

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	Akihiro HAYASHI (林 明宏)
学位論文題目			
Time-saving method for directly amplifying and capturing a minimal amount of pancreatic tumor-derived mutations from fine-needle aspirates using digital PCR (微量組織検体中の体細胞変異の検出を可能にする迅速デジタルPCR解析法の開発)			
共著者名			
Ono Y, Maeda C, Suzuki M, Wada R, Sato H, Kawabata H, Okada T, Goto T, Karasaki H, Mizukami Y, Okumura T.			
Sci Rep 10; 12332, 2020 (2020年7月25日 Epub) doi.org/10.1038/s41598-020-69221-6			
研究目的			
<p>膵腫瘍の存在診断には各種画像検査により直接所見である腫瘤像を捉え、超音波内視鏡下穿刺生検や内視鏡的逆行性膵胆管造影検査による膵管・胆管生検により診断を確定する。しかしながら、得られた生検組織が微量な場合など正確な病理診断が困難な例も存在し、確定診断のため追加の組織採取が必要となることもある。また、がんゲノム医療の到来を迎え、病理形態学的な情報のみならずゲノム情報を得るために、より多くの組織採取が求められる時代となっている。これら組織採取の必要性は、侵襲性とトレードオフの関係にあり、細胞・組織診の不確実性を補う技術開発により、低侵襲かつ客観的判定が可能な診断システムの構築が望まれる。</p> <p>膵癌では多くの場合、<i>KRAS</i>の点突然変異を伴い前駆病変が発生し、<i>CDKN2A</i>、<i>TP53</i>や<i>SMAD4</i>などの癌抑制遺伝子の不活化を経て、浸潤癌へ進展する(引用文献1)。従って、これらの遺伝子異常を的確かつ低侵襲に捉えることができれば、内視鏡診断の確実性を高めることができると期待される。例えば、内視鏡により採取され、病理・形態学的に癌の判定が困難であった組織・細胞検体においても、上記の遺伝子異常を検出することで、癌の存在を予測するに十分な情報が得られた例を経験している(参考文献2,3)。すなわち、検体不足のため正確な病理診断が困難な場合においても、高感度な遺伝子解析技術を駆使することにより、一定の侵襲を経て採取された貴重な生体試料を有効活用することが可能となる。</p> <p>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<i>KRAS</i>変異を検出できれば、病理診断を補足する第一歩となる(引用文献2)。</p> <p>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、digital PCR (dPCR)の基本技術を応用して腫瘍由来の<i>KRAS</i>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。</p>			

材 料 ・ 方 法

1) 培養細胞を用いた条件検討

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法と名付けた)。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法と名付けた)。*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 (ddPCR) 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

2017年から2019年に札幌東徳洲会病院で外科切除された膵腫瘍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 (ACC) ; 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 $^{\circ}$ C)。その懸濁液をwater-burst法によりdPCR解析するため、1,000 xg 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

2019年に旭川医科大学病院で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ゲージのフランシーン生検針 (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1,000 xg 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。

成 績

1) 培養細胞による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dPCR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。

一方、water-burst法で調製した試料において、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、検出効率の劇的な改善を認めた。

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*変異のレベル頻度は、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 (FFPE) 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、dPCR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、全例において*KRAS*変異が確認された。

考 案

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活用する方法を探ることを出発点とした。今回、我々が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。デジタルPCRはテンプレートを微細なウェルに分配しPCRを行うことで反応の有無の割合を測定し、核酸の絶対定量を可能にする新しい技術である。リアルタイムPCRのように標準曲線の作成や相対比較が必要なく、検出感度は1,000倍以上と飛躍的に高まった。分配方法として、マイクロチップや流路系を用いた技術があるが、今回我々は作業行程のカスタマイズが比較的容易で、スループットに優れる油滴を利用したdroplet技術を使ったdPCRシステムを使用した。

当初、我々は細胞診・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dPCR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 (引用論文3)。このことから、本法は、癌腫によっては有効な方法となり得ると考えられる。さらに、細胞調製に工夫を加えることにより、膵癌をはじめとする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dPCR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dPCR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ことが分かった。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。

本研究では、*KRAS*の代表的なhot spot変異をカバーする検証済みのスクリーニングキット (市販品) を用いて解析を行ったが、この系では複数ある*KRAS*の変異タイプ (*KRAS* G12D, G12V, Q61Hなど) の特定には至らない。膵癌のゲノムレベルでの多様性を考えた場合、この点は大きな課題となる。また、*KRAS*変異は膵癌の前駆病変の発生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（参考論文3）。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。我々は主要な*KRAS*及び他の遺伝子の変異を、dPCR反応系の蛍光強度の2D空間情報を用いて同定する新しい多重解析法を開発を進めている（論文投稿準備中）。さらに、スタンダードなddPCR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となった。このようなツール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可能となり、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（参考論文1, 4, 5）。

結 論

微小検体あるいは病理診断の残余検体を用いて、高感度に*KRAS*変異を検出することができる検出技術を開発した。今回、我々が開発したwater-burst法により、微小検体から腫瘍細胞由来のゲノム情報を取得し、病理診断の補足が可能となる。

引 用 文 献

- 1) Patra KC, Bardeesy N, Mizukami Y. Diversity of precursor lesions for pancreatic cancer: the genetics and biology of intraductal papillary mucinous neoplasm. *Clin Transl Gastroenterol* 8; e86 (2107)
- 2) Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic *KRAS* in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17; 153-168 (2020)
- 3) 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)

参 考 論 文

- 1) 林 明宏、水上裕輔、佐藤裕基、河端秀賢、岡田哲弘、後藤拓磨、河本 徹、小野裕介、唐崎秀則、奥村利勝. 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)
- 2) Kawabata H, Miyazawa Y, Sato H, Okada T, Hayashi A, Iwama T, Fujibayashi S, Goto T, Sasajima J, Takauji S, Fujiya M, Torimoto Y, Tanino M, Omori Y, Ono Y, Karasaki H, Mizukami Y, Okumura Y. Genetic analysis of postoperatively recurred pancreatic ductal carcinoma that potentially arose owing to needle tract seeding during endoscopic ultrasound-fine needle biopsy. *Endosc Int Open* 12: E1768-E1772 (2019)
- 3) Okada T, Iwano H, Ono Y, Karasaki H, Sato T, Yamada M, Omori Y, Sato H, Hayashi A, Kawabata H, Goto T, Sasajima J, Takauji S, Nagashima K, Mizukami Y, Okumura T. Utility of “liquid biopsy” using pancreatic juice for early detection of pancreatic cancer. *Endosc Int Open* 6:E1-E8 (2018)
- 4) 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. 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. *膵臓* 35:302-312 (2020)
- 5) Okada T, Mizukami Y, Ono Y, Sato H, Hayashi A, Kawabata H, Koizumi K, Masuda S, Teshima S, Takahashi K, Katanuma A, Omori Y, Iwano H, Yamada M, Yokochi T, Asahara S, Kawakubo K, Kuwatani M, Sakamoto N, Enomoto K, Goto T, Sasajima J, Fujiya M, Ueda J, Matsumoto S, Taniue K, Sugitani A, Karasaki H, Okumura T. Digital PCR-based plasma cell-free DNA mutation analysis for early-stage pancreatic tumor diagnosis and surveillance. *J Gastroenterol* 55; 1183-1193 (2020)