

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：90101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07671

研究課題名(和文) ドライバー変異が惹起する発癌経路に基づいた血中新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Study for novel biomarker in liquid biopsy on carcinogenic pathways induced by driver mutations

研究代表者

小野 裕介 (Ono, Yusuke)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・ゲノム診断研究部・部門長

研究者番号：40742648

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)：膵癌をモデルとしてドライバー遺伝子変異と連動するRNAをターゲットとする新しいバイオマーカーの探索を行った。遺伝子変異であるKRAS/GNAS変異細胞株の作成をゲノム編集により行った。RNA-seqを行った結果、GNAS変異によりKRASシグナル経路が抑制するデータが得られた。さらに血液遊離mRNAの効果的な採取方法の検討を行い、デジタルPCRを用いた高感度の発現検出系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内現行の血漿CGP検査は、現時点では進行癌患者を対象とし、検査目的は抗がん剤・分子標的薬の選択に限定される。研究ベースでは遺伝子変異にメチル化検出を組み合わせた包括的パネルが発表され、またmiRNAについて多癌腫のmiRNA検出パネルも検討されてきた。一方で本研究の対象としたmRNA、ncRNAはアポトーシス/壊死腫瘍細胞からの情報とシグナル伝達などの活性腫瘍細胞からの情報の両方、すなわち癌に関する直接のリアルタイム情報を取得できる可能性があり、本研究で目指した効果的な遊離RNAの回収と検出系を用いることにより、上記パネルと比較すると、特定の癌腫を早期で捉えるバイオマーカーになり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for new biomarkers targeting RNAs linked to driver genes using pancreatic cancer as a model. We generated KRAS mutant, GNAS mutant, KRAS/GNAS mutant, and wild-type strains of these genes in two different pancreatic ductal epithelial cell lines (HPDE, HPNE) and analyzed their expression patterns by RNA-seq. Furthermore, an effective method for collecting and purifying unstable plasma cell-free mRNA was validated, and a highly sensitive expression detection system using digital PCR was constructed. cfRNA was extracted from 35 PDA patient samples, and the amounts present were compared after quantification.

研究分野：腫瘍診断学

キーワード：リキッドバイオプシー ドライバー変異 遊離RNA デジタルPCR 膵癌 IPMN

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がんゲノム医療時代を迎えた現在、その最も重要な課題の一つである早期診断においては、遺伝子解析技術の真価が発揮されることが期待される。

膵癌はその早期発見が現状で極めて難しい癌種とされているが、前駆病変の一つである膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) は比較的早期で発見することが可能である。膵癌病変の多くが *KRAS* 遺伝子変異を伴い発生するのに対し、IPMN では *KRAS* に加え *GNAS* 遺伝子 (GTP 結合タンパク質 *Gs* サブユニット) がその発生におけるドライバー遺伝子であることが知られている。*GNAS* 遺伝子変異による IPMN 発症、およびその後の発癌過程においては特徴的な細胞内プロセスが稼働することが示唆されている。

一方で我々は膵癌の早期診断を念頭に置いたリキッドバイオプシーの開発に取り組んでいる。これまでに約 200 例の膵癌および IPMN 患者より血漿を得て、血中に存在する遊離 DNA (cfDNA) における *KRAS* および *GNAS* 遺伝子変異の高感度検出による膵癌リスク評価系を構築した。しかし現状での遺伝子変異のみの検出による方法では早期癌の拾い上げの確実性には限界がある。リキッドバイオプシーの臨床的な有用性は、現在、進行癌に限定されており、早期で発見するには遊離核酸から遺伝子変異に加えた新たな情報を得ることが課題とされてきた。

2. 研究の目的

本研究は *KRAS*、*GNAS* 遺伝子変異を有する IPMN 症例に特異的な発現プロファイルの変化を検出することを目的として、血清から検出できる新規バイオマーカーの候補のターゲットを遊離 RNA (cfRNA) に定めて探索を行う。基盤となる遊離核酸の遺伝子変異データに加え、組織内に存在する各病変の発現プロファイルを詳細に解析し、さらに症例の病理像・臨床データとの統合データを得ることにより、膵癌への悪性化を早期診断することが可能な先制医療への応用を目指す。

3. 研究の方法

KRAS、*GNAS* 変異を有する IPMN 症例に特異的な発現プロファイルの変化を検出することを目的とし、血清から検出できるバイオマーカーの候補のターゲットを遊離 RNA に定めて下記の手順にて探索を行った。

1) *KRAS* 遺伝子変異を有するゲノム編集済細胞株を用いた網羅的発現解析

KRAS/*GNAS* 変異細胞株と、ゲノム編集により構築した同系統の *KRAS* 変異株または *GNAS* 変異株において、mRNA およびノンコーディング RNA (ncRNA) についての網羅的解析を行い、発現変動のある RNA をバイオマーカーの候補として同定することを試みた。本研究においては膵管上皮細胞 HPDE 株、HPDE *KRAS* G12V 株に対し、*GNAS* R201H または R201C、また不死化膵管上皮細胞 hTERT-HPNE 株に対し、*KRAS* G12D と *GNAS* R201H または R201C を、Neon エレクトロポレーションシステム (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてノックインにより導入した。得られたゲノム編集細胞株の発現プロファイルを RNA-seq により比較した。

2) 遊離 RNA の単離に関する予備実験

体液遊離 total RNA (cfRNA) の効果的な単離・精製方法については現在までに確立された報告は乏しいことから、血液由来 cfRNA の抽出方法についてのバリデーションを行った。サンプルとしては、疑似検体として膵組織由来細胞 (KP4, PK1, KP2, Capan1) の培養上清に放出された遊離 RNA とし、用手法 (Qiagen 社 circulating NA kit、Zymo research 社 Quick-cfRNA Serum and Plasma kit) または、自動核酸精製装置 (PSS 社 magLEAD 12gC) を用い、精製した。ランダムプライマーを用いた逆転写を行い、Qubit を用いた RNA 定量後、リアルタイム PCR (BioRad CFX96) およびデジタル PCR (BioRad QX200) に供した。

遺伝子変異が引き起こす RNA プロファイル → 血中バイオマーカーとして利用

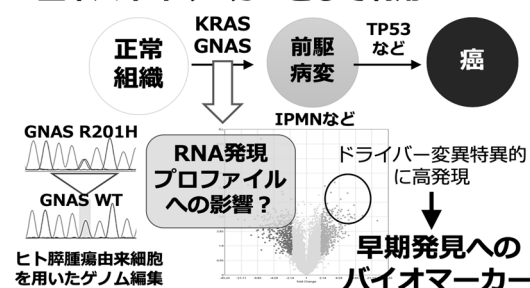


図1. 本研究が目指すRNAバイオマーカー検出

3) 血液検体を用いた新規バイオマーカー候補の検出検討

候補となる RNA 群について、IPMN の新規分類に基づいたバイオマーカーとしての有用性を評価するために、すでに取得・保存されている患者血液サンプル、およびコントロールとして本研究に登録されている健康人・および膵癌・IPMN 患者 35 例の血漿遊離 RNA を用い、方法 2) で検討したメソッドにより cfRNA を抽出し、定量後に存在量を比較した。

4. 研究成果

1) KRAS, GNAS 遺伝子変異を有するゲノム編集細胞株の取得

Neon エレクトロポレーションシステムによりノックインを行い、これまでに HPDE 株、HPDE KRAS G12V 株に対し、GNAS R201H または R201C を導入した、HPDE GNAS R201H または R201C、HPDE KRAS G12V /GNAS R201H または R201C のゲノム編集株を得た。また不死化膵管上皮細胞 hTERT-HPNE 株に対し GNAS R201H または R201C 単独、および KRAS G12D と GNAS R201H または R201C の変異を導入したゲノム編集株をそれぞれ複数クローン取得した。ヘテロ型となるようゲノム編集は全てデジタル PCR による変異確認、シーケンスによる当該領域およびオフターゲットの可能性が高い 10 領域の確認を行った。ここまで得られたゲノム編集株、すなわち KRAS 変異株、GNAS 変異株、KRAS/GNAS 変異株およびそれら遺伝子の野生型株について、変異の有無による生育速度、細胞形態についての顕著な差は見られなかった。

現在までに、ヒト膵癌由来の初代細胞 (950-5-BLK 細胞株) を用いた RNA-seq 解析データを得ており、KRAS 及び GNAS 遺伝子変異に連動した MUC ファミリー群を初めとする粘液産生、さらに両ドライバー遺伝子変異の拮抗に関わる経路を特定した (Kawabata, Ono, 2022)。

さらに取得された細胞株 (HPNE 系列) を用いて、当ラボ保有の NGS である NextSeq1000 (イルミナ) を用いた RNA-seq による網羅的解析を行った。KRAS G12D 単独変異株と KRAS G12D および GNAS R201H または R201C の二重変異株における発現プロファイルの比較を GSEA (Gene set enrichment analysis) 解析により行なった結果、HPNE 細胞株においても KRAS G12D 単独変異株が示す種々の KRAS シグナル経路の活性化が GNAS R201H または R201C の獲得により抑制されており、上記 950-5-BLK 細胞株で得られたデータを支持した。

現在、詳細な発現プロファイル解析を進め、本項目の最終目的であるバイオマーカーの候補となる発現変動のある RNA 候補のバリデーションを行っている。

2) 遊離 RNA の単離方法に関するバリデーション、3) 血液を用いた遊離 RNA の検出

血液遊離 RNA を抽出、精製し、デジタル PCR によるターゲット RNA の検出を行なった。膵組織由来細胞の培養上清、および本研究に登録されている血漿を用いて遊離 RNA の精製検討を行った結果、Zymo 社 Quick-cfRNA Serum and Plasma kit を使用した時に最も収量が高かったため、以降の解析に用いた。cfRNA は高度に分解を受けている状態であり、cfDNA と比較すると、そのフラグメントパターンは検体により異なるものであった (図 2A)。共同研究者の高橋が膵癌において優位に発現が変化し、バイオマーカーとして期待される 3 種類の新規 lncRNA を特定した (Takahashi, 2020 他)。本抽出系においてもデジタル PCR において 2 つの ncRNA のデジタル PCR による検出を確認した (図 2B)。

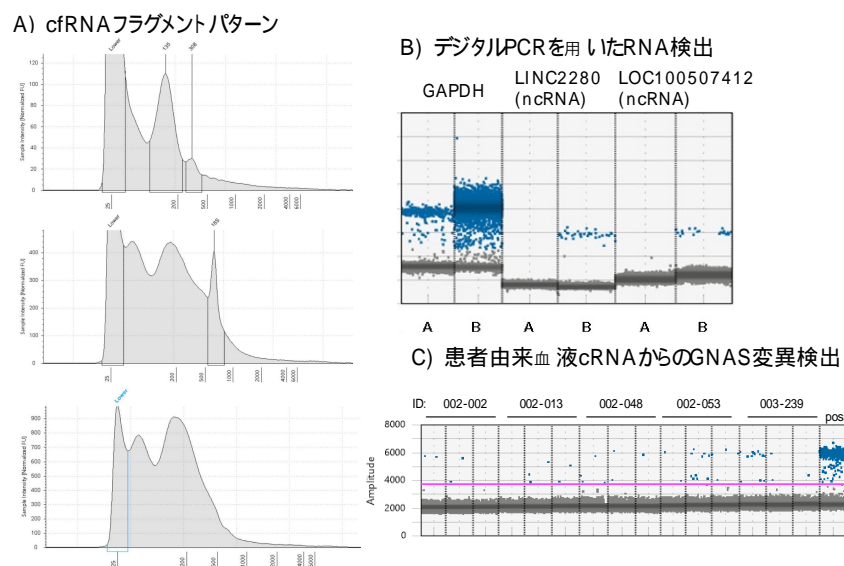


図2. 血中遊離RNAのフラグメントパターンとデジタルPCRによる検出検討結果

また遺伝子変異を発現増幅により DNA よりも効果的に捉えることを目的とした GNAS 遺伝子の mRNA に関するデジタル PCR の検出系を構築した。登録された膵癌・IPMN 患者由来血液から 6 サイクルの pre-amplification による存在コピー数の増幅過程を経てデジタル PCR 解析を行った結果、切除組織に GNAS R201H 変異を有していた患者検体由来の cfRNA より変異が検出された (図 2C)。また健康血液検体を用いた遊離 RNA の GAPDH と rRNA との比較結果を表 1 に示す。RNA

の抽出、逆転写のうち99%がrRNAであったことから、rRNAを事前に除去するribo-minusのような処理についてもmRNAの効率的な補足には検討が必要であると考えられた。

現在、構築された高感度検出系に基づき全ての患者検体について、cfDNA変異解析による遺伝子変異パターンとそれに方向付けられたcfRNAの発現変化を統合的に解析する予定である。

我々はこれまでIPMNはその発生段階で二つのドライバー遺伝子*KRAS*及び*GNAS*が重要な役割を担うことを示しており、*GNAS*変異は*KRAS*シグナルと協調してIPMNの発生を担う一方(Patra, 2018) *GNAS*がPKA依存的にNOTCHシグナルを負に制御し膵癌進展に抑制効果を示すことが明らかになり(Kawabata, Ono, 2022) この2つの遺伝子変異の背後では複雑なクロストークが起きることで腫瘍表現型を示す可能性が示唆されていた(図3)。本研究ではこのクロストークに關与する経路をさらに検証することを目的として、膵管上皮細胞株を用いて*KRAS*、*GNAS*変異細胞の取得を行い、*GNAS*が*KRAS*経路に対し拮抗的な影響を与える可能性について示唆された。ドライバー変異、しかもその変異種(変異アミノ酸、変異形式[ミスセンス、ナンセンス])との組み合わせも同時に評価することでより詳細な経路の変化が捉えられると期待できる。今後は上記細胞株に加え、我々の研究グループが保有する*GNAS*変異を有する10種類のIPMN関連初代細胞に対しても*KRAS*ゲノム編集を行い、発現プロファイルの比較を行う予定である。

バイオマーカーとしてのターゲットRNAについての血液からの抽出については方法・結果2で述べた。これまでマイクロRNA(miRNA)を用いた細胞外小胞からのRNA抽出はすでに確立されているが、遊離RNAとなるとその存在量、そして、血液中でRNAが比較的不安定であり高度に断片化されていること、および高濃度のRNaseが存在することが大きな原因となって、本研究でも候補とした遺伝子、発現比較が可能となる十分量の検出まで至ってはいない。今後も安定的にRNAを抽出する方法、逆転写、そしてデジタルPCRを用いたターゲットの高感度の検出系の構築に向けバリデーションを進める予定である。さらに、我々は膵組織に最も近い体液である膵液・十二指腸液に存在するDNAより、微量な変異を顕著に高率で検出する結果を得た(論文準備中)。現在はこれらの消化液からも遊離RNAを取得し、上記ターゲットの検出を目指した検討を行っている。血中では捉え切れない変化を反映したRNAを効率的に回収し、高感度に検出することができればIPMN検出の機会を拡大する可能性がある。

SampleID	Concentration (copies/uL)		mRNA (%)	rRNA
	GAPDH	RNA45S5		
Du09-137-1	27.2	12,400	0.22	99.78
Du09-139-1	12.8	31,400	0.04	99.96
Du09-140-1	38	55,000	0.07	99.93
Du05-903-1	8.69	35,400	0.02	99.98
Du05-904-1	28.7	358,300	0.01	99.99

表1 血漿より精製した遊離RNA中におけるデジタルPCR検出結果

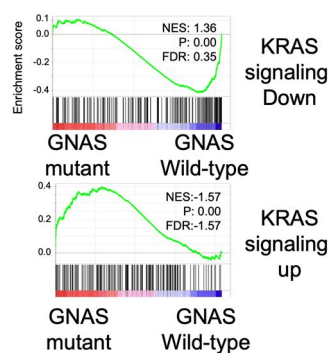


図3. *GNAS*変異による*KRAS*シグナル系の変化 (Kawabata, Ono, J. Gastroenterol., 2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計31件（うち査読付論文 29件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 17件）

1. 著者名 Sayaka Yuzawa, Tomohiko Michizuka, Rika Kakisaka, Yusuke Ono, Manami Hayashi, Miki Takahara, Akihiro Katada, Yusuke Mizukami, Mishie Tanino	4. 巻 18
2. 論文標題 Low-grade papillary Schneiderian carcinoma with TP53 mutation: a case report and review of the literature	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13000-023-01334-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Koizumi, Yukiho Tamura, Ryohei Yoshida, Chie Mori, Yusuke Ono, Mishie Tanino, Yusuke Mizukami, Takaaki Sasaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Two Cases of SMARCA4-Deficient Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) with Improved Performance Status (PS) after Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Cureus Journal of Medical Science	6. 最初と最後の頁 e37656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7759/cureus.37656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chiho Maeda, Yusuke Ono, Akihiro Hayashi, Kenji Takahashi, Kenzui Taniue, Rika Kakisaka, Miyuki Mori, Takahiro Ishii, Hiroki Sato, Tetsuhiro Okada, Hidenasa Kawabata, Takuma Goto, Nobue Tamamura, Yuko Omori, Kuniyuki Takahashi, Akio Katanuma, Hidenori Karasaki, Andrew Scott Liss, Yusuke Mizukami	4. 巻 25
2. 論文標題 Multiplex digital PCR assay to detect multiple KRAS and GNAS mutations associated with pancreatic carcinogenesis from minimal specimen amounts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Molecular Diagnostics	6. 最初と最後の頁 367-377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmoldx.2023.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsuya Hirose, Yuko Omori, Yusuke Ono, Yusuke Mizukami, Yoshiki Kaneko, Tsunehiko Maruyama, Haruo Ohtani, Toru Furukawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular comparison of concurrent components of high-grade dysplasia, adenocarcinoma, and sarcomatoid carcinoma in a case of sarcomatoid carcinoma of the gallbladder	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	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/s00428-023-03524-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuko Omori, Yusuke Ono, Takanori Morikawa, Fuyuhiko Motoi, Ryota Higuchi, Masakazu Yamamoto, Yuko Hayakawa, Hidenori Karasaki, Yusuke Mizukami, Michiaki Unno, Toru Furukawa	4. 巻 277
2. 論文標題 Serine/Threonine Kinase 11 Plays a Canonical Role in Malignant Progression of KRAS-Mutant and GNAS-Wild-Type Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 e384-e395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/sla.0000000000004842	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 Yuki Murakami, Hiroki Tanabe, Yusuke Ono, Yuya Sugiyama, Yu Kobayashi, Takehito Kunogi, Takahiro Sasaki, Keitaro Takahashi, Katsuyoshi Ando, Nobuhiro Ueno, Shin Kashima, Sayaka Yuzawa, Kentaro Moriichi, Yusuke Mizukami, Mikihiro Fujiya, Toshikatsu Okumura	4. 巻 15
2. 論文標題 Local recurrence after successful endoscopic submucosal dissection for rectal mucinous mucosal adenocarcinoma: A case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 World Journal of Gastrointestinal Oncology	6. 最初と最後の頁 186-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4251/wjgo.v15.i1.186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sho Kitagawa, Shin Ichihara, Yuko Omori, Chiho Maeda, Yusuke Ono, Munenori Tahara, Toru Furukawa, Shunji Muraoka, Hiroyuki Miyakawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Branch-duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm with Rapidly Developing Intracystic Xanthogranulomatous Nodules	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Internal Medicine	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) 10.2169/internalmedicine.0862-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashi Kokumai, Yuko Omori, Masaharu Ishida, Hideo Ohtsuka, Masamichi Mizuma, Kei Nakagawa, Maeda Chiho, Yusuke Ono, Yusuke Mizukami, Shin Miura, Kiyoshi Kume, Atsushi Masamune, Takanori Morikawa, Michiaki Unno, Toru Furukawa	4. 巻 36
2. 論文標題 GATA6 and CK5 stratify the survival of patients with pancreatic cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 100102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.modpat.2023.100102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masato Ono, Yusuke Ono, Toru Nakamura, Yusuke Mizukami, et al	4. 巻 29
2. 論文標題 Predictors of Long-Term Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma after Pancreatectomy: TP53 and SMAD4 Mutation Scoring in Combination with CA19-9	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 5007-5019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-11630-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toru Kono, Taku Maejima, Yusuke Ono, Takahiro Ito, Shigeru Furukawa, Mitsue Nishiyama, Masahiro Yamamoto, Ayumu Sugitani, Hidenori Karasaki, Yusuke Mizukami, Atsuo Maemoto	4. 巻 820
2. 論文標題 Distinct effects of TU-100 (daikenchuto) on long-lasting dysbiosis in the small intestine in patients with colorectal cancer and inflammatory bowel disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 146266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2022.146266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hidemasa Kawabata, Yusuke Ono, Nobue Tamamura, Kyohei Oyama, Yusuke Mizukami et al	4. 巻 57
2. 論文標題 Mutant GNAS limits tumor aggressiveness in established pancreatic cancer via antagonizing the KRAS-pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 208-220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01846-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kenzui Taniue, Tanzina Tanu, Yuki Shimoura, Shuhei Mitsutomi, Han Han, Rika Kakisaka, Yusuke Ono, Nobue Tamamura, Kenji Takahashi, Youichiro Wada, Yusuke Mizukami, Nobuyoshi Akimitsu	4. 巻 23
2. 論文標題 RNA Exosome Component EXOSC4 Amplified in Multiple Cancer Types Is Required for the Cancer Cell Survival	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iseki Masahiro, Omori Yuko, Ono Yusuke, Mizukami Yusuke, Furukawa Toru, Unno Michiaki et al	4. 巻 14
2. 論文標題 Intracholecystic papillary neoplasm arising in the cystic duct and extending into common bile duct: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 668 ~ 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01311-4	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 Sato Hiroki, Goto Takuma, Hayashi Akihiro, Kawabata Hidemasa, Okada Tetsuhiro, Takauji Shuhei, Sasajima Junpei, Enomoto Katsuro, Fujiya Mikihiro, Oyama Kyohei, Ono Yusuke, Sugitani Ayumu, Mizukami Yusuke, Okumura Toshikatsu	4. 巻 21
2. 論文標題 Prognostic significance of skeletal muscle decrease in unresectable pancreatic cancer: Survival analysis using the Weibull exponential distribution model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 892 ~ 902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2021.03.002	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 Ariyasu Ryo, Uchibori Ken, Sasaki Takaaki, Tsukahara Mika, Kiyotani Kazuma, Yoshida Ryohei, Ono Yusuke, Kitazono Satoru, Ninomiya Hironori, Ishikawa Yuichi, Mizukami Yusuke, Yanagitani Noriko, Fujita Naoya, Nishio Makoto, Katayama Ryohei	4. 巻 112
2. 論文標題 Monitoring epidermal growth factor receptor C797S mutation in Japanese non-small cell lung cancer patients with serial cell free DNA evaluation using digital droplet PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2371 ~ 2380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14879	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 Okazaki Satoshi, Sasaki Takaaki, Yasuda Shunsuke, Abe Masahiro, Yoshida Nana, Yoshida Ryohei, Ishibashi Kei, Minami Yoshinori, Okumura Shunsuke, Chiba Shinichi, Takei Hidehiro, Hayashi Ryusuke, Nagato Toshihiro, Kobayashi Hiroya, Sugitani Ayumu, Ono Yusuke, Mizukami Yusuke, Kitada Masahiro, Ohsaki Yoshinobu	4. 巻 21
2. 論文標題 The feasibility of circulating tumor DNA analysis as a marker of recurrence in triple-negative breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	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) 10.3892/ol.2021.12681	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 Kobayashi Toshikazu, Omori Yuko, Ono Yusuke, Karasaki Hidenori, Mizukami Yusuke, Makino Naohiko, Motoi Fuyuhiko, Unno Michiaki, Ueno Yoshiyuki, Furukawa Toru	4. 巻 56
2. 論文標題 Pathways for the development of multiple epithelial types of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 581 ~ 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01783-2	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 Suemitsu Yamato, Ono Yusuke, Mizukami Yusuke, Ye Juanjuan, Yamakawa Keiko, Takamoto Takeshi, Nakano-Narusawa Yuko, Mukai Yuri, Takamatsu Manabu, Nakazawa Atsuko, Mino-Kenudson Mari, Kumasaka Toshio, Matsuda Yoko	4. 巻 11
2. 論文標題 A Case of Adult Pancreatoblastoma With Novel APC Mutation and Genetic Heterogeneity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in 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) 10.3389/fonc.2021.725290	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 Sato Hiroki, Ono Yusuke, Mizukami Yusuke, Okumura Toshikatsu et al	4. 巻 12
2. 論文標題 Case Report: A Rare Case of Esophagogastric Junctional Squamous Cell Carcinoma After the Successful Treatment of Neuroendocrine Carcinoma: Clonal Tumor Evolution Revealed by Genetic Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	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) 10.3389/fgene.2021.608324	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 Takahashi Kenji, Taniue Kenzui, Ono Yusuke, Fujiya Mikihiro, Mizukami Yusuke, Okumura Toshikatsu	4. 巻 8
2. 論文標題 Long Non-Coding RNAs in Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	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) 10.3389/fmolb.2021.717890	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 Okazaki Satoshi, Sasaki Takaaki, Yasuda Shunsuke, Abe Masahiro, Yoshida Nana, Yoshida Ryohei, Ishibashi Kei, Minami Yoshinori, Okumura Shunsuke, Chiba Shinichi, Takei Hidehiro, Hayashi Ryusuke, Nagato Toshihiro, Kobayashi Hiroya, Sugitani Ayumu, Ono Yusuke, Mizukami Yusuke, Kitada Masahiro, Ohsaki Yoshinobu	4. 巻 21
2. 論文標題 The feasibility of circulating tumor DNA analysis as a marker of recurrence in triple-negative breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	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) 10.3892/ol.2021.12681	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masahiro Iseki, Masamichi Mizuma, Yasutaka Aoki, Shuichi Aoki, Yuko Omori, Yusuke Ono, Yusuke Mizukami, Toru Furukawa, Michiaki Unno et al	4. 巻 2
2. 論文標題 Intracholecystic papillary neoplasm arising in the cystic duct and extending into common bile duct: a case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical journal of gastroenterology	6. 最初と最後の頁 668-677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01311-4	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 Yusuke Ono, Akihiro Hayashi, Chiho Maeda, Mayumi Suzuki, Reona Wada, Hiroki Sato, Hidemasa Kawabata, Tetsuhiro Okada, Takuma Goto, Hidenori Karasaki, Yusuke Mizukami, Toshikatsu Okumura	4. 巻 10
2. 論文標題 Time-saving method for directly amplifying and capturing a minimal amount of pancreatic tumor-derived mutations from fine-needle aspirates using digital PCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-020-69221-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuhiro Okada, Yusuke Mizukami, Yusuke Ono, Hiroki Sato, Akihiro Hayashi, Hidemasa Kawabata, Yusuke Mizukami et al	4. 巻 55
2. 論文標題 Digital PCR-based plasma cell-free DNA mutation analysis for early-stage pancreatic tumor diagnosis and surveillance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 1183-1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01724-5.	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 Yuko Omori, Yusuke Ono, Toshikazu Kobayashi, Fuyuhiko Motoi, Hidenori Karasaki, Yusuke Mizukami, Naohiko Makino, Yoshiyuki Ueno, Michiaki Unno, Toru Furukawa	4. 巻 477
2. 論文標題 How does intestinal-type intraductal papillary mucinous neoplasm emerge? CDX2 plays a critical role in the process of intestinal differentiation and progression.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 21-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-020-02806-8	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 Hiroki Sato, Junpei Sasajima, Tetsuhiro Okada, Akihiro Hayashi, Hidemasa Kawabata, Takuma Goto, Kazuya Koizumi, Nobue Tamamura, Hiroki Tanabe, Mikihiro Fujiya, Shin-ichi Chiba, Mishie Tanino, Yusuke Ono, Yusuke Mizukami, Toshikatsu Okumura	4. 巻 99
2. 論文標題 Resection for pancreatic cancer metastases contributes to survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e20564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/md.0000000000020564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Tanabe, Kentaro Moriichi, Keitaro Takahashi, Yusuke Ono, Yu Kobayashi, Yuki Murakami, Takuya Iwama, Takehito Kunogi, Takahiro Sasaki, Katsuyoshi Ando, Nobuhiro Ueno, Shin Kashima, Hidehiro Takei, Yusuke Mizukami, Mikihiro Fujiya, Toshikatsu Okumura	4. 巻 8
2. 論文標題 Genetic alteration of colorectal adenoma carcinoma sequence among gastric adenocarcinoma and dysplastic lesions in a patient with attenuated familial adenomatous polyposis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e1348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.1348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kentaro Moriichi, Hiroki Tanabe, Yusuke Ono, Yu Kobayashi, Yuki Murakami, Takuya Iwama, Takehito Kunogi, Takahiro Sasaki, Keitaro Takahashi, Katsuyoshi Ando, Nobuhiro Ueno, Shin Kashima, Hidehiro Takei, Yusuke Mizukami, Mikihiro Fujiya, Toshikatsu Okumura	4. 巻 35
2. 論文標題 Serrated adenomas with a BRAF mutation in a young patient with familial adenomatous polyposis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of colorectal disease	6. 最初と最後の頁 1967-1972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00384-020-03657-0	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 Kazumasa Nagai, Yusuke Mizukami, Yuko Omori, Toshifumi Kin, Kei Yane, Kuniyuki Takahashi, Yusuke Ono, Ayumu Sugitani, Hidenori Karasaki, Toshiya Shinohara, Toru Furukawa, Tsuyoshi Hayashi, Toshikatsu Okumura, Hiroyuki Maguchi, Akio Katanuma	4. 巻 33
2. 論文標題 Metachronous intraductal papillary mucinous neoplasms disseminate via the pancreatic duct following resection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern pathology	6. 最初と最後の頁 971-980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41379-019-0405-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasutaka Aoki, Masamichi Mizuma, Tatsuo Hata, Takeshi Aoki, Yuko Omori, Yusuke Ono, Yusuke Mizukami, Michiaki Unno, Toru Furukawa	4. 巻 251
2. 論文標題 Intraductal papillary neoplasms of the bile duct consist of two distinct types specifically associated with clinicopathological features and molecular phenotypes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of pathology	6. 最初と最後の頁 38-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5398	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 Shion Tachibana, Yusuke Mizukami, Yusuke Ono, Yuya Sugiyama, Tetsuhiro Okada, Arisa Kitazaki, Junpei Sasajima, Motoya Tominaga, Jun Sakamoto, Keisuke Kimura, Yuko Omori, Toru Furukawa, Taichi Kimura, Shinya Tanaka, Kazuo Nagashima, Hidenori Karasaki, Tomoyuki Ohta, Toshikatsu Okumura	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic Tracing of Clonal Expansion and Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Case Report and Multi-Region Sequencing Analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in 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) 10.3389/fonc.2020.00728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小野 裕介、前田 知歩、高橋 賢治、唐崎 秀則、水上 裕輔
2. 発表標題 分子バーコードを用いた十二指腸液由来核酸の変異解析 -より高濃度の変異検出をターゲットとした膵癌リキッドバイオプシー--
3. 学会等名 第80回 日本癌学会 学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田 知歩、小野 裕介、高橋 賢治、水上 裕輔
2. 発表標題 臨床残余検体を用いた遺伝子変異検出のためのマルチプレックスデジタルPCR前増幅法の確立
3. 学会等名 第80回 日本癌学会 学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野 裕介、前田 知歩、高橋 賢治、唐崎 秀則、水上 裕輔
2. 発表標題 分子バーコードを用いた 十二指腸液由来核酸の変異解析 -より高濃度の変異検出をターゲットとした 膵癌リキッドバイオプシー-
3. 学会等名 第6回 Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田知歩, 小野裕介, 水上裕輔
2. 発表標題 Multiplex digital PCR for detection KRAS and GNAS mutations.マルチプレックスデジタルPCR法を用いたKRASおよびGNAS遺伝子変異解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Ono, Kenji Takahashi, Hidenori Karasaki, Yusuke Mizukami
2. 発表標題 Molecular barcode sequencing using duodenal fluid for profiling genomic alterations in pancreatic neoplasms
3. 学会等名 Joint congress of the 26th meeting of international association of pancreatology and the 53rd annual meeting of japan pancreas society
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Ono, Chiho Maeda, Kenji Takahashi, Hidenori Karasaki, Yusuke Mizukami
2. 発表標題 High-sensitive mutation detection in liquid biopsy with duodenal fluid captures genetic mutations associated with pancreatic carcinogenesis
3. 学会等名 AACR Special Conference; Pancreatic Cancer 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野裕介, 前田知歩, 高橋賢治, 河端秀賢, 唐崎秀則, 水上裕輔
2. 発表標題 消化液に存在する膵癌由来の遺伝子変異検出を目指したリキッドバイオプシー
3. 学会等名 第81回 日本癌学会 学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田中伸哉, 西原広史 (小野担当:分担執筆, 範囲:第3章 ゲノムにおける解析手法 V. リキッドバイオプシー)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 234
3. 書名 がんゲノム病理学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 遺伝子解析用サンプルの製造方法	発明者 水上裕輔, 小野裕介, 林明宏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-217083	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

医療法人徳洲会 札幌東徳洲会病院 医学研究所HP
https://www.higashi-tokushukai.or.jp/inst_biomed_res/

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	水上 裕輔 (Mizukami Yusuke) (30400089)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	
研究分担者	唐崎 秀則 (Hidenori Karasaki) (50374806)	医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・がん生物研究部・客員研究員 (90101)	

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