

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16010

研究課題名（和文）微量残余検体中のゲノム異常を高感度検出するオンサイトがん診断の検討

研究課題名（英文）On-site cancer diagnosis by high-sensitivity detection of genomic abnormalities in residual tumor samples

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵腫瘍の確定診断における組織診では検体不適正と判定される場合が多く、その原因は、採取可能な検体量が少ないことに起因する。このような課題を克服するため、本研究では、微量核酸の絶対定量に威力を発揮するデジタルPCRを用いて、少量の細胞・組織検体でもドライバー遺伝子変異を迅速かつ確実に検出する系の構築を目指した。KRAS変異をはじめとする遺伝子異常の絶対定量する系をマルチプレックス化することで、1ng以下の微量核酸においてもKRAS及びGNAS変異の同時検出と変異タイプの特定が可能なことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の遺伝子異常を同時検出できれば形態学に基づく画像・病理診断を補填し、がん診療に大きく貢献できる。試料採取現場で実施可能なオンサイト検査法とするには、turn around timeを含む課題があるため、今後は反応系の高速化を検討している。

研究成果の概要（英文）：In the definitive diagnosis of pancreatic tumors, histopathological evaluations often deem samples inadequate, typically due to the limited amount of tissue that can be collected. To overcome this challenge, this study employed digital PCR, which excels in the absolute quantification of minute quantities of nucleic acids, aiming to construct a system for the rapid and reliable detection of driver gene mutations in small cell and tissue samples. By multiplexing the system for absolute quantification of genetic abnormalities, including KRAS mutations, we confirmed that it is possible to simultaneously detect KRAS and GNAS mutations and identify the mutation types in less than 1ng of nucleic acids.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵癌 低侵襲診断

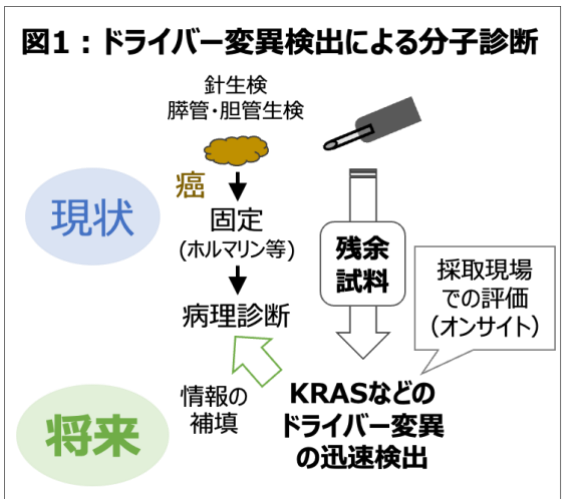
1. 研究開始当初の背景

細胞診や組織診は日常のがん診療に欠かせない検査手段である。最近では形態診断のみならず、遺伝子異常やバイオマーカーを測定するリソースともなり、「侵襲」の対価を得るため検体を最大限に活用することが倫理的に求められている。膵胆道系腫瘍も発生の初期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、これらの情報は診断の確定や腫瘍の生物学的な悪性度を評価するうえで客観的な指標となる。しかし、保険診療で行われる包括的がんゲノムプロファイリング検査では、一定量の腫瘍由来の高純度核酸が求められるため、より多くの組織採取が必要となり侵襲性が大きくなることが懸念される。さらに、再生検を求められる場合も多く、「侵襲」の対価となる診断情報を確実に確保するための核酸検出技術の改良が求められる。

遺伝子工学の進歩により、ゲノム異常の検出感度は「単一細胞レベル」まで高まっている。このような先進技術は基礎研究での活用のみならず、解析に要するコストと時間の工夫次第では試料採取現場で実施可能なオンサイト検査法となり得る（図1）。

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）の効果を最大限に発揮しつつ、ゲノム・分子の情報を早期に実診療に取り入れる必要がある。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で認められているが、この流れをがん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が求められる。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。これらの解析技術が実臨床を支える場面が増えているが、多くの場合、煩雑で時間とコストがかかり、日常診療における汎用には数多くのハードルが存在する。

研究代表者らは第三世代 PCR と呼ばれるデジタル PCR（以下、dPCR）を用い、生検針の洗浄液などの超微量検体を用いて核酸精製をスキップし、KRAS 変異の有無を評価する「Water-burst 法」を開発した（Sci Rep 2020；特願 2020-217083）。しかし現状では、KRAS 変異という単一のドライバー変異解析に留まり、さらに変異タイプの特定には至らないという課題があった。また、特に微量検体の場合に、複数遺伝子の異常を同時検出する検査技術は確立されていなかった。



2. 研究の目的

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。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。

本研究では、高感度な dPCR 解析技術を用いて、細胞診や細胞生検などの微量な残余検体を試料とし、複数のドライバー変異の同時検出とバリエーション特定が可能な核酸検出技術を構築する。この技術を試料採取する現場で判定するオンサイト検査への導入基盤として確立する。

3. 研究の方法

実験1：マルチプレックス dPCR の条件検討

dPCR では、通常は一つの遺伝子の特定の hotspot 変異に対する特異的プローブを変異検出に用いる。このため複数の遺伝子変異を同時検出し、理想的にはバリエーションも特定できる系が望ましい。しかし、微量なサンプルを遺伝子や各変異のタイプに分配するとサブサンプリングによる検出能の低下が危惧される。膵癌の前駆病変で高頻度に変異が観察される、KRAS および GNAS 遺伝子のなかから、膵腫瘍において高頻度に認められる hotspot 変異に対する特異的 primer/probe セットを合成した。変異検出の特異性を担保するために、probe には架橋型人工核酸 LNA 塩基を組み込んだ。また、複数の high-fidelity polymerase を用いて、各遺伝子の hotspot 領域の特異的増幅能を比較した。

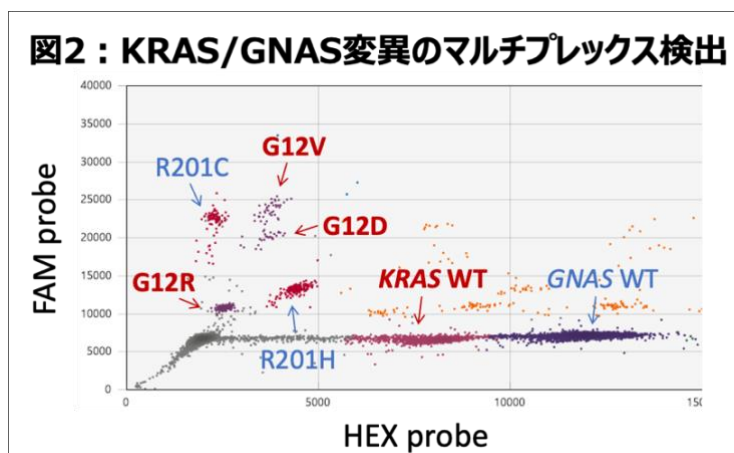
培養細胞および膵腫瘍の外科切除組織（FFPE）からゲノム DNA を抽出し、マルチプレックス検出が可能な primer/probe セットを選別し、その混合比を調整することで検出感度、ならびに各遺伝子変異の判別における特異性が保たれるか否かを検証した。

実験 2：臨床検体を用いた検証

実験 1 で最適化した条件を基に、膵胆道悪性腫瘍患者（疑診例を含む）の臨床検体を用いた検証を行った。変異型 KRAS および GNAS のうち頻度の高い 10 種類の hotspot 変異に対する検出能を検証するため、ターゲットシーケンスにより得られた結果と対比した。

4. 研究成果

はじめに、最小限の DNA サンプルから KRAS および GNAS 遺伝子の特定の変異を同定するための dPCR ベースのアッセイを用いた多重プローブ法を開発した。KRAS のコドン 12 と GNAS のコドン 201 で一般的な変異を標的とし、LNA プローブを使用して変異の特定を試みた。プローブの濃度を個々の変異に最適化することで、2D 蛍光プロット上での明瞭なクラスター形成が確保され、変異と野生型アレルを効果的に区別することが可能であることを確認した（図 2）。培養細胞株由来のゲノム DNA を用いた検証では 1-10ng 程度の微量な核酸により、変異型と野生型のシグナルが混在するクラスターの発生を減少させることが確認され、変異タイプ同定の際の特異度の担保が可能であった。



次に、超音波内視鏡下針生検（EUS-FNA/B）の病理検体（FFPE）から抽出したゲノム DNA を用いて本アッセイを評価した。マルチプレックス解析の際に、変異型と野生型のシグナル混在による定量性への悪影響が危惧されたため、テンプレートとなる DNA 量を異なる条件下でテストした結果、特に 1ng の DNA を処理したサンプルで、ターゲットシーケンシングにより得られた結果と高い一致性を示した。逆に核酸量が過剰になる場合に、hotspot 変異検出の特異度およびバリエーションアレル頻度の計算に誤差が生じやすい問題が生じた。

最後に、上記の primer/probe セットをベースに、6 種類の蛍光検出が可能な新しい ddPCR プラットフォーム（QX600 Droplet Digital PCR システム：Bio-Rad 社製）に対応させるための設計変更を行い、一反応で変異種の特異をより高解像に検出する検出系を完成させた（論文投稿準備中）。

以上のアプローチにより、非常に少量の DNA を含む臨床サンプルにおいても、変異の正確な検出と定量が可能となり、本法は膵癌における重要な変異を特定するための検出技術として大いに期待できる。今後、膵胆道癌を始めとする消化器癌、さらに各臓器の発生に重要なドライバー変異を簡便に定量する検出系により、日常の診断や治療方針の決定において有益な情報取得ができる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Maeda Chiho, Ono Yusuke, Hayashi Akihiro, Takahashi Kenji, Taniue Kenzui, Kakisaka Rika, Mori Miyuki, Ishii Takahiro, Sato Hiroki, Okada Tetsuhiro, Kawabata Hidemasa, Goto Takuma, Tamamura Nobue, Omori Yuko, Takahashi Kuniyuki, Katanuma Akio, Karasaki Hidenori, Liss Andrew Scott, Mizukami Yusuke	4. 巻 99
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 99-99
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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小山一也、高橋賢治、藤林周吾、林 明宏、河端秀賢、岩本英孝、後藤拓磨、北野陽平、藤谷幹浩、水上裕輔、奥村利勝.
2. 発表標題 細胞外小胞によるmiR-425の細胞間伝達は上皮間葉形質転換を促進し膵癌進展を制御する
3. 学会等名 第30回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidemasa Kawabata, Yusuke Ono, Nobue Tamamura, Hiroki Sato, Kenji Takahashi, Kenzui Taniue, Tetsuhiro Okada, Syugo Fujibayashi, Akihiro Hayashi, Takuma Goto, Hiroaki Konishi, Mikihiro Fujiya, Hidenori Karasaki, Andrew S. Liss, Yusuke Mizukami, Toshikatsu Okumura.
2. 発表標題 Tumor-suppressive effect of mutant GNAS through the restriction of tumor aggressiveness in established pancreatic cancer.
3. 学会等名 DDW2022/AGA2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Takahashi, Hiroki Sato, Shugo Fujibayashi, Akihiro Hayashi, Hidemasa Kawabata, Hidetaka Iwamoto, Takuma Goto, Yohei Kitano, Yusuke Mizukami, Toshikatsu Okumura
2. 発表標題 The application of EV RNA panel as liquid biopsy for pancreatic ductal adenocarcinoma.
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 Yusuke Ono, Kenji Takahashi, Akihiro Hayashi, Toru Kawamoto, Tetsuhiro Okada, Keisuke Kimura, Nobuyuki Yanagawa, Hirotoishi Iwano, Kuniyuki 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 第26回国際膵臓学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidemasa Kawabata, Yusuke Ono, Hiroki Sato, Kenji Takahashi, Tetsuhiro Okada, Syugo Fujibayashi, Akihiro Hayashi, Takuma Goto, Mikihiro Fujiya, Yusuke Mizukami, Toshikitsu Okumura.
2. 発表標題 Mutant GNAS limits tumor aggressiveness in established pancreatic cancer via antagonizing the KRAS-pathway.
3. 学会等名 第26回国際膵臓学会（国際学会）
4. 発表年 2022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

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