

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：82685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07314

研究課題名(和文) リンチ症候群ccfDNAに関する探索的臨床研究

研究課題名(英文) Exploratory research for ccfDNA in Lynch syndrome

研究代表者

山口 達郎 (Yamaguchi, Tatsuro)

東京都立駒込病院(臨床研究室)・大腸外科・部長

研究者番号：10538482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要(和文)：リンチ症候群のサーベイランスにおけるccfDNAの有用性を検証するために、ccfDNAにおけるMSIを測定し、腫瘍の発生と比較した。リンチ症候群28名より参加同意が得られ、平均2.1回の検体を採取した。MSIは、ddPCR法により測定した。解析の結果、遺伝子多型を1例に認めた。MSIは3例に認め、1例は2マーカー、2例は1マーカー異常を認めた。異常を認めた4マーカーのVAFの平均は8.6%であった。MSIを認めた3例中1例に盲腸癌、1例に回腸癌、1例に縦隔腫瘍を認めた。しかし、胃癌リンパ節転移にて治療中の1例に、ccfDNAにMSIは認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ccfDNAに含まれる腫瘍由来のDNA(ctDNA)は、がんの根治性や化学療法などの治療効果の評価への利用が期待されている。リンチ症候群はがんの高危険群であるため、生涯に渡り頻回に内視鏡検査などを受けなければならない。しかし、リンチ症候群のサーベイランスにおけるccfDNA(ctDNA)の有用性が証明されれば、内視鏡検査の間隔を空けることができるなど、患者負担や医療費の減少につながる可能性がある。本研究において、ccfDNAを解析したところMSIを認めた症例全例に腫瘍の発生を認めていた。今後、多施設共同研究で証明する必要があるが、リンチ症候群のサーベイランスに有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the utility of ccfDNA in the surveillance of Lynch syndrome, microsatellite instability (MSI) in ccfDNA was tested and compared with tumor development. A total of 28 patients with Lynch syndrome were participated after informed consent, and a mean of 2.1 blood samples were collected. We used Promega markers (BAT25, BAT26, NR21, NR24, Mono27) for analyzing MSI by Droplet Digital PCR (ddPCR) method. MSI was observed in three patients. Of the three patients, one patient had two markers and two patients had one marker abnormality. The mean variant allele frequency (VAF) of the four abnormal markers was 8.6% (0.7%-4.1%). Among three patients with MSI, one had cecal cancer, one had ileal cancer, and one had mediastinal tumor. However, one patient undergoing treatment for lymph node metastasis from gastric cancer had no MSI in ccfDNA.

研究分野：遺伝性腫瘍

キーワード：リンチ症候群 ccfDNA マイクロサテライト不安定性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

リンチ症候群は、ミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列の病的変異を原因とする常染色体優性遺伝疾患で、大腸癌や子宮内膜癌などが好発する。これまで、リンチ症候群の原因遺伝子として *MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2* が報告されている。また、*MSH2* 遺伝子の上流に隣接する *EPCAM* 遺伝子の後半部分の欠損により *MSH2* 遺伝子が不活化されることが報告されている。ミスマッチ修復遺伝子が担うミスマッチ修復機構は、DNA 複製や遺伝的組換え時に生じる不適正塩基対の挿入や欠失といった核酸塩基のミスマッチを修復するシステムである。リンチ症候群の患者では、ミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列の病的変異に加え、対立アレルのミスマッチ修復遺伝子に異常が起こるとミスマッチ修復機構は破綻し、DNA 複製時のミスマッチは修復できなくなる。DNA 複製時のミスマッチは 1~数塩基の繰り返し配列であるマイクロサテライト領域に生じやすく、ミスマッチ修復機構の破綻は、エクソン内に繰り返し配列を持つターゲット遺伝子のフレームシフト変異によりその機能が不活化する（図）。ターゲット遺伝子の中には *TGFBR2* 遺伝子や *BAX* 遺伝子などのように細胞の腫瘍化を抑制する遺伝子があり、これらのターゲット遺伝子異常の蓄積がリンチ症候群における発癌へとつながる[Yamaguchi 2006]。

図：フレームシフト変異による異常の例

正常細胞	AGG AAA AAA AAA GCC TGT AGT ACC GTT CAA TAG R K K K A C S T V Q X
腫瘍細胞	AGG AAA AAA AAA AGC CTG TAG A の挿入による R K K K S L X

リンチ症候群の患者は悪性腫瘍が好発するので、早期発見のためには内視鏡検査を始めとした各種検査を一生に渡って必要とする。そのため、リンチ症候群の患者には身体的・経済的負担がある。また、「いつ自分に癌が発生するのではないか」という不安や、自分だけではなく子や孫への遺伝させてしまうかもしれないという心理的な負担がある。このため、リンチ症候群の患者の負担となるような検査の間隔を延長させることが出来るような手段が望まれる。

近年、血液検体を用いて腫瘍の分子生物学的特性を解析する liquid biopsy が開発され注目を浴びている。circulating cell free DNA (ccfDNA) は、細胞死に伴い血液中に放出される 170bp 程度の DNA 断片で、癌の診断、分子標的治療薬の効果予測・耐性予測に有用なバイオマーカーと考えられており、がんの術後のサーベイランスや化学療法におけるバイオマーカーとしての利用が期待されている。

そこで本研究では、リンチ症候群に発生する腫瘍のほとんどがマイクロサテライト不安定性を示すことに注目し、リンチ症候群の患者の ccfDNA を用いてマイクロサテライト不安定性に由来する DNA の変異（フレームシフト変異）を解析し、新規発生する腫瘍のスクリーニングや、手術や化学療法の効果判定としての有用性について検討する。本研究の成果により内視鏡検査のような侵襲の大きい検査を簡略化することができれば、患者負担の軽減や医療費削減に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リンチ症候群における ccfDNA 解析の有用性について検討することである。具体的には、以下の内容を明らかにすることを目的とする。

- 切除可能な腫瘍を持つ患者の腫瘍の切除前と切除後の ccfDNA
切除前後における ccfDNA の変化
- 切除不能な腫瘍を持つ患者の全身化学療法中の ccfDNA
腫瘍マーカー、画像評価との比較
- 腫瘍を持たない患者（未発症者や腫瘍切除後症例）の ccfDNA
サーベイランスにおける早期診断

3. 研究の方法

○試料（採血）の収集

当該研究施設において、末梢血 7-14mL を EDTA-2K 入り採血管で採血する。採血管は、4℃、800g で 10 分間遠心し、血漿を新しいチューブに移し、4℃、16000g で 10 分間遠心し、上澄みから DNA を抽出するか、使用するまで -80℃ で保管する。

○採血時期

腫瘍を合併する場合
根治切除可能な場合

同意取得後根治切除前・根治切除半年後・1年後・以降1年毎
根治切除不可能な場合
同意取得後治療開始前・以降3ヶ月毎
腫瘍を合併しない場合
同意取得後・以降1年毎（定期サーベイランス時）

○匿名化番号の付与

当該研究施設の個人情報管理者が、個人情報（氏名、生年月日など）に関連のない匿名化番号を患者ごとに付与する。また、複数回の採血に際しては連番をつける。ただし、臨床情報との照合を行い解析に用いるため、連結可能匿名化とする。

○ccfDNA 解析

DNA は、QIAamp Circulating Nucleic Acid kit (Qiagen)を用いて抽出する。DNA 濃度は、PicoGreen Assay (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)で測定する。

Droplet Digital PCR System を用いて ccfDNA 中のターゲット遺伝子の変異解析を行う。なお、本研究において解析する遺伝子変異は腫瘍細胞に由来する体細胞変異であり、次世代へと継承される変異（生殖細胞系列変異）ではない。

○患者情報の収集

既往の腫瘍情報

臨床情報（年齢、性別、消化管内視鏡検査結果、画像検査結果など）

○遵守すべき諸規則

本研究は『ヘルシンキ宣言（2013 年；フォルトアレザ改訂版）』および我が国の「個人情報の保護」等を踏まえた上で、『人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（平成 29 年 2 月 28 日一部改正）』および『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 29 年 2 月 28 日一部改正）』を遵守して行う。

○インフォームド・コンセント

対象者に対し主治医あるいは研究分担者が文書を用いて研究に関する説明を行い、同意を書面にて受ける。

○プライバシーの保護

すべての研究者や本研究に携わる者は、データ取扱い者としての守秘義務があり、個人が特定されないように最大限の努力を払い、対象者の情報が外部に漏えいすることがないように下記の手段を講じる。

対象者の個人情報を施設以外では識別できないように、氏名およびカルテ番号など個人識別情報を消去し、新たに登録番号が付与される（連結可能匿名化）。この際、登録番号とカルテ番号の対応表は施設にてあらかじめ取決めした個人情報管理者以外は、閲覧できないようにする。登録番号、カルテ番号の対応表および収集した個人情報、診療情報、遺伝情報は、施錠して厳重に保管する。

情報漏洩への対策を強化するため、收拾された情報は施錠可能な場所において、スタンドアロンまたは閉じたネットワーク上のコンピュータを用いて情報の管理と処理をパスワード管理下におこなう。

○研究実施計画書の承認および変更

本研究は、研究実施計画書が施設の倫理審査委員会での審査を受け、承認を得た後に実施される（承認済み）。また、研究開始後、研究実施計画書の変更が必要になった場合は、施設の倫理審査委員会の承認を得た後、研究を再開する。

4. 研究成果

リンチ症候群のサーベイランスにおける ccfDNA の有用性を検証するために、ccfDNA における MSI を測定し、腫瘍の発生と比較した。リンチ症候群 28 名より参加同意が得られ、平均 2.1 (1~4)回の検体を採取した。MSI は、ddPCR 法により測定した。

解析の結果、遺伝子多型を 1 例に認めた。MSI は 3 例に認め、1 例は 2 マーカー、2 例は 1 マーカー異常を認めた。異常を認めた 4 マーカーの VAF の平均は 8.6% (0.7%~4.1%) であった。MSI を認めた 3 例中 1 例に盲腸癌、1 例に回腸癌、1 例に縦隔腫瘍を認めた。しかし、胃癌リンパ節転移にて治療中の 1 例に、ccfDNA に MSI は認めなかった。

表：Variant allele frequencies of mono-nucleotide markers in the patients of Lynch syndrome.

	VAF(%)
--	--------

患者 ID	採血 番号	BAT25	BAT26	NR21	NR24	Mono27
5Fit	1	0	0	0	0	0
5Fit	2	0	0	0	0	0
5Fit	3	0	0	0	0	0
Y59ZR	1	0	0	0	0	0
Y6L5q	2	0	0	0	0	0
Y6L5q	3	0	0	0	0	0
Y6L5q	4	0	0	0	0	0
Y6L5q	5	0	0	0	0	0
YaLiQ	1	0	0	0	0	0
YBJaX	2	0	0	0	0	0
YBJaX	3	0	0	0	0	0
YBsnS	1	0	0	0	0	0
YBsnS	2	0	0	0	0	0
YBx8q	2	0	0	0	0	48.6
YBx8q	3	0	0	0	0	61.9
Yc8YK	2	0	0	0	0	0
Yc8YK	3	0	0	0	0	0
YdeNi	1	0	0	0	0	0
YdeNi	2	0	0	0	0	0
YdeNi	3	0	0	0	0	0
YDTUo	2	0	0	0	0	0
YDTUo	3	0	0	0	0	0
YDTUo	4	0	0	0	0	0
YEsuG	1	0	0	0	0	0
YEsuG	2	0	0	0	0	0
YEsuG	3	0	0	0	0	0
Yf4Mu	1	0	0	0	0	0
YFs3n	1	0	0	0	0	0
YFs3n	2	0	0	0	0	0
YGBAd	1	0	0	0	0	0
YGBAd	2	0	0	0	0	0
YhHoq	2	0	0	0	0	0
YhHoq	3	0	0	0	0	0
YL4J p	2	0	0	0	0	0
YLKLH	2	0	0	0	0	0
YLKLH	3	0	0	0	0	0
YlmPL	1	0	0	0	0	0
YlmPL	2	0	0	0	0	0
YoLRZ	1	0	0.7	0	0	0
Ypoxb	1	0	0	0	0	0
Ypoxb	2	0	0	0	0	0
Ypoxb	3	0	0	0	0	0
Ypoxb	4	0	0	0	0	0
YrJ2J	1	0	0	0	0	0
YRkwM	2	0	0	0	0	0
YRkwM	3	0	1.7	0	0	4.1
YT3aD	1	0	0	0	0	0
YT3aD	2	0	0	0	0	2.1
YTyGD	1	0	0	0	0	0
YTyGD	2	0	0	0	0	0
YTyGD	3	0	0	0	0	0
YvRf9	1	0	0	0	0	0
YvRf9	2	0	0	0	0	0
YxdGh	2	0	0	0	0	0
YYT8f	2	0	0	0	0	0
YYT8f	3	0	0	0	0	0
YzYy8	2	0	0	0	0	0
YzYy8	3	0	0	0	0	0

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14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 Nakayama Yujiro, Iijima Takeru, Inokuchi Takuhiko, Kojika Ekumi, Takao Misato, Takao Akinari, Koizumi Koichi, Horiguchi Shin-ichiro, Hishima Tsunekazu, Yamaguchi Tatsuro	4. 巻 —
2. 論文標題 Clinicopathological features of sporadic MSI colorectal cancer and Lynch syndrome: a single-center retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-021-01968-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 Win Aung Ko, Dowty James G., Reece Jeanette C., Yamaguchi Tatsuro, Jenkins Mark A.	4. 巻 —
2. 論文標題 Variation in the risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome: a retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Lancet Oncology	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/S1470-2045(21)00189-3	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 Takao Misato, Yamaguchi Tatsuro, Eguchi Hidetaka, Yamada Takeshi, Okazaki Yasushi, Tomita Naohiro, Nomizu Tadashi, Momma Tomoyuki, Takayama Tetsuji, Tanakaya Kohji, Akagi Kiwamu, Ishida Hideyuki	4. 巻 —
2. 論文標題 APC germline variant analysis in the adenomatous polyposis phenotype in Japanese patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-021-01946-4	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 —

1. 著者名 Natsume Soichiro, Yamaguchi Tatsuro, Eguchi Hidetaka, Okazaki Yasushi, Horiguchi Shin-ichiro, Ishida Hideyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Germline deletion of chromosome 2p16-21 associated with Lynch syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 —
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-021-00152-y	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 —

1. 著者名 Ito Tetsuya, Suzuki Okihide, Kamae Nao, Tamaru Jun-ichi, Arai Tomio, Yamaguchi Tatsuro, Akagi Kiwamu, Eguchi Hidetaka, Okazaki Yasushi, Mochiki Erito, Ishida Hideyuki	4. 巻 51
2. 論文標題 Comprehensive analysis of DNA mismatch repair-deficient gastric cancer in a Japanese hospital-based population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 886～894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyab026	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 —

1. 著者名 SUZUKI OKIHIDE, YAMAGUCHI TATSURO, FUKUCHI MINORU, MOCHIKI ERITO, ARAI TOMIO, AKAGI KIWAMU, ISHIDA HIDEYUKI	4. 巻 41
2. 論文標題 Prediction Model for Gastric Cancer With DNA Mismatch Repair Deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 975～982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14851	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 —

1. 著者名 Kagawa Makoto, Kawakami Satoru, Yamamoto Azusa, Suzuki Okihide, Eguchi Hidetaka, Okazaki Yasushi, Akagi Kiwamu, Tamaru Jun-ichi, Arai Tomio, Yamaguchi Tatsuro, Ishida Hideyuki	4. 巻 51
2. 論文標題 Prevalence and clinicopathological/molecular characteristics of mismatch repair protein-deficient tumours among surgically treated patients with prostate cancer in a Japanese hospital-based population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 639～645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa207	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 —

1. 著者名 Yamamoto Azusa, Yamaguchi Tatsuro, Suzuki Okihide, Ito Tetsuya, Chika Noriyasu, Kamae Nao, Tamaru Jun-ichi, Nagai Tomonori, Seki Hiroyuki, Arai Tomio, Tachikawa Tetsuhiko, Akagi Kiwamu, Eguchi Hidetaka, Okazaki Yasushi, Ishida Hideyuki	4. 巻 51
2. 論文標題 Prevalence and molecular characteristics of DNA mismatch repair deficient endometrial cancer in a Japanese hospital-based population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 60～69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa142	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 —

1. 著者名 Kobayashi Shin, Takahashi Shinichiro, Takahashi Naoki, Masuishi Toshiki, Shoji Hirokazu, Shinozaki Eiji, Yamaguchi Tatsuro, Kojima Motohiro, Gotohda Naoto, Nomura Shogo, Yoshino Takayuki, Taniguchi Hiroya	4. 巻 27
2. 論文標題 Survival Outcomes of Resected BRAF V600E Mutant Colorectal Liver Metastases: A Multicenter Retrospective Cohort Study in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 3307～3315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08817-8	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 —

1. 著者名 Nakayama Yujiro, Iijima Takeru, Wakaume Rika, Takahashi Keiichi, Matsumoto Hiroshi, Nakano Daisuke, Miyaki Michiko, Yamaguchi Tatsuro	4. 巻 14
2. 論文標題 Microsatellite instability is inversely associated with type 2 diabetes mellitus in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215513	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 —

1. 著者名 Ito Tetsuya, Yamaguchi Tatsuro, Wakatsuki Tomokazu, Suzuki Tsuyoshi, Eguchi Hidetaka, Okazaki Yasushi, Yamamoto Gou, Tachikawa Tetsuhiko, Kawakami Satoru, Sasaki Astushi, Akagi Kiwamu, Ishida Hideyuki	4. 巻 49
2. 論文標題 The single-base-pair deletion, MSH2 c.2635-3delC affecting intron 15 splicing can be a cause of Lynch syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 477～480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyz031	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 —

1. 著者名 Natsume Soichiro, Yamaguchi Tatsuro, Takao Misato, Iijima Takeru, Wakaume Rika, Takahashi Keiichi, Matsumoto Hiroshi, Nakano Daisuke, Horiguchi Shin-ichiro, Koizumi Koichi, Miyaki Michiko	4. 巻 48
2. 論文標題 Clinicopathological and molecular differences between right-sided and left-sided colorectal cancer in Japanese patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 609～618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyy069	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 —

1. 著者名 Saita Chiaki, Yamaguchi Tatsuro, Horiguchi Shin-ichiro, Yamada Rin, Takao Misato, Iijima Takeru, Wakaume Rika, Aruga Tomoyuki, Tabata Taku, Koizumi Koichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Tumor development in Japanese patients with Lynch syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0195572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0195572	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 —

1. 著者名 Yamada Rin, Yamaguchi Tatsuro, Iijima Takeru, Wakaume Rika, Takao Misato, Koizumi Koichi, Hishima Tsunekazu, Horiguchi Shin-ichiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Differences in histological features and PD-L1 expression between sporadic microsatellite instability and Lynch-syndrome-associated disease in Japanese patients with colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 504～513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1238-y	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0件

〔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

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
---------	---------