

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16947

研究課題名（和文）微量組織検体における不適正率をゼロにするデジタル細胞診

研究課題名（英文）Novel method for capturing a minimal amount of pancreatic tumor-derived mutations using digital PCR

研究代表者

林 明宏（Hayashi, Akihiro）

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：30459573

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）：膵癌の確定診断のため行われる組織診は、試料の採取料不足のため検体不適と判定される場合が多い。本研究では微量検体から、癌細胞のもつ遺伝子異常を正確に判定する技術開発を目指した。膵腫瘍患者から提供された針生検等の残余検体を試料に、微量核酸の絶対定量が可能なデジタルPCR装置を用いて、「液滴への核酸封入」によりドライバー変異を検出する方法を開発した（Water-burst法）。本法では生検等の生体試料から核酸抽出をスキップし、KRAS変異の有無を迅速に検出できる利点がある。さらに各種変異型KRASに対する特異的プローブの混合比を調整することにより、特定の変異タイプを特定することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本法の実用化により、検体不良（insufficient material）に起因する再生検を減少させることができ、このことは患者への侵襲低減と医療費削減の双方に貢献できる。超微小検体から確実に癌の存在・質的情報が得られれば、再発や薬剤耐性が疑われる場合に、細径穿刺針を用いて少量の組織サンプルを採取し、仮に病理学的な判定ができずとも、遺伝子異常プロファイルを得ることも可能となる。

研究成果の概要（英文）：Histological examinations performed for the definitive diagnosis of pancreatic cancer are often considered unsuitable due to insufficient sample collection. We aimed to develop a technique to accurately determine the genetic abnormality of cancer cells using a small tissue specimen. We established a Water-burst method to detect driver mutations by "encapsulating nucleic acid in droplets" using a digital PCR platform, which allows absolute quantification of minimal amounts of nucleic acid using residual needle biopsy samples from patients with pancreatic cancer tumors. This method has the advantage of skipping nucleic acid extraction from biological samples and rapidly detecting the driver mutations such as KRAS. Furthermore, adjusting the mixing ratio of specific probes for various KRAS mutations made it possible to identify a particular mutation type.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵癌 低侵襲診断 デジタルPCR ドライバー遺伝子

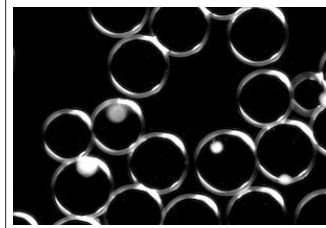
1. 研究開始当初の背景

組織診や細胞診は膵癌の確定診療に欠かせない重要な検査手法であり、採取する組織量は侵襲性と正診率の妥協点をもって判断される。得られた生体試料は、病理学的な形態診断のみならず遺伝子異常やその他のバイオマーカーを判定するためにも用いられるようになり、侵襲の見返りとなる「情報」を最大限にすることが求められる。そのため、検体量不足等の理由で判定が難しい場合には (insufficient material)、形態学に依存しない定量性のある補助手段を持つ必要がある。

多くの腫瘍では初期発生の段階から体細胞変異やコピー数異常等の遺伝子異常がみられ、これらの情報を得ることは癌の診断において客観的指標となり得る。このため今日の病理診断においても、遺伝子やタンパク質発現の異常は補足的に用いられ、時として決定的な根拠にさえなる。特に微量検体の場合にこそ遺伝子変異等の情報をもって腫瘍の存在を定量的に判定できると期待されるが、その場合には癌細胞由来の核酸も少ないことを念頭に遺伝子解析の方法を考えるべきである。

遺伝子工学の急速な進歩により、「単一細胞」を標的としたシングルセル解析の技術が飛躍的に高まっている。シングルセルの全ゲノム解析すら可能な時代を迎え、癌細胞の遺伝的構造の解析、特に癌の発生や多様性といった根源的な疑問への答えに迫ろうとしている。このような解析技術は基礎研究における活用のみならず、工夫次第ではコストや時間の面からも実地臨床へ導入可能な検査法となり得る。図1に示すように、「第3世代PCR」と呼ばれる droplet digital PCR (以下、デジタルPCR) を用いることで、単一の培養細胞をわずかに 1nL の液滴に封入し、その中で PCR 反応を行う事に成功している。このような手法をもって、病理学的判定が困難な微量検体においても、遺伝子異常をマーカーとした「デジタル細胞診」は技術的に可能であり、サンプルの至適処理と解析プロトコルの最適化により、早期に診療に導入し得ると考えられる。

図1：細胞の液滴封入



2. 研究の目的

研究代表者は、がんゲノム医療時代の到来を迎えた今日において、形態診断 (画像・病理) の意義を認識しつつ、ゲノム・分子の情報を早期に実診療に取り入れる必要性を痛感している。例えば、KRAS や EGFR など薬剤感受性に関わる遺伝子変異、HER2 などの遺伝子増幅の検出は、治療法の決定に必要な情報として保険診療として認められているが、この流れを癌の存在診断にも応用すべく、微量の細胞・組織検体を用い安価で迅速ながんゲノム異常を検出する方法を得たいと考えた。近年、次世代シーケンサーをはじめとする遺伝子解析技術が著しく進化している。これらの解析技術を診療に活用する試みが加速しているが、多くの場合、煩雑で時間とコストがかかり、実臨床での応用には様々なハードルが存在する。そこで、できるだけ簡略かつ短時間、さらに低コストで、膵癌を疑うために最低限必要な情報を得ることを本研究の目的とした。すなわち、生検などによって得られた生体試料から、膵癌の大多数において見られる KRAS 変異を検出できれば、病理診断を補足する第一歩となる。

デジタルPCRは、遺伝子変異の高感度検出を可能とする、最新のゲノム解析技術のひとつである。一般的にPCRを含む全ての遺伝子解析において、検体から核酸を抽出・精製する必要があるが、この行程で生ずるロスは少なくはなく、特に微量検体の場合には致命的な結果となることも多い。本研究では、煩雑な核酸抽出・精製をスキップし、検体に含まれる腫瘍細胞を直接、液滴へ「封入」し、特異的プライマー、プローブセットを用いた高感度デジタルPCR反応系に持ち込むことが可能かを検証する。このような方法を用いることで、僅かながら検体中に存在する癌細胞、あるいはその痕跡を遺伝子異常により検出可能となる。この方法を用いる場合、検体固定など前処理法や、高い増幅効率を得るための工夫が必要と考えられる。例えば、限られた数の細胞を確実に液滴へ封入するため、バッファー組成の最適化が求められる。増幅効率の改善のため、液滴封入前後の化学処理、熱や超音波破砕など物理的手法による核酸検出感度の向上が期待される。

本研究では、針生検などで得られる微量検体を試料として核酸精製行程をスキップし、デジタルPCRの基本技術を応用して腫瘍由来のKRAS変異を検出することにより、迅速かつ高精度・低コストな診断法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

1) 培養細胞を用いた検証

ヒト膵癌細胞株 MIA PaCa-2 (ホモ接合性 KRAS G12C) 及び皮膚線維芽細胞株 NB1RGB (野生型 KRAS) を推奨培地にて継代し、トリプシン処理後に 20:4,000~1,000:4,000 の比で混合した細胞懸濁液をデジタル PCR 用の Droplet 作成装置を用いて液滴封入を試みた (Cell-in-drop 法)。また、同様に調整した細胞懸濁液を遠心処理後にヌクレアーゼフリー水 12 μ L に懸濁し、これを直接デジタル PCR のテンプレートとして用いた (Water-burst 法)。KRAS codon12/13 変異を検出する ddPCR KRAS Screening Multiplex Kit (#1863506 ; Bio-Rad 社製) 及び KRAS codon61 変異を検出する ddPCR KRAS Q61 Screening Kit (#12001626) を用い、同社の QX200 Droplet Digital PCR システムを用いて変異検出を行った。

2) 外科切除標本の新鮮組織標本を用いた解析

膵腫瘍 12 例 [浸潤性膵管癌 ; 7 例、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm ; 以下、IPMN) ; 3 例、Acinar cell carcinoma (AAC) ; 1 例、膵内分泌腫瘍 (pancreatic neuroendocrine tumor ; 以下、P-NET) ; 1 例] を対象とした。手術室にて外科切除後 30 分以内に、10 mL のシリンジに接続した 22 ゲージのカテラン針 (テルモ社製) を用いて腫瘍より穿刺吸引した。検体は PAXgene Blood ccfDNA 採血管 (BD Life Sciences 社製) の安定化剤を PBS により 10 倍希釈した溶液内で、1 週間冷蔵保存した (4°C)。その懸濁液を water-burst 法によりデジタル PCR 解析するため、1,000xg で 10 分間遠心分離し、沈殿物を水 12 μ L で再懸濁しテンプレートとして用いた。また、切除腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (以下、FFPE) より GeneRead DNA FFPE Kit (#180134 ; Qiagen 社製) を用いてゲノム DNA を抽出し、ターゲットシーケンス法により KRAS 変異の有無を確認した (Ion GeneStudio S5 system; Thermo Fisher Scientific 社製)。

3) 超音波内視鏡ガイド下穿刺生検の残存検体の採取

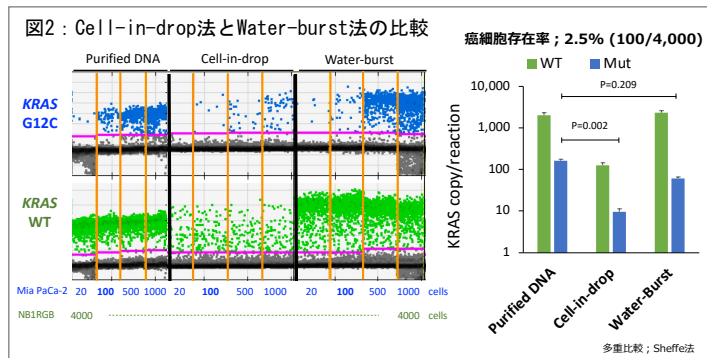
超音波内視鏡下ガイド下穿刺生検 (EUS-FNA) を行った膵腫瘍 10 例 (浸潤性膵管癌 ; 9 例、ACC ; 1 例) を対象とした。FNA には 22 ゲージのフランシオン生検針 (Acquire ; Boston Scientific 社製) を使用し、病理診断の余剰組織及び生検針洗浄液を上記と同様の方法で 1 週間冷蔵保存した。各懸濁液を 1,000xg で 10 分間遠心分離し、沈殿物の一部を Water-burst 法により、また一部は DNeasy Blood&Tissue kit (# 69504 ; Qiagen 社製) を用いて精製のうえ、QX200 システムを用いて KRAS 変異検出を行った。病理診断用の FNA 検体 (FFPE) よりゲノム DNA を採取し、ターゲットシーケンスにより KRAS 変異の有無を確認した。

4. 研究成果

1) 培養細胞を用いた検証 : Cell-in-drop 法と Water-burst 法の比較

20:4,000 (0.5%)、100:4,000 (2.5%)、500:4,000 (12.5%)、1,000:4,000 (25%) の混合比で作成した MIA PaCa-2 と NB1RGB の懸濁液を Droplet 作成装置によって液滴封入した試料を倒立顕微鏡で観察したところ、細胞の一部が液滴に封入されていることが確認された。この Cell-in-drop 法により調製した試料を ddPCR KRAS Screening Multiplex Kit によりデジタル PCR 解析した結果、MIA PaCa-2 由来の KRAS G12C 変異の検出頻度は上記比率で作成した混合懸濁液から予想されるコピー数の 3%程度であり、腫瘍細胞含有率が 0.5-2.5%の範囲の混合懸濁液での変異検出は困難であった (図 2)。

一方、Water-burst 法で調製した試料では、細胞より放出された核酸の液滴封入と PCR 増幅の結果として判定される変異及び野生型 KRAS の検出効率は、Cell-in-drop 法の 10 倍以上と高かった。さらに、腫瘍細胞含有率が 0.5-2.5%の範囲においても、変異型 KRAS の検出は細胞数から予想されるコピー数レベルの 25-50%へ上昇し、検出効率の大幅な改善を認めた。



2) 外科切除標本の新鮮組織標本を用いた解析

解析に用いた 12 例の腫瘍組織のうち、KRAS codon 12 変異陽性は 10 例、codon 61 変異が 1 例、野生型が 1 例であった。KRAS 変異を有する 11 例の腫瘍からサンプリングした穿刺針検体を Water-burst 法で調製しデジタル PCR 解析を行った結果、全例で変異が確認された。また、この方法により検出された KRAS 変異のアレル頻度は、穿刺された腫瘍組織の病理学的に判定された

tumor cellularity とは関係なく、腫瘍細胞の存在率が 10%以下の low tumor cellularity と判定された豊富な間質を伴った 2 例においても検出可能であった。一方で、KRAS 野生型の 1 例 (P-NET) では、穿刺針検体から KRAS 変異は確認されなかった。

3) EUS-FNA の残存検体を用いた検討

次に、EUS-FNA により採取された残余組織及び生検針の洗浄液を用いた解析を行った。病理診断に用いられた FNA 検体よりゲノム DNA を精製しターゲットシーケンスを行った結果、浸潤性膵管癌 9 例において KRAS 変異が確認され、腺房細胞癌 1 例では KRAS 野生型であった。

浸潤性膵管癌 9 例より採取した FNA 余剰組織 8 検体、洗浄液 7 検体を遠心したペレットを Water-burst 法で調製し、デジタル PCR 解析を行った結果、KRAS 変異が確認された。KRAS 野生型の ACC は余剰組織、洗浄液いずれの検体も KRAS 変異陰性であった。また、浸潤性膵管癌 9 例より採取した FNA 余剰組織すべてにおいて、Water-burst 法に用いた沈殿物を回収する際の遠心上澄み液を DNA 精製して同様に解析した結果、同様に全例で KRAS 変異が確認された。

【考察】

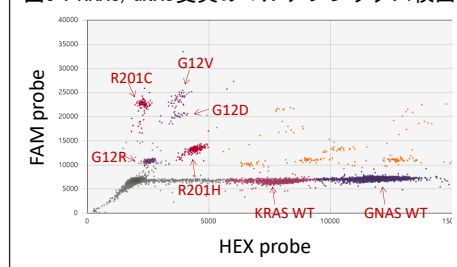
本研究は、膵癌の日常診療において経験する細胞診・組織診の検体不良という問題を解決すること、すなわち侵襲を経て採取された臨床検体を可能な限り有効に利活用する方法を探ることを出発点とした。今回、開発した技術の特徴は、腫瘍組織から得られた癌細胞をわずかでも含む微量検体を Water-burst 法によって細胞破壊し、癌細胞由来の遺伝子変異を高感度測定することを原理としている (Ono Y, Hayashi A, Sci Rep 2020 : 特願 2020-217083)。

当初、細胞診・組織診に提出される検体の中に、たとえ 1 個でも癌細胞が含まれていれば、その細胞を直接液滴に封入してデジタル PCR 解析することにより、細胞由来の遺伝子変異を捕捉できるのではないかと考えた。これが、Cell-in-drop 法の発想である。しかし、この方法ではウェルへの細胞分配と増幅効率がそれほど高くなかった。最近、他の研究グループから、血球細胞をこの方法により効果的に液滴封入し、その遺伝子発現を解析可能とする論文報告があった (Sato T, J Mol Diagn 2020)。このことから、本法は、癌腫によっては有効な方法と考えられる。さらに、細胞調製法を工夫することで、腺癌においても応用可能な技術として期待される。

膵癌細胞を用いた場合の液滴への直接封入の非効率さを補うため、破碎細胞をデジタル PCR 反応系へ持ち込む Water-burst 法が微量細胞の遺伝子異常検出をより確実にすることが、培養細胞を用いた実験結果により明らかとなった。さらに本法の有用性を外科切除生検体及び EUS-FNA の残余組織を用いてデジタル PCR 解析を行うことにより、KRAS 変異検出が高い確率で検出可能なが分かった。本法の利点として、核酸精製行程にかかるコストと時間を大幅に節約することがあげられる。検体量不足のため、病理診断困難な症例に対しても診断のための補足的な遺伝子情報を比較的簡便に得られると期待される。

研究代表者らは、先行する臨床研究「遊離核酸を用いた膵腫瘍の低侵襲診断 (UMIN00028284)」において、リキッドバイオプシーによる膵癌の新しい診断体系の構築に取り組んできた。本研究では、血漿中の遊離核酸 (cell-free DNA) を試料とし、所属する研究グループが過去に開発した pre-amplification によるデジタル PCR の改良法を用いて (Ono Y, Mol Oncol 2017)、KRAS 及び GNAS 変異の同時検出を試みた。その結果、Stage 0-I 膵癌において一定頻度で変異検出が可能なが確認できた (Okada T, J Gastroenterol 2020)。しかし、同変異の有無を確認できる一方で、複数存在する hotspot の特定までは困難であった。本研究においては、KRAS の代表的な hotspot 変異をカバーする検証済みの市販のスクリーニングキットを用いたが、やはり複数ある KRAS の変異タイプ (KRAS G12D, G12V, Q61H など) の特定には至らなかった。膵管内乳頭粘液性腫瘍関連の膵癌ではポリクローナルな病変がある場合もあり (林、肝胆膵 2019)、この点は大きな課題となる。また、KRAS 変異は浸潤に至る前駆病変の段階からみられるため、同変異の検出をもって膵癌と断定することは困難である。従って、TP53 や SMAD4 などの癌抑制遺伝子の異常を同時検出できるような解析技術の開発が求められる。このため、培養細胞や膵癌外科切除組織から抽出した DNA を用いて、マルチプレックス検出が技術的に可能なことをプレリミナリに確認している (図 3)。本法は、デジタル PCR 反応系の蛍光強度の 2D 空間情報を用いて同定する多重解析法であり、汎用されるデジタル PCR 装置でも十分実施可能である。スタンダードなデジタル PCR システムでは、FAM と HEX という 2 種類の蛍光を利用して変異及び野生型の DNA 検出を行うが、最新型のプラットフォームにより 4 カラーの多重蛍光を同時検出することが可能である。このような機種を用いた遺伝子検出法によって、複数の遺伝子異常、例えば KRAS に加え TP53 や SMAD4 の変異を同時検出することが原理的には可能である。今後、そのような新技術を早期に臨床応用するために、多数例を対象とした前向き臨床研究を行う必要がある。

図 3 : KRAS/GNAS変異のマルチプレックス検出



引用文献

Ono Y, Maeda C, Suzuki M, et al. Time-saving method for directly amplifying and capturing a minimal amount of pancreatic tumor-derived mutations from fine-needle aspirates using digital PCR. *Sci Rep* 10; 12332 (2020)

Sato T, Ito Y, Samura O, et al. Direct Assessment of single-cell DNA using crudely purified live cells: a proof of concept for noninvasive prenatal definitive diagnosis. *J Mol Diagn* 22; 132-140 (2020)

Ono Y, Sugitani A, Karasaki H, et al. An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving subsampling issues. *Mol Oncol* 11:1448-58 (2017)

Okada T, Mizukami Y, Ono Y, et al. Digital PCR-based plasma cell-free DNA mutation analysis for early-stage pancreatic tumor diagnosis and surveillance. *J Gastroenterol* 55; 1183-1193 (2020)

林 明宏、水上裕輔、佐藤裕基、ほか. IPMN のゲノム解析 : Recent advance in the clinical genetics of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *肝胆膵* 79(6):1125-1133 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ono Y, Hayashi A, Maeda C, Suzuki M, Wada R, Sato H, Kawabata H, Okada T, Goto T, Karasaki H, Mizukami Y, Okumura T	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） なし	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 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 Kawabata Hidemasa, Ono Yusuke, Tamamura Nobue, Oyama Kyohei, Ueda Jun, Sato Hiroki, Takahashi Kenji, Taniue Kenzui, Okada Tetsuhiro, Fujibayashi Syugo, Hayashi Akihiro, 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 岡田哲弘、水上裕輔、林 明宏、河端秀賢、佐藤裕基、河本 徹、後藤拓磨、谷上賢瑞、小野裕介、唐崎秀則、奥村利勝.	4. 巻 35
2. 論文標題 膵癌の初期発生とリキッドバイオプシーによる分子診断.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 膵臓	6. 最初と最後の頁 1245-1252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 明宏、水上裕輔、佐藤裕基、岡田哲弘、河端秀賢、後藤拓磨、唐崎秀則、奥村利勝
2. 発表標題 FNB微量検体を用いたデジタルPCRによる膵癌の新規診断技術の開発：Water-burst 遺伝子解析法
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋賢治、佐藤裕基、藤林周吾、林 明宏、河端秀賢、岩本英孝、後藤拓磨、山北圭介、北野陽平、水上裕輔、奥村利勝。
2. 発表標題 EUS-FNA検体と血清を用いた膵癌診断における長鎖ノンコーディングRNAの有用性。
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会 ワークショップ5 リキッドバイオプシー 内視鏡下採取検体による分子プロファイリング
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤裕基、岡田哲弘、河端秀賢、林明宏、藤林周吾、後藤拓磨、小野裕介、杉谷 歩、水上裕輔、藤谷幹浩、奥村利勝。
2. 発表標題 切除不能膵癌化学療法例において骨格筋量低下は予後不良因子である。
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会 「膵3」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 明宏、岡田哲弘、佐藤裕基、河端秀賢、後藤拓磨、小野裕介、唐崎秀則、水上裕輔、奥村利勝。
2. 発表標題 リキッドバイオプシーによる膵癌の術前診断。
3. 学会等名 第127回日本消化器病学会北海道支部例会シンポジウム：膵胆道癌克服に向けて 基礎研究と臨床のクロストーク S1-6
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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 旭川医科大学、札幌東徳洲会病院、Genomedia株
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〕

-

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
研究協力者	小野 裕介 (Ono Yusuke) (40742648)	札幌東徳洲会病院医学研究所・ゲノム診断研究部・部門長 (90101)	
連携研究者	水上 裕輔 (Mizukami Yusuke) (30400089)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	

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