

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08746

研究課題名（和文）新規ゲノム機能解析法による微小膵癌検出法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel method for detecting micro-pancreatic cancer using genome function analysis

研究代表者

袴田 健一（Hakamada, Kenichi）

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：30271802

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：難治がんである膵癌診断の信頼性を向上させ、適時に全身薬物治療を介入することを目的に、Liquid biopsyとしてのORNi-PCR法によるKRAS遺伝子変異検出法の開発ならびに血中遊離膵癌細胞の捕捉を企図した。結果、新規に開発したORNi-PCR法によるKRAS遺伝子変異検出法では従来法（ddPCR法）に比べて、Kras遺伝子変異検出率が飛躍的に向上した（47.1% vs. 0%）。この結果を受けて、膵癌切除組織でKras遺伝子変異を確認した上で、手術前後の血液検体を経時的に採取し、病勢とKras遺伝子変異検出との相関を確認する臨床研究を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌死亡率は2030年には世界・日本共にごん死因の第二位に位置すると推計され、膵癌の克服のために早期診断と治療効果評価のためのliquid biopsyの開発が急務である。本研究では、ORNi-PCR法によるKRAS遺伝子変異検出法を新規に開発し、従来法（ddPCR法）に比べて、KRAS遺伝子変異検出能の飛躍的な改善を確認した。本法は新たな微小膵癌の検出法としての意義に加え、軽微な侵襲で反復検査可能なことから、膵癌治療前後の病勢評価に有用と見込まれ、膵癌治療戦略上重要な役割を担うことが期待される。

研究成果の概要（英文）：To improve the reliability of pancreatic cancer diagnosis and timely intervention of systemic therapy, we attempted to develop a KRAS gene mutation detection method by ORNi-PCR as a liquid biopsy and to capture free pancreatic cancer cells in the blood. As a result, the detection rate of KRAS mutation by the newly developed ORNi-PCR method was dramatically improved (47.1% vs. 0%) compared to the conventional method (ddPCR method). Based on these results, a clinical study was initiated to confirm Kras gene mutation in pancreatic cancer resected tissue, and to collect blood samples before and after surgery over time to confirm the correlation between the disease status and the detection of Kras gene mutation.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 Kras遺伝子変異 Liquid biopsy

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌に対して根治が期待できる治療法は今なお外科切除であり、術前画像診断による切除可能性をもとに治療アルゴリズムが設定されている(図1. 膵癌治療アルゴリズム)。

しかし、切除可能な膵内小病変の根治切除後ですら術後早期に再発する例があり、このような例では無効な手術を回避するために、画像診断よりも精度の高い微小膵癌の検出法が求められている。

さらに、全身化学療法の進歩に伴い化学療法奏功後に画像判定上切除可能となり、切除(Conversion surgery)が再検討される症例が増加している。切除により長期予後が得られる症例がある一方で、切除を企図したものの結果的に切除不能状態となる症例や、切除後早期に再発する例も少なからず存在する。そのため化学療法奏功後の微小膵癌の存在を診断しうる新たな方法の開発が求められている。

現在、臨床現場では潜在性微小膵癌の存在を推定する方法として、血中 CA19-9 値が多用されている。しかし、施設毎に提唱される基準値は異なり、切除可能膵癌の再発リスク予測では 85~500 U/ml、切除可能境界膵癌や conversion surgery 検討例では 80~500 U/ml と多様な基準値が提唱されている。確かに CA19-9 は微小膵癌の存在や腫瘍悪性度を推定する一定の役割はあるものの、膵癌の治療戦略を構築する上では、微小膵癌の存在をより直接的に示す新たな検出法が必須である。

このように、微小膵癌の存在診断は現行の方法では不十分であり、全身に循環する膵癌細胞(circulatory tumor cells: CTCs)の検出や膵癌細胞由来の核酸等(cell-free tumor DNA; cfDNA, microRNA, exosomes)での評価、いわゆる liquid biopsy の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、新規ゲノム開発法を駆使した「微小転移検出開発」であり、当初は Kras 遺伝子変異の新規検出法の開発と、遊離膵癌細胞の検出による Kras 遺伝子変異診断の2つのテーマを予定したが、研究の進捗の中で、前者の有用性が明らかになり、かつ臨床試験への発展が可能であったため Kras 遺伝子変異の新規検出法の開発と、新規に開発した検出法を用いて切除可能膵癌の切除標本の Kras 遺伝子変異と術前後で血清 Kras 遺伝子変異検出を経時的評価を行い、Liquid biopsy としての有用性を評価することとした。

## 3. 研究の方法

### 1) Kras 遺伝子変異検出法の確立

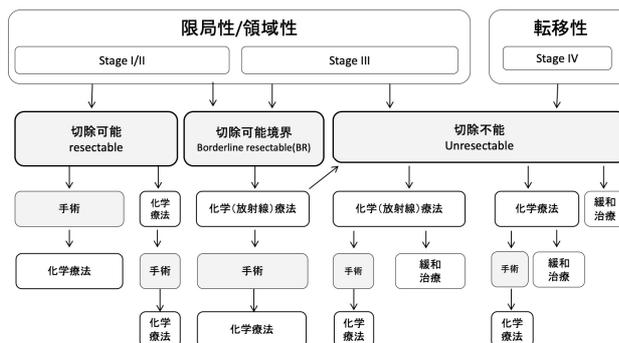
Kras 遺伝子変異の検出については、KRAS G12D に加え KRAS G12C、KRAS G12V について cfDNA 濃度を調整してサンプル検体を作成し、複数の増幅検査法で検出感度の検証を実施したのち、血漿中 cfDNA 濃度を調整して PCR 測定の指摘条件を検証した。

さらに、ORNi-PCR を介して現行の検出感度・精度向上の可否を検証した。

### 2) 膵癌患者における KRAS 遺伝子変異検出法の確立

切除可能および切除可能境界膵癌膵癌患者 30 例を対象とし、患者の血液検体から cfDNA を抽出、ORNi PCR 併用群と ddPCR 単独で KRAS 変異の検出率の差を比較。併せて、膵癌術後の切除検体からも同様に Kras 遺伝子変異およびサブタイプ解析を実施。主要評価項目は KRAS 変異の検出感度、副次的評価項目は Kras 遺伝子変異検出と病勢進行との関連

図1. 膵癌治療アルゴリズム



性を検証した。

#### 4. 研究成果

##### 1) *Kras* 遺伝子変異検出法の確立

テストサンプルによる至適条件確立ののち、膵癌患者血漿サンプルを用いて条件調整を行い、最終的に、ORNi-PCR を併用した ddPCR による *Kras* 遺伝子変異の至適検出法を確立した（論文投稿前）。これを元に膵癌切除標本で *Kras* 遺伝子変異を確認した患者の血漿中 *Kras* 遺伝子変異の検出率は、47.1%であり、一方、従来法である ddPCR 単独では切除例で 0%、非切除となった BR 膵癌を含む全例で 11.1%であり、検出率の顕著な向上が確認された。

##### 2) 膵癌患者における *KRAS* 遺伝子変異検出法の確立

切除可能膵癌 30 例について、術前採血と手術を修了。膵組織中の *Kras* 遺伝子変異は 94.4%であり、既報と同程度であった。2 年間の追跡を予定し、すでに 30 例の症例集積を行い、現在追跡研究中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kanda T, Wakiya T, Ishido K, Kimura N, Fujita H, Yoshizawa T, Goto S, Tatara Y, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 57
2. 論文標題 Heterogeneity of metabolic adaptive capacity affects the prognosis among pancreatic ductal adenocarcinomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 798-811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-022-01898-0	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 Goto S, Yoshizawa T, Ishido K, Seino H, Morohashi S, Ogasawara H, Kubota S, Ogasawara K, Nakamura A, Hakamada K, Kijima H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Use of time density curves of dynamic contrast enhanced computed tomography for determination of the histological therapeutic effects of neoadjuvant chemotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2023.8498	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 Pan X, Mizukami H, Hara Y, Yamada T, Yamazaki K, Kudoh K, Takeuchi Y, Sasaki T, Kushibiki H, Igawa A, Hakamada K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Diabetes mellitus impacts on expression of DNA mismatch repair protein PMS2 and tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 132-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13929	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 Uchida C, Mizukami H, Hara Y, Saito T, Umetsu S, Igawa A, Osonoi S, Kudoh K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yagihashi S, Hakamada K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Diabetes in Humans Activates Pancreatic Stellate Cells via RAGE in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 11716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222111716.	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 Wakiya T, Ishido K, Kimura N, Nagase H, Kubota S, Fujita H, Hagiwara Y, Kanda T, Matsuzaka M, Sasaki Y, Hakamada K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Prediction of massive bleeding in pancreatic surgery based on preoperative patient characteristics using a decision tree.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0259682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259682.	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 Wakiya T, Ishido K, Kimura N, Nagase H, Yoshizawa T, Morohashi S, Fujita H, Kanda T, Tatara Y, Saruwatari J, Kijima H, Hakamada K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Eukaryotic initiation factor 2 signaling behind neural invasion linked with lymphatic and vascular invasion in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00727-3.	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 Ishido K, Kimura N, Wakiya T, Nagase H, Hara Y, Kanda T, Fujita H, Hakamada K.	4. 巻 29
2. 論文標題 Development of a Biomarker-Based Scoring System Predicting Early Recurrence of Resectable Pancreatic Duct Adenocarcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 1281-1293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-10866-6.	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 神田大周、脇屋太一、石戸圭之輔、木村憲央、長瀬勇人、桑田大輔、市澤愛郁、千田航平、藤田博陽、袴田健一
2. 発表標題 CA19-9高値膵癌の悪性度に関する分子機構の解明
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原裕太郎、水上浩哉、工藤和洋、木村憲央、石戸圭之輔、袴田健一
2. 発表標題 膵星幹細胞に着目した革新的間質細胞治療の開発
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanda T, Wakiya T, Ishido K, Kimura N, Nagase H, Suto A, Fujita H, Saegusa Y, Tatara Y, Yoshizawa T, Goto S, Kijima H, Hakamada K
2. 発表標題 Enhancement of glycolytic system is associated with the malignant potential of PDAC with high CA19-9 levels
3. 学会等名 第26回国際膵臓学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hara Y, Mizukami H, Yamada T, Yamazaki K, Kimura N, Ishido K, Hakamada K
2. 発表標題 Single cell rna sequencing reveals heterogeneity and rare population of PDAC with high CA19-9 level
3. 学会等名 第26回国際膵臓学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田大周、脇屋太一、石戸圭之輔、木村憲央、長瀬勇人、桑田大輔、藤田博陽、須藤亜希子、市澤愛郁、袴田健一
2. 発表標題 CA19-9高値膵癌の悪性度に与える分子機構の解明（続報）
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 裕太郎、水上 浩哉、竹内 祐貴、木村 憲央、石戸圭之輔、袴田 健一
2. 発表標題 膵癌の予後を決める E-cadherin は CDH1 メチル化と miR-100-5p により制御される
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石戸圭之輔、木村 憲央、脇屋 太一、長瀬 勇人、袴田 健一
2. 発表標題 切除不能局所進行膵癌に対する conversion surgery のベストタイミング
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田 大周、脇屋 太一、石戸圭之輔、木村 憲央、長瀬 勇人、内田 知顕、藤田 博陽、山本 健、松本駿太郎、袴田 健一
2. 発表標題 解糖系の亢進が C A 1 9 - 9 高値膵癌の悪性度に関与する
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ishido K, Kimura N, Nagase H, Wakasa Y, Hakamada K
2. 発表標題 Novel surgical challenges for unresectable pancreatic cancer
3. 学会等名 第35回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tamba H, Kimura N, Ishido K, Nagase H, Wakasa Y, Hakamada K
2. 発表標題 A case of pathological complete response with FOLFIRINOX in unresectable pancreatic cancer with multiple liver metastases
3. 学会等名 第35回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nagase H, Ishido K, Kimura N, Wakasa Y, Yamamoto T, Matsumoto S, Hakamada K
2. 発表標題 The clinicopathological features of the Stage I pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 第35回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田 博陽、藤田 敏次、石戸圭之輔、木村 憲央、長瀬 勇人、袴田 健一、藤井 穂高
2. 発表標題 ORNi-PCR法を応用した膵癌患者血漿中KRAS遺伝子変異高感度検出法の確立
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎 慶介、水上 浩哉、竹内 祐貴、山田 貴大、工藤 和洋、袴田 健一
2. 発表標題 浸潤性膵管癌における2型糖尿病長期罹患とDNMT1発現との関連
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石戸圭之輔、木村 憲央、長瀬 勇人、若狭 悠介、袴田 健一
2. 発表標題 局所進行切除不能膀胱癌における有効なconversion surgeryの条件検討
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023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	石戸 圭之輔  (Ishido Keinosuke)  (00436023)	弘前大学・医学研究科・准教授   (11101)	
研究分担者	三浦 卓也  (Miura Takuya)  (30722136)	弘前大学・医学部附属病院・講師   (11101)	
研究分担者	脇屋 太一  (Wakiya Taiichi)  (50571246)	弘前大学・医学研究科・客員研究員   (11101)	
研究分担者	木村 憲央  (Kimura Norihisa)  (60436029)	弘前大学・医学研究科・講師   (11101)	

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