

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10184

研究課題名(和文) 膵癌患者の末梢血検体におけるcell-free DNA KRAS遺伝子変異の研究

研究課題名(英文) Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer.

研究代表者

村上 義昭 (Murakami, Yoshiaki)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号：10263683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌が進行していく過程で循環血液中に放出されるcell-freeDNAからK-ras遺伝子変異を検出できれば有用な膵癌診断のバイオマーカーになるという仮説のもと、Bio-Rad QX100 Droplet Digital PCRをもちいて研究を行った。根治切除を受けた膵癌患者105名の周術期血液検体より、K-ras遺伝子変異を伴うcell-freeDNAの測定を行った。結果、33%の患者において、K-ras遺伝子変異を伴うcell-freeDNAが検出され、その患者群は、K-ras遺伝子変異を伴うcell-freeDNAが検出されなかった患者群よりも、有意に予後不良であった。

研究成果の概要(英文)：We used droplet digital polymerase chain reaction to detect rare mutant tumour-derived KRAS genes in plasma cell-free DNA (cfDNA) as ctDNA. Samples were collected from 105 patients who underwent pancreatoduodenectomy for PDAC at a single institution. Overall survival (OS) was analysed according to the presence of ctDNA. Among the 105 cases, ctDNA was detected in 33 (31%) plasma samples. The median OS durations were 13.6 months for patients with ctDNA (ctDNA+) and 27.6 months for patients without ctDNA. Patients who were ctDNA+ had a significantly poorer prognosis with respect to OS ($P<0.0001$). Our findings suggested that the presence of ctDNA in plasma samples could be an important and powerful predictor of poor survival in patients with PDAC. Accordingly, ctDNA detection might be a promising approach with respect to PDAC treatment.

研究分野：膵癌 バイオマーカー

キーワード：膵癌 バイオマーカー K-ras変異 cell free DNA

1. 研究開始当初の背景

膵臓外科領域では、近年の画像診断技術の発達による手術適応症例の増加と、手術手技および周術期管理の進歩により、術後長期生存例が増加している。2007年1年間の慢性膵炎推計受療患者数は47,100人(95%信頼区間40,200~54,000人)、年間推計受療数は人口10万人あたり36.9人、2007年1年間の新規慢性膵炎発症患者数は、15,200人(95%信頼区間12,900~17,600人)、人口10万人あたりの推定新規発症患者数は11.9人であった。慢性膵炎の有病患者数は年々増加してきている。症例の増加に伴い、膵切除後あるいは慢性膵炎におけるPEIによる低栄養、またそれに伴うQOLの低下に対する対策は重要な課題と考えられる。

(1) 膵癌におけるKRAS遺伝子点突然変異

膵全摘術後やインスリン依存状態糖尿病における膵内内分泌機能不全に対しては、膵移植や膵島移植などの治療法があり、さらにiPS細胞・ES細胞の利用など再生医療の分野や、膵外分泌細胞からの内分泌細胞への分化誘導など、様々な研究が進行している(Diabetes Frontier 2010)。しかしながら、膵外分泌機能不全の治療に関してはあまり研究が進んでおらず、現時点ではPEIに対しては長期にわたる膵酵素補充療法が必須で標準治療となっている。

(2) 末梢血液 cell-free DNA の検出、解析の意義

近年、患者の血清、尿、胸水、腹水、脊髄液などの体液から採取された細胞の混入の無いDNA、すなわち cell-free DNA が、様々な疾患の新しい解析の対象として注目されている。

大腸癌、肺癌、乳癌などにおいては、それぞれの癌遺伝子に関連した cell-free DNA の研究報告がみられるようになり、特に大腸癌患者では血清 cell-free DNA 量とKRAS 遺伝子異常のモニタリングは生命予後の重要な指標になると予測されている。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト固形がんの中でも特に悪性度が高い膵癌に関して、血液中に循環している癌細胞に由来する cell-free DNA 中の癌遺伝子KRASをQX100 Droplet Digital PCR(以下 ddPCR)システムを活用し解析を行うことを目的とする。本システムは、従来の電気泳動による古典的なPCRやリアルタイムPCRをはるかに凌駕する検出力を有し、定量性にも優れるとされる新たな検出、定量化方法である。本研究の発展により、膵癌患者においては抹消採血のみの低侵襲な検査で早期の膵癌診断を行ったり、正確な予後予測が

できるようになるなど、新規バイオマーカーとして発展することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 膵癌とKRAS遺伝子変異の発現の関連性評価

癌遺伝子KRASの活性化変異はほとんどすべての膵癌で認められている。本研究では、まず当科で切除された膵癌切除標本の凍結保存検体から、フェノール・クロロホルム法にて腫瘍細胞のDNA抽出を行い、KRAS遺伝子変異の頻度、点突然変異のパターンを明らかにする。抽出されたDNAをBamHIなどの制限酵素にて断片化したのち、必要な領域の増幅を行い、塩基配列パターンをダイレクトシーケンス法にて決定する。KRAS遺伝子の点突然変異の実際は、ほとんどの場合においてexon2, codon12, 13領域に集中しており、主な変異塩基のパターンはcodon12の1st letterと2nd letterにそれぞれ3つ、codon13の2nd letterに1つの7パターンに限られている。

本研究ではexon2, codon12, 13領域はもちろんのこと、稀な変異とされるcodon59, 61, 117, 146など他のexon領域においても網羅的に遺伝子変異の有無、パターンを解析し、腫瘍細胞に与える様々な影響が、それぞれの変異コドンや変異アミノ酸によりどのように異なるかについて評価を行う。

(2) 抹消血液からの高純度 cell free DNA 抽出方法の最適化

一般に抹消血液中に含有される cell free DNAは1ml当たりDNA総量にして100ng程度とされ、極微量である上に、生体内アポトーシスの関連や血流の影響などにより180bp程度まで断片化されているために、標準的な生体試料からの方法では抽出困難である。現在、多数のメーカーから種々の核酸濃縮精製キットが発売されており、これらのキットを利用しつつ採取する血液量、白血球などをあらかじめ除去するための遠心分離操作の条件、抽出したDNA溶液の至適使用法や保存条件などの検討を行う。

(3) 患者抹消血液検体の収集とKRAS遺伝子変異の解析、臨床データの関連性評価

最適なKRAS遺伝子変異の検出系を確立した後は、実際の膵癌患者からの抹消血液検体の収集を開始する。

対象患者からの採血は1回につき7.5mlとし、期間をあけて2回行う予定である。同一患者において、上述1で既に解析した膵癌腫瘍本体由来のDNAにおけるKRAS遺伝子変異パターンとの比較検討を行う。通常ひとつの腫瘍からKRAS遺伝子変異が複数種検出されることはなく、腫瘍組織と血液検体から得られたKRAS遺伝子変異のパターンが一致すれば、すなわちそれは腫瘍細胞が大循環に逸

脱していることが示唆される。

また、患者背景、血液生化学検査、病理組織検査、画像所見、予後などの臨床データと合わせて検討することにより、cell-free DNA 検出の有用性を評価する。

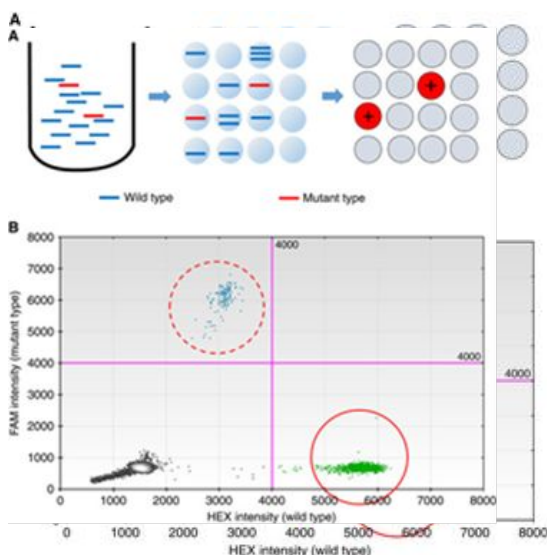
4. 研究成果

癌が進行していく過程で循環血液中に放出される腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell: CTC) 由来の cell-freeDNA から K-ras 遺伝子変異を検出し、定量化できれば有用な膵癌診断のバイオマーカーになるという仮説のもと研究を進めた。K-ras 遺伝子変異を伴う cell-freeDNA 検出のため、Bio-Rad QX100 Droplet Digital PCR を用いた。

根治切除を受けた膵癌患者 105 名の周術期血液検体より、K-ras 遺伝子変異を伴う cell-freeDNA の測定を行った。結果、33% の患者において、K-ras 遺伝子変異を伴う cell-freeDNA が検出され、その患者群は、K-ras 遺伝子変異を伴う cell-freeDNA が検出されなかった患者群よりも、有意に予後不良であった。

本研究により、K-ras 遺伝子変異を伴う cell-freeDNA 検出のための至適条件は確立された。また、K-ras 遺伝子変異を伴う cell-freeDNA は膵癌患者の予後予測因子として有用なバイオマーカーになりうることを示唆された。

今後、術前治療が必要な Borderline Resectable 膵癌患者の選別や、術前化学療法の効果予測因子としての役割にも期待が持てる結果であった。



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 1件)

Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, Sueda T, Hiyama E. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer.

Br J Cancer. 2016 Jun 28;115(1):59-65
査読あり

[学会発表](計 4 件)

1. 羽田野 直人, 村上 義昭, 上村 健一郎, 橋本 泰司, 近藤 成, 中川 直哉, 佐々木 勇人, 檜山 英三, 末田 泰二郎

Droplet Digital PCR を用いた膵癌 KRAS 遺伝子変異の研究

27 回 日本肝胆膵外科学会学術集会 2015 年

2. 羽田野 直人, 村上 義昭, 上村 健一郎, 橋本 泰司, 近藤 成, 中川 直哉, 佐々木 勇人, 檜山 英三, 末田 泰二郎

肝胆膵 Droplet Digital PCR を用いた膵癌患者における KRAS 遺伝子変異の検討

115 回 日本外科学会学術集会 2016 年

3. 羽田野 直人, 村上 義昭, 上村 健一郎, 橋本 泰司, 近藤 成, 中川 直哉, 佐々木 勇人, 檜山 英三, 末田 泰二郎

膵癌患者の末梢血検体における Circulating tumor DNA 検出の意義

71 回 日本消化器外科学会学術集会 2016 年

4. 羽田野 直人, 村上 義昭, 上村 健一郎, 橋本 泰司, 近藤 成, 中川 直哉, 佐々木 勇人, 檜山 英三, 末田 泰二郎

膵癌術前治療における circulating tumor DNA の意義

28 回 日本肝胆膵外科学会学術集会 2016 年

[図書](計 0 件)

[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：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 義昭 (MURAKAMI, Yoshiaki)
広島大学・医歯薬保健学研究科・准教授
研究者番号：10263683

(2) 研究分担者

橋本 泰司 (HASHIMOTO, Yasushi)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号：50423380
(H27年度まで)

(3) 研究分担者

上村 健一郎 (UEMURA, Kenichiro)
広島大学・医歯薬保健学研究科・講師
研究者番号：60379873

(4) 研究協力者

広島大学・大学院生
羽田野 直人 (HADANO, Naoto)