, Ueno M, Hayami S, Yamaue H	4. 巻 28
2. 論文標題 Radiographic splenic artery involvement is a poor prognostic factor in upfront surgery for patients with resectable pancreatic body and tail cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 1521-1532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08922-8	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 Miyazawa M, Katsuda M, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Kitahata Y, Yamaue H	4. 巻 28
2. 論文標題 Advances in immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci	6. 最初と最後の頁 419-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.944	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 Kitahata Y, Kawai M, Hirono S, Okada KI, Miyazawa M, Motobayashi H, Ueno M, Hayami S, Miyamoto A, Yamaue H	4. 巻 29
2. 論文標題 Circulating tumor DNA as a potential prognostic marker in patients with borderline-resectable pancreatic cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy followed by pancreatectomy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 1596-1605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-10985-0	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 Yachida S, Totoki Y, Noe M, Nakatani Y, Horie M, Kawasaki K, Nakamura H, Saito-Adachi M, Suzuki M, Takai E, Hama N, Higuchi R, Hirono S, et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive Genomic Profiling of Neuroendocrine Carcinomas of the Gastrointestinal System.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discov	6. 最初と最後の頁 692-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-21-0669.	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 Fujita Y, Hirono S, Kawai M, Okada KI, Miyazawa M, Kitahata Y, Ueno M, Hayami S, Kobayashi R, Yanagisawa A, Yamaue H	4. 巻 48
2. 論文標題 Malignant potential and specific characteristics of pure main duct type intraductal papillary mucinous neoplasm.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur J Surg Oncol 2022	6. 最初と最後の頁 1054-1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejso.2021.11.137	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 廣野誠子, 山上裕機 .	4. 巻 43
2. 論文標題 Liquid biopsyが解き明かす膵癌における至適術式 .	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 67-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hirono S., and Yamaue H
2. 発表標題 Surgical indication and optimal postoperative surveillance for IPMN.
3. 学会等名 The Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association (A-PPBA) 2021 Bali Virtual Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirono S., Kawai M., Okada KI., Miyazawa M., Kitahata Y., Kobayashi R., Hayami S., Ueno M., and Yamaue H
2. 発表標題 Risk factors of recurrence after up-front pancreatoduodenectomy for resectable pancreatic ductal adenocarcinoma.
3. 学会等名 International Association of Surgeons, Gastroenterologists, and Oncologists (IASGO) 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirono S., and Yamaue H
2. 発表標題 Total mesopancreas excision with artery first approach for the treatment of pancreatic head cancer.
3. 学会等名 The 4th International Advanced Liver & Pancreas Surgery Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣野誠子, 川井 学, 岡田健一, 宮澤基樹, 北畑裕司, 上野昌樹, 速水晋也, 小林良平, 宮本 篤, 尾島敏康, 勝田将裕, 山上裕機.
2. 発表標題 再発危険因子からみた切除可能膵癌の治療戦略.
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣野誠子, 川井 学, 岡田健一, 宮澤基樹, 北畑裕司, 小林良平, 早田啓治, 速水晋也, 上野昌樹, 山上裕機.
2. 発表標題 Pancreatic division at neck reduces pancreatic fistula after laparoscopic distal pancreatectomy compared to at body.
3. 学会等名 Japanese Digestive Disease Week (JDDW) 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣野誠子, 川井 学, 岡田健一, 宮澤基樹, 北畑裕司, 上野昌樹, 速水晋也, 宮本 篤, 小林良平, 尾島敏康, 勝田将裕, 山上裕機
2. 発表標題 手術先行切除可能膵癌の再発危険因子からみた切除可能膵癌の治療戦略
3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣野誠子
2. 発表標題 Invasive IPMCに対する術後補助療法の有用性に関する後ろ向き観察研究
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会. 東京 (web参加), 2021. 9 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣野誠子, 川井 学, 岡田健一, 宮澤基樹, 北畑裕司, 小林良平, 速水晋也, 宮本 篤, 上野昌樹, 山上裕機.
2. 発表標題 手術先行切除可能膵頭癌の再発危険因子からみた切除可能膵癌の治療戦略.
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣野誠子, 川井 学, 岡田健一, 宮澤基樹, 北畑裕司, 小林良平, 速水晋也, 宮本 篤, 尾島敏康, 勝田将裕, 上野昌樹, 山上裕機
2. 発表標題 手術先行切除可能膵癌の再発危険因子からみた切除可能膵癌の治療戦略
3. 学会等名 第122回日本外科学会総会
4. 発表年 2022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	北畑 裕司 (Kitahata Yuji) (00535338)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	
研究分担者	山上 裕機 (Yamaue Hiroki) (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教員(特別顧問) (24701)	
研究分担者	川井 学 (Kawai Manabu) (40398459)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岡田 健一 (Okada Kenichi) (50407988)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	
研究分担者	宮澤 基樹 (Miyazawa Motoki) (90549734)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	

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