

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 8 年 5 月 2 0 日現在

機関番号： 1 3 9 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2014 ~ 2015

課題番号： 2 6 8 6 1 0 4 3

研究課題名 (和文) 高感度遺伝子解析法を用いた膵癌微小腹腔内遊離癌細胞迅速診断法の開発に関する研究

研究課題名 (英文) Detection of micrometastasis from abdominal lavage fluids in pancreatic cancer

研究代表者

大屋 久晴 (OHYA, Hisaharu)

名古屋大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号： 3 0 7 2 3 0 2 7

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : 高感度遺伝子変異検出技術により、膵癌微小腹腔内遊離癌細胞検出法開発を目指した。KRAS codon12の点変異をCast PCR法で検出することで遊離膵癌細胞の存在診断を行った。膵癌細胞株AsPC-1の希釈系列では、0.1%の変異DNAが再現性をもって検出可能であった。高速化されたDNA抽出Kitにより、DNA抽出は15分で可能であった。腹腔洗浄液におけるKRAS変異を膵癌51症例のうち18例 (35%) に認め、うち9例で細胞診陽性であった。CK19, CK20, CEA量は、腹腔洗浄細胞診と有意な相関を認めなかった。微小腹腔内遊離癌細胞陽性例では、無再発生存期間が短縮していた。

研究成果の概要 (英文) : We aimed at detecting micrometastasis from abdominal lavage fluids of patients with pancreatic cancer. Using a Competitive Allele -Specific TaqMan(R); PCR (Cast-PCR), point mutations at KRAS codon 12 were tested. A serial dilution experiment of the AsPC-1 cell showed that low concentration as 0.1% of mutant DNA was successfully detected. Accelerated DNA extraction kits enabled us to extract genome DNAs from lavage fluids. KRAS mutation was found in 18 (35%) of 51 patients with pancreatic cancer. Of them, nine patients were diagnosed as negative in lavage cytology. Expression levels of CK19, CK20 and CEA mRNA no significant correlations with the results of lavage cytology. Patients with micrometastasis in the abdominal lavage fluids tended to have a shorter disease-free survival.

研究分野： 消化器外科学

キーワード： 膵癌 腹膜播種 KRAS変異

1. 研究開始当初の背景

膵癌は5年生存率がいまだ5-10%と最も予後不良な固形癌であり、現代医療が直面している大きなテーマである。その不良な予後の要因として、治癒切除後にも高頻度に腹膜再発をきたすことが挙げられる。膵癌の予後を飛躍的に改善するためには、この腹膜播種を克服することが重要な課題のひとつとなる。

現行の腹膜転移の診断法は、播種結節の肉眼的診断もしくは、腹水細胞診による遊離癌細胞の検出によってなされている。そのため、腹腔内を遊離する癌細胞が微量な段階では検出されずに癌の進展度が過小評価されている可能性がある。癌の正確な進展度診断は、最適な個別化治療の提案に不可欠であるため、より鋭敏な腹膜転移診断法の開発が望まれる。

微量な腹腔内遊離癌細胞の検出方法として、これまでに免疫染色による方法やRT-PCR法の有用性が報告されているが、検査法の測定感度や特異度に問題があった。また、結果判定までの所要時間が大きな壁となり、実臨床への応用にはほど遠い状況である。

新規遺伝子学的手法による革新的な微量腹腔内遊離癌細胞検出法の開発と、その臨床応用に向けては3つの大きな克服すべき課題がある。

- (1) 微量な癌細胞を検出しうる高感度な手法；病理学的細胞診では検出できない微量な遊離癌細胞を検出するためには、高感度な測定方法が必須である。
- (2) 結果判定までの所要時間；開腹手術時において、肉眼的に同定できない微小腹膜転移を同定し得れば、手術適応の判断がより正確に術中判断できる。さらに、将来的に膵癌においても腹膜播種に対する腹腔内抗癌剤投与という治療方略が確立された場合、術中の微小腹膜転移の診断はその治療適応や効果判定に大きく寄与しうる。そのためには、結果判定までの所要時間の短縮が不可欠である。
- (3) 既存の方法を上回る診断精度；現在、実臨床における腹膜転移診断方法である腹腔洗浄細胞診やこれまでに報告されたRT-PCR法を上回る感度を示すのみならず、その結果が実際に腹膜転移再発を含む臨床経過に反映されるか否か、すなわち特異度を検証する必要がある。

近年、各種高感度遺伝子変異検出技術が開発され、遺伝子学的研究に大きく貢献し

ている。これにより、従来は臨床検体における癌由来の mutant molecule の濃度の低さから検出不能であった微小な遺伝子変異を検出することが可能となった。腹腔洗浄液は、簡便に採取可能である上に腹腔内全体の腫瘍の進展度合いを判定できるため、癌の治療方針決定のためには非常に有用な検体である。

我々の教室は、膵癌研究の分野を牽引している米国 Johns Hopkins 大学の Sol Goldman Pancreatic Cancer Research Center と技術提携を行っている。その成果のひとつとして、高感度遺伝子変異検出技術を用いて膵腫瘍患者の臨床検体からの微量な遺伝子変異を同定することに成功した。膵癌の重要な前癌病変である膵上皮内腫瘍性病変において、従来の報告（～40%）とは著しく異なる高頻度（98%）の体細胞変異が発生初期段階から生じていることを見出した（Kanda M, et al. Gastroenterology 2012）。同様に腫瘍由来のDNA濃度が非常に低い十二指腸液から膵管内乳頭粘液性腫瘍に特異的なGNAS遺伝子点変異を検出することに成功し、診断的有用性を示した（Kanda M, et al. GUT 2012）。

また、世界有数の膵疾患の手術業績を持ち、その豊富な症例数を活かして膵腫瘍に関する基礎研究および臨床研究を多く行ってきた。豊富な検体、臨床データ、臨床検体を対象とした分子生物学的手法の習熟は、本研究の目的達成に大きく貢献するものである。また、腹腔内遊離癌細胞の検出法とその臨床応用に関する研究を以前より幅広く行っており（Nomoto et al. Pancreas. 1997, Kodera Y et al. Ann Surg. 2002, Yamada et al Ann Surg. 2008）、本研究はこれらを新規解析法によってさらに発展させたものである。

2. 研究の目的

鋭敏な腹膜転移診断の新規手法を開発し、その臨床応用に向けての基盤を作るため、以下を目的とした。

- (1) 本研究に用いる手法の検出力および正確性を示す。膵癌のほぼ全例で認められるKRAS codon12/13の点変異をターゲットとし、これを高感度遺伝子変異検索技術（Competitive Allele -Specific TaqMan® PCR; Cast PCR法）で検出することで遊離膵癌細胞の存在を診断する。まず、KRAS点変異を有する既知の膵癌細胞株由来のDNAを用いて希釈系列を作成し、検出感度の限界とその正確性・再現

性を明らかにする。

- (2) 膵癌患者および対照群としての非膵癌患者の腹腔洗浄液を対象とし、微小遊離癌細胞由来の遺伝子変異の有無を調べる。
- (3) 既存の腹膜転移診断法である病理学的細胞診および RT-PCR 法と検出能を比較し、その診断能を示すとともに、本手法の術中迅速診断に向けての実用性を検証する。
- (4) 微小腹腔内遊離癌細胞の存在及び局在と、術後生存期間、再発形式などとの相関を解析し、検出された微小遊離癌細胞の臨床的意義を調べる。

本研究の特色としては、高感度遺伝子変異検索技術を用いることによって、従来は検出困難であった臨床検体における微量な遺伝子変異の正確な解析を可能としたことである。これまでの消化器系癌における微小腹膜転移の研究は、RT-PCR 法によるものがほとんどであり、標的遺伝子の腫瘍特異性や検査法の測定感度の問題があった。さらに、核酸抽出から変異検索までを高速化し、術中迅速診断に応用可能な検査時間が達成可能である点である。本研究で用いた腹腔洗浄液は、簡便、非侵襲的に採取可能であり、かつ腹腔内全体を広く評価できる。検体採取に特殊な手技を必要とせず、広く一般に普及しうる手法であるため、その実用化が得られれば社会への貢献度も大きい。

3. 研究の方法

< 腹腔内遊離癌細胞検出法の正確性および検出力の検証 >

(1) 高感度遺伝子変異解析法

Cast PCR 法により遺伝子変異の存在を定性的・定量的の両方で判定する。はじめに、本手法の正確性および検出感度限界を確認するため、膵癌細胞株を用いた希釈系列に対しての前述の 2 種の遺伝子変異検出法を行った。G12D の KRAS 変異を有する膵癌細胞株 AsPC-1 から抽出した DNA を、Wild type DNA により 10%、1%、0.1%、0.05%、0.01% と希釈系列を作成し、これを対象に Cast PCR 法を施行し、KRAS 変異の検出能を検証した。同時に、Wild type コントロールも対象とし、偽陽性を生じないかを確認した。

< 臨床検体およびデータ収集、核酸の抽出 >

(2) 腹腔洗浄液の収集

名古屋大学医学部附属病院にて、浸潤性膵管癌に対して開腹手術を施行する症例から、倫理委員会の指針に則った文書による同意を得た上で、開腹時に腹腔洗浄液を研究用に採取した。同時に同検体を病理学的細胞診検査にも提出した。コントロールとして、膵癌を有しない良性疾患患者（慢性膵炎、良性膵腫瘍）の症例からも同様に腹腔洗浄液を採取した。

(3) 核酸の抽出

DNA の抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて行った。高速化された Kit のプロトコールでは、1 検体からの DNA 抽出は 15 分で可能であった。

< 臨床検体（腹腔洗浄液）からの微小遊離癌細胞の検出 >

(4) Cast PCR 法

収集腹腔洗浄液から抽出した DNA を用いて、KRAS codon 12/13 をターゲットにした Cast PCR 法を行う。コントロールとして良性疾患症例も対象とし、偽陽性を生じないことを確認した。

(5) 病理学的細胞診、RT-PCR (CK19, CK20, CEA) との比較

本研究の手法による微小腹腔内遊離癌細胞検出の臨床的有用性、診断能を評価するため、全対象検体において、現行の腹膜転移診断法である病理学的細胞診検査と過去に報告された RT-PCR 法との比較を行った。RT-PCR 法は、腹腔洗浄液検体から抽出された RNA から逆転写反応によって cDNA を作成し、CK19、CK20 および CEA 発現レベルを定量的 RT-PCR 法により調べた。

(6) 微小腹腔内遊離癌細胞検出の臨床的意義の検証

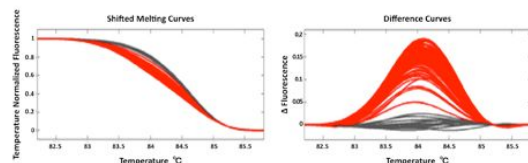
本研究の手法、病理学的細胞診検査、RT-PCR 法のそれぞれにおいて、微小腹腔内遊離癌細胞の存在及び局在と、術後生存期間、再発形式（特に腹膜播種再発）との相関解析を行い、検出された微小遊離癌細胞の臨床的意義を調べた。

4. 研究成果

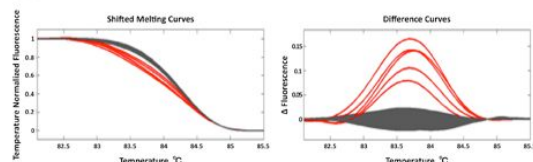
膵癌細胞株 AsPC-1 の希釈系列では、0.1% の変異 DNA が再現性をもって検出可能であった。

KRAS 変異陽性膵癌細胞株 AsPC-1 を用いた希釈実験

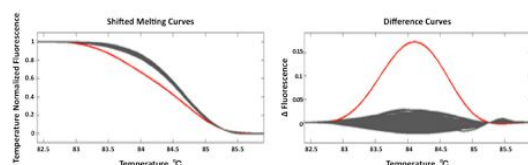
10%



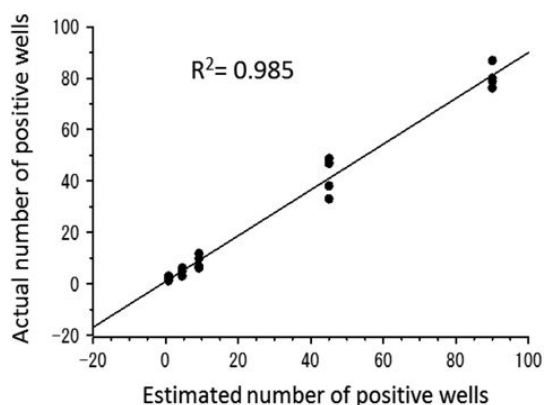
1%



0.1%

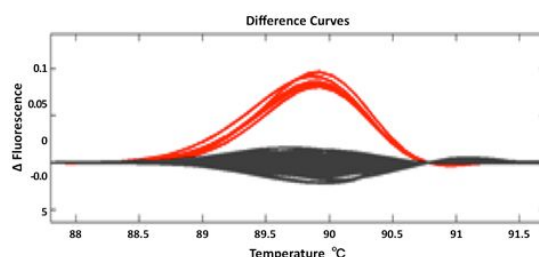
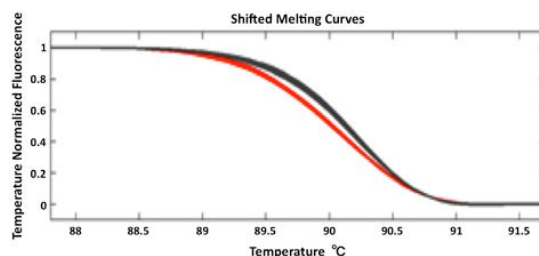


希釈濃度と変異検出率の相関

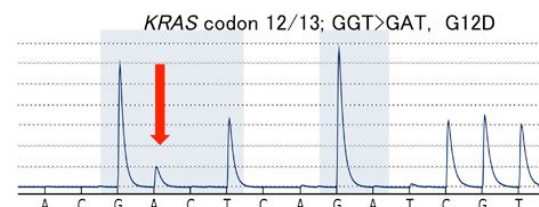


採取された腹腔洗浄液検体からは速やかに DNA 抽出を行った。抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて行われる。高速化された Kit のプロトコルでは、1 検体の DNA 抽出は 15 分で可能であった。収集腹腔洗浄液から抽出した DNA を用いて、KRAS codon 12/13 をターゲットにした Cast PCR 法を開始した。コントロールとして、良性疾患症例でも 15 例施行し、偽陽性を生じないことを確認した。腹腔洗浄液から KRAS 変異が検出された症例を、微小腹腔内遊離癌細胞陽性と判断したが、膵癌 51 症例のうち 18 例 (35%) で陽性であった。

KRAS 変異陽性膵癌細胞株 AsPC-1 を用いた希釈実験



KRAS 変異陽性膵癌細胞株 AsPC-1 を用いた希釈実験



本研究の手法による微小腹腔内遊離癌細胞検出の臨床的有用性、診断能を評価するため、全対象検体において、現行の腹膜転移診断法である病理学的細胞診検査と過去に報告された RT-PCR 法との比較を行う。RT-PCR 法は、腹腔洗浄液検体から抽出された RNA から逆転写反応によって cDNA を作成し、CK19、CK20 および CEA 発現レベルを定量的 RT-PCR 法により調べた。微小腹腔内遊離癌細胞陽性 18 例のうち、9 例で細胞診陽性であった。CK19、CK20、CEA 量は、いずれも腹腔洗浄細胞診と有意な相関を認めなかった。現在も、再発・予後追跡中であるが、微小腹腔内遊離癌細胞陽性例では、無再発生存期間が短縮する傾向が認められている。

今後さらに、微小腹腔内遊離癌細胞の存在及び局在と、術後生存期間、再発形式 (特に腹膜播種再発) の詳細な検討を行い、検出された微小遊離癌細胞の臨床的意義を明らかにしたい。特に、細胞診検査が陰性かつ本法が陽性となった症例の解析結果が重要であると考えている。

本法は核酸抽出・解析の一連の過程が 2 時間で可能であり、今後の臨床応用が期待できるものと考えられる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

大屋 久晴 (OHYA, Hisaharu)
名古屋大学・医学系研究科・招へい教員
研究者番号：30723027

(2)研究分担者

なし