

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670613

研究課題名(和文)高感度の変異解析技術を用いた膵臓がんの早期診断法の開発

研究課題名(英文)High sensitive mutation analysis to identify early-stage pancreatic cancer

研究代表者

谷内田 真一 (Yachida, Shinichi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所がんゲノミクス研究分野・ユニット長

研究者番号：20359920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がんではKRASの突然変異は発がん過程の初期に生じるゲノム異常である。この分子遺伝学的な特徴を利用して、血漿中がん由来遊離DNAを研究試料に、Droplet digital PCR (ddPCR) を用いて、KRAS変異と野生型を同時に検出するKRAS 5-plex ddPCR assay系を構築した。259例の血漿(0.25 mL)を研究試料とし、KRAS変異の検出率と臨床・病理学的な因子との関連性について検討を行った。KRAS変異の検出率は臨床病期が進むにつれて上昇し、特に遠隔転移を有する患者においては約60%でKRAS変異を検出した。早期診断にはさらなる研究開発が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains one of the most lethal malignancies. It is known that >90% of PDAC harbor mutations in the KRAS gene as founder mutations. Circulating cell-free DNA (cfDNA) is a promising resource to detect and monitor molecular characteristics of tumors. In the present study, we determined the mutational status of KRAS in plasma cfDNA using multiplex picoliter-droplet digital PCR in 259 patients with PDAC. Two hundred and fifty-nine PDAC patients were involved in this study. Among 151 inoperable patients, mutant KRAS was detected in 63 of 107 (58.9%) PDAC patients with distant organ metastasis. The presence of ctDNA was significantly ($P < 0.0001$) associated with the presence of distant organ metastasis. Mutated KRAS genes could not be detected in the early stage of PDAC, so it would be premature to recommend the current protocol for screening to detect early-stage PDAC.

研究分野：がんゲノミクス

キーワード：膵臓がん

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは極めて予後不良のがん種で、診断後の5年生存率は依然としてわずかに5~7%である。根治可能な治療法は外科手術のみであるが、診断時にすでに遠隔転移を認めることが多く、手術適応となる患者は全体の20~30%程度である。

これまでに私は、膵臓がんの解剖検体を用いて、Multi-region sequencingを行い、突然変異の頻度を数理解析することで、膵臓がんの自然史を推測したところ、正常の細胞に最初の遺伝子異常(多くはKRAS変異)が起きてから転移能を獲得するまでには10~20年以上かかり、膵臓がんは決して早期発見できないがんではないことが分かってきた(Yachida S et al. *Nature* 2010; Yachida S et al. *Oncogene* 2013)。

近年の遺伝子の変異解析技術の革新的な進歩により、低頻度の遺伝子変異を高感度に検出可能になってきた。特にデジタルPCRは、血中・体液中の遊離DNA (cell-free DNA) を対象試料として、がん由来遊離DNAの変異を高感度に解析できる。

2. 研究の目的

膵臓がんにおいて、最も重要な研究戦略は、早期発見可能な検査法の開発である。膵臓がんを1~2cmの大きさで検出できれば、手術によりその生命予後は画期的に改善する。

本研究では、血液・体液を対象試料としてデジタルPCRを用いて、がん由来DNAを検出し低侵襲な分子診断法の確立を目的としている。

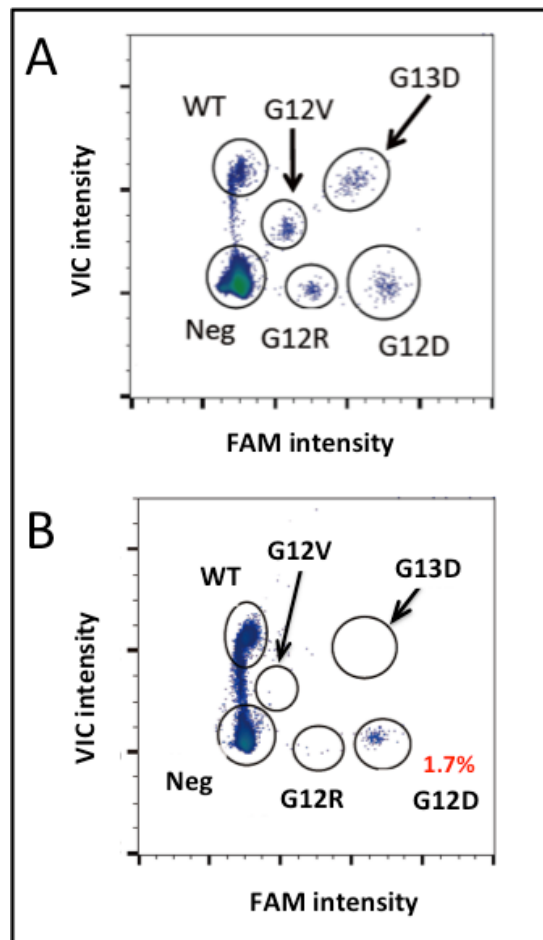
3. 研究の方法

膵臓がんでは、これまでに手術検体を用いた大規模なゲノム解析研究により、KRAS、CDKN2A、TP53、SMAD4/DPC4の4つの遺伝子異常が高頻度に認められることが明らかとなっている。そのうち、KRAS遺伝子の突然変異は発がん過程の最初に生じる遺伝子変異であり、膵臓がん患者の95%以上がKRAS変異を有している。さらに膵臓がんの場合、KRAS変異は4つのパターン(G12D、G12V、G12RとG13D)で約90%を占める。

これらの分子遺伝学的な特徴を利用して、血漿中のがん由来遊離DNA (cell-free DNA, cfDNA) をRainDance社のRainDrop droplet digital PCR (ddPCR)を用いて、これらの4つのKRAS変異とWild typeを同時に検出するKRAS 5-plex ddPCR assay系を構築した。右上図Aは4つの変異DNA(市販のもの)とWild type DNAを用いたAssayである。Bは実際の膵臓がん患者の血漿を用いた解析で、KRAS G12Dの変異を低頻度(1.7%)ながらも、明瞭なクラスターとして診断できる。

国立がん研究センター・中央病院のバイオバンクに保存されている259例の血漿を研究試料とした。血漿量としては0.25 mLを用いた。KRAS変異の検出率と臨床・病

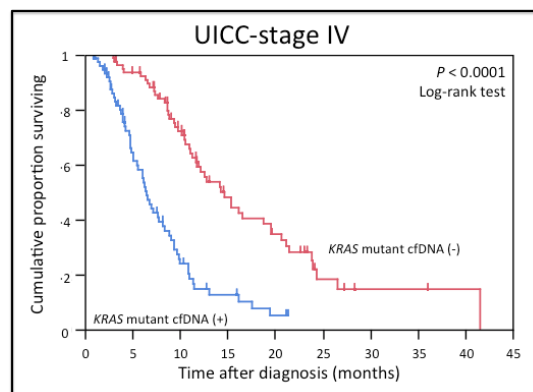
理学的な因子との関連性について検討を行った。



4. 研究成果

膵臓がん259症例のうち、83例(32%)でKRAS変異を認めた。KRAS変異のパターンは、COSMICデータベースと一致し、KRASコドン12の1.G12D、2.G12V、3.G12Rの順に高頻度であった。

KRAS変異の検出率は臨床病期が進むにつれて上昇し、UICC Stage IVでは43.5%(57/131例)であった。Stage IVの131名を対象に、Kaplan-Meier法で生存曲線を作成したところ、血漿中遊離DNA中にKRAS変異を認めた症例では有意に生存期間が短いことが示された(log-rank検定、 $P < 0.0001$)。



したがって、血漿中遊離DNA中のKRAS変

異は、Stage IV 患者における予後予測因子であることが示唆された。特に、遠隔転移を有する患者においては 58.9% (63/107 例) で KRAS 変異を検出した。

さらに全症例を対象に、単変量解析で生命予後と統計学的に有意な相関を示す、臨床・病理学的因子を検討した。1. UICC-stage、2. N 因子 (リンパ節転移)、3. M 因子 (遠隔転移) と 4. 血漿中の KRAS 遺伝子変異の有無が、単変量解析で統計学的に有意な予後因子であった。

これらを Cox proportional hazard model で多変量解析を行った。上述の 4 因子のうち、血漿中の KRAS 遺伝子変異の有無 ($P < 0.0001$) と UICC-stage ($P = 0.0153$) が独立した予後規定因子であった。

259 例のうち手術適応となった 108 例では、9 例 (8.3%) においてのみ KRAS 変異が検出された。これらの 9 例のうち 5 例は手術後 6 ヶ月以内に遠隔転移を示した。

デジタル PCR を用いた本解析系において、現時点では、血漿中遊離 DNA の KRAS 変異は遠隔転移と強い相関を示したが、早期診断にはさらなる研究開発が必要と考えられる。

具体的には、1. 血漿量の増量、2. デジタル PCR の検出感度の向上などの機器改良や、3. 対象とする研究試料の変更 (十二指腸液等) などの改善が必要と考察した。十二指腸液は、膵臓がん患者において研究開始時より収集しており、現在デジタル PCR で解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Takai E, Totoki Y, Nakamura H, Morizane C, Nara S, Hama N, Suzuki M, Furukawa E, Kato M, Hayashi H, Kohno T, Ueno H, Shimada K, Okusaka T, Nakagama H, Shibata T, Yachida S (corresponding author). Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep* 2015, 5: 18425.
査読あり
DOI: 10.1038/srep18425.
- ② Ohmoto A, Yachida S (corresponding author), Kubo E, Takai E, Suzuki M, Shimada K, Okusaka T, Morizane C. Clinicopathologic features and germline sequence variants in young pancreatic ductal adenocarcinoma patients (≤ 40 years of age). *Pancreas* 2015, Dec 18. [Epub ahead of print].
査読あり
DOI: 10.1097/MPA.0000000000000574
- ③ 谷内田真一、高井英里奈. 膵臓がんのゲノム異常とその臨床応用、日本膵臓学会

誌 (膵臓)、31: 10-16, 2016.

査読あり

- ④ 谷内田真一、膵臓がん治療の個別化による予後向上、癌の臨床、2016 (校正中)
査読なし
- ⑤ 谷内田真一、膵臓がんのバイオマーカーの現状、膵・胆道癌 FRONTIER、2016 (校正中)
査読なし

[学会発表] (計 3 件)

- ① 谷内田真一、膵臓がんのゲノム解析とその臨床応用、第 46 回日本膵臓学会大会 (招待講演)、2015 年 06 月 19 日~06 月 20 日、名古屋市
- ② 谷内田真一、ゲノム異常に基づく膵臓がん治療の個別化による予後向上の可能性、第 53 回日本癌治療学会学術集会 (招待講演)、2015 年 10 月 29 日~10 月 31 日、京都市
- ③ 谷内田真一、膵臓がん患者における遊離 DNA を用いた次世代シーケンサーによる治療標的の探索、第 25 回日本癌病態治療研究会 (招待講演)、2016 年 06 月 08 日~2016 年 06 月 09 日、千葉市

[図書] (計 1 件)

- ① Takai E, Yachida S. Liquid biopsy for early detection of pancreatic cancer. Editor: Yamaue H. Innovation of Diagnosis and Treatment for Pancreatic Cancer. Springer. 2016

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内田真一 (Yachida, Shinichi)

国立がん研究センター研究所・がんゲノミ

クス研究分野・ユニット長

研究者番号：20359920

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：