

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08629

研究課題名(和文) CAPP-Seqを用いたctDNA変異解析モニタリングによる膵癌個別化治療の開発

研究課題名(英文) Personalized medicine by monitoring ctDNA for pancreatic cancer

研究代表者

廣野 誠子(Hirono, Seiko)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60468288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌患者の血液を採取し、CAPP-Seqを用いてctDNA変異解析を施行した。全症例においてctDNA変異を認めた。切除不能膵癌症例に対して、化学療法を施行前、治療開始後3ヶ月、progression disease (PD) った時点の3ポイントでctDNA変異をモニタリングした結果、KRAS mutationを治療前に認めたが、化学療法開始後3ヶ月目では検出不能となり、PDになった時点で増量した。この結果から、CAPP-SeqによるctDNA変異をモニタリングすることで、治療の効果判定が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、膵癌患者において、治療前あるいは治療中にcell-free tumor DNA変異解析をモニタリングすることで、gemcitabine・nab-paclitaxelあるいはFOLFIRINOXによる化学療法の効果予測を行うことができれば、各患者に最適な化学療法を用いた個別化治療を開発でき、また化学療法耐性時には治療方針の変更をすることができ、膵癌患者の生存期間延長に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We monitored circulating cell-free tumor DNA (ctDNA) in the patients with pancreatic cancer during treatment using Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq). Copy number of Kras mutation from 78.6 copy to 0 copy in a patient with unresectable pancreatic cancer decreased on 3 months after start of chemotherapy, however, increased from 0 copy to 94.4 copy at progression disease on imaging findings. Based on our data, monitoring ctDNA by CAPP-Seq might reflect the effectiveness of the treatments for pancreatic cancer.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：膵癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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。本研究は、CAPP-Seq を用いて、膵癌患者の ctDNA 変異解析を行い、治療効果予測可能となる変異の同定を行う。

2. 研究の目的

本研究では、CAPP-Seq を用いて、膵癌患者の ctDNA 変異解析を行い、治療効果予測可能となる変異の同定を行う。さらに、切除不能膵癌患者の化学療法である gemcitabine (GEM) ・ nab-paclitaxel (nab-PTX) 併用療法を受ける膵癌症例の ctDNA 変異解析をモニタリングし、治療効果予測ならびに耐性予測に關与する変異の同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 膵癌患者からの血液採取

切除可能膵癌、borderline resectable (BR)膵癌、切除不能膵癌患者を対象に、血液を採取する。切除可能膵癌に対しては、術前に採血を行い、BR 膵癌に対しては、術前治療前と術前治療後の 2 回で、切除不能膵癌に対しては、化学療法開始前と化学療法開始後 3 ヶ月目、progression disease (PD) になった時点の 3 ポイントで血液を採取する。

2) 血液サンプルから cell-free DNA の抽出

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 cell-free DNA を抽出する。Qubit Assay による cell-free DNA の定量と Agilent Bioanalyzer による cell-free DNA の quality の確認を行い、CAPP-Seq による cell-free tumor DNA 変異解析に使用するまで -80°C の超低温フリーザーに保管する。

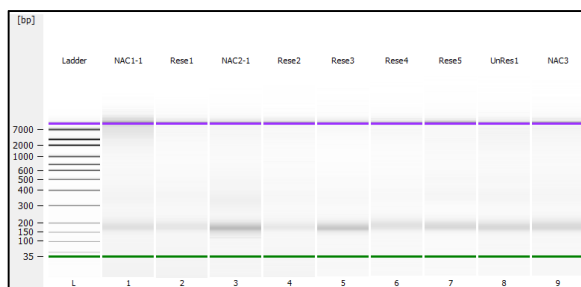
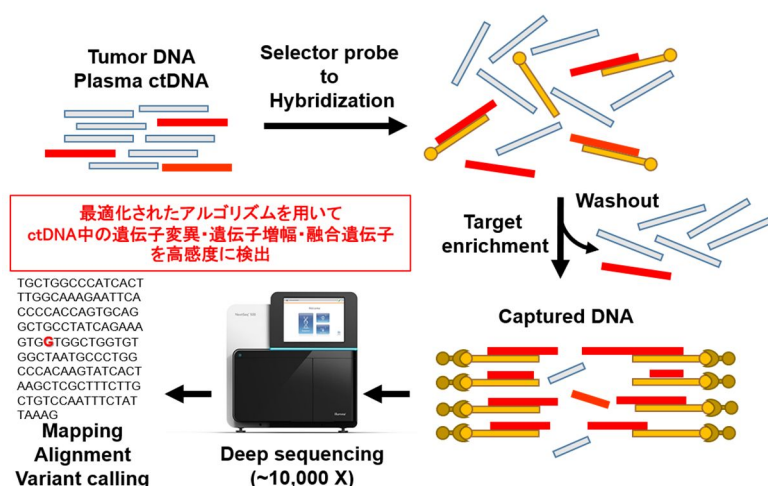


図 1. Cell-free DNA の抽出：膵癌患者の血液から cell-free DNA の抽出を行い、DNA 量の定量と質の

確認を行った

3) CAPP-Seq による cell-free tumor DNA の変異頻度の定量化

図2 CAPP-Seq workflow



ctDNA Library Prep Kit を用いて、膵癌患者の cell-free DNA に adaptor を ligation し、PCR にて増幅する。ctDNA Surveillance Panel にて 197 の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 cell-free tumor DNA の変異頻度を定量化した ctDNA Surveillance Panel (197 遺伝子) を用いて、標的領域を hybridization し、DNA 断片を回収 (target enrichment) する。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 cell-free tumor DNA の変異頻度を定量化する。

4) Cell-free tumor DNA の変異解析

治療前の切除可能膵癌、BR 膵癌、切除不能膵癌の cell-free tumor 変異の頻度と変異量を評価する。次に、BR 膵癌、切除不能膵癌に対しては、化学療法 (GEM・nab-PTX 併用療法) の前後で、cell-free tumor DNA 変異の量をモニタリングすることにより、治療効果を評価する。

4. 研究成果

1) CAPP-Seq により同定した膵癌患者の cell-free tumor DNA 変異

膵癌患者症例 13 例 (切除可能膵癌 4 例、BR 膵癌 7 例、切除不能膵癌 2 例) に対して、治療前の血液を採取し、CAPP-Seq を用いて、cell-free tumor DNA 変異解析を施行した。全ての症例において cell-free tumor DNA 変異を認め、計 42 種類の標的領域に変異を同定した。変異を認めた遺伝子数は、最も多いサンプルで 6 種類、最も少ないサンプルで 2 種類であった。13 例中 4 例 (30.8%) の cell-free tumor DNA において *KRAS* mutation、*TP53* mutation を認め、2 例 (15.4%) の cell-free tumor DNA において *ERBB2* mutation、*BRAF* mutation、*GRM5* mutation、*LRRTM4* mutation、*BRCA2* mutation を認めた。

2) 切除不能膵癌症例の化学療法中の cell-free tumor DNA 変異解析のモニタリング

切除不能膵癌症例 (UR1) に対して、GEM・nab-PTX 併用療法を施行し、治療前、治療開始後 3 ヶ月目、PD になった時点の 3 ポイントで cell-free tumor DNA 変異をモニタリングした。その結果、*KRAS* mutation は、治療前 78.6 copy 認めたが、化学療法開始後 3 ヶ月目では検出不能となり、PD になった時点で 94.4 copy に増量した。また *TP53* mutation においても、同様に、治療前には 52.2 copy 認めたが、化学療法開始後 3 ヶ月目では検出不能となり、PD になった時点で 142 copy に増量した。この結果から、CAPP-

Seq による cell-free tumor DNA 変異をモニタリングすることで、治療の効果判定が可能であることが示唆された。

3) BR 膵癌症例の術前化学療法前後の cell-free tumor DNA 変異解析のモニタリング

BR 膵癌 7 例に対して、術前に GEM・nab-PTX 併用療法を 2 コース施行した。術前治療前と治療後に血液を採取し、CAPP-Seq を用いて、cell-free tumor DNA 変異解析のモニタリングを行った。膵癌に高頻度に変異を認める *KRAS* mutation, *TP53* mutation, *BRAF* mutation を認めた 6 例 (BR 2, 3, 4, 5, 6, 7) を対象に評価した。6 例中 3 例 (BR 4, 5, 7) で、術前化学療法前には認めなかった cell-free tumor DNA 変異が、治療後に検出された。

BR 4, 5, 7 症例では、cell-free tumor DNA 変異量が 術前治療前に比べ、治療後に増加した BR 4 では、治療前に検出されなかった *TP53* mutation が治療後に検出され、BR 5 では、治療前に検出されなかった *KRAS* mutation が治療後に検出され、BR 7 では、治療前に検出されなかった *TP53* mutation と *BRAF* mutation が治療後に認められた。臨床データと統合させると、BR 4 では、術前治療施行後、画像上 PD (他臓器浸潤の出現) と判断し、切除不能膵癌として化学療法を継続する方針となり、手術にいたらなかった。BR 5 は、GEM・nab-PTX 併用療法を 2 コース施行後、画像上では stable disease (SD) であったので外科的切除を行った。摘出標本における病理診断において 60% の腫瘍消失を認めたが、術後 3 ヶ月目に肝転移を認めた。BR 7 は、GEM・nab-PTX 併用療法を 2 コース施行後、画像診断において、腫瘍サイズは縮小を認め partial response (PR) と判断し、外科的切除を行った。摘出標本における病理診断では 35% の腫瘍消失を認めたのみであった。

一方、6 例中 3 例 (BR 2, 3, 6) で、術前化学療法前に認めた cell-free tumor DNA 変異量が、治療後に減少した。

BR 2 では、治療前に *TP53* mutation を 245 copy 認めたが、治療後には検出されず、BR 3 では、治療前には *TP53* mutation 8.37 copy 認めたが、治療後には 5.16 copy に減少した。BR 6 では、治療前に *TP53* mutation を 397 copy 認めたが、治療後には 12.4 copy まで減少した。臨床データと統合させると、BR 2 では、GEM・nab-PT 併用療法 2 コース施行後、画像上 SD であったので外科的切除を行った。摘出標本の病理診断において、60% の腫瘍消失を認めた。BR 3 は、GEM・nab-PTX 併用療法 2 コース施行後、画像上 SD で外科的切除を行った。病理診断において、40% の腫瘍消失を認めた。BR 6 は、GEM・nab-PTX 併用療法 2 コース施行後、画像上 SD であったので外科的切除を行った。病理診断においては、50% の腫瘍消失を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawai M., Hirono S., Okada KI., Miyazawa M., Kitahata Y., Kobayashi R., Ueno M., Hayami S., and 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 Hirono S., Kawai M., Okada KI., Fujii T., Sho M., Satoi S., Amano R., Eguchi H., Mataka Y., Nakamura M., Matsumoto I., Baba H., Tani M., Kawabata Y., Nagakawa Y., Yamada S., Murakami Y., Shimokawa T., and Yamaue H	4. 巻 19
2. 論文標題 MAPLE-PD trial (Mesenteric Approach vs. Conventional Approach for Pancreatic Cancer during Pancreaticoduodenectomy): study protocol for multicenter randomized controlled trial of 354 patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trials.	6. 最初と最後の頁 613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13063-018-3002-z.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣野誠子, 川井 学, 山上裕機
2. 発表標題 膵癌における生存期間延長を目指したSMA周囲全周リンパ節郭清の意義についての検討.
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020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, 中村公紀, 尾島敏康, 勝田将裕, 上野昌樹, 山上裕機
2. 発表標題 ICGによる膵頭部リンパ流からみた膵癌に対するSMA周囲リンパ節郭清の意義についての検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 北畑裕司, 川井 学, 廣野誠子, 岡田健一, 宮澤基樹, 小林良平, 上野昌樹, 速水晋也, 須崎紀彦, 山上裕機
2. 発表標題 Prospective study of the monitoring of circulating tumor DNA during neoadjuvant chemotherapy for the borderline resectable pancreatic cancer.
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	川井 学 (Kawai Manabu) (40398459)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701)	
研究分担者	岡田 健一 (Okada Ken-ichi) (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・講師 (24701)	
研究分担者	北畑 裕司 (Kitahata Yuji) (00535338)	和歌山県立医科大学・医学部・学内助教 (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・教授 (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
---------	---------