

# 主 論 文

## Utility of serum DNA as a marker for KRAS mutations in pancreatic cancer tissue (膵臓癌組織中の KRAS 変異探索における血清 DNA の有用性)

### [諸言]

膵癌における癌診療は日々進歩しているが、未だに予後不良な疾患であり癌死亡のうち男性では 8 位に女性では 9 位に位置する。膵癌の形成には KRAS、p16、p53、DPC4 など様々な遺伝子変異が関与しているが、その中で KRAS は PanIN の段階で変異を来し 75-90% と高頻度に変異を認める。そのため、KRAS を標的とした治療方法やバイオマーカーが探索されてきたが、確立するには至っていない。膵癌組織中の KRAS 変異を解析するためには組織の採取が必須であった。しかし、膵癌組織の採取は侵襲性が高いことや、腫瘍内の分子的不均一性を評価することができないなどの問題がある。

一方で血液や尿などの体液中の癌由来遊離 DNA を検出するリキッドバイオプシーの技術が発展してきている。癌由来遊離 DNA は腫瘍内の細胞増殖が最も盛んな部位から放出されることが考えられ、腫瘍内の最も悪性の高い部位を評価可能である。また、組織採取に比し検体採取の侵襲性が非常に低い。一般的に検体として血液を用いる場合には血漿が使用されているが、血清を使用した報告はほとんどない。理由の一つとして、血清では分離過程において血液凝固が必要であり、その際に破壊された血球から流出する DNA が多く含まれ検出感度が低下する原因となる可能性があるためである。しかしながら、我々は以前に進行膵癌での血清中 KRAS 変異を解析し 62.5% の症例で検出可能であったことを報告している。

今回、我々は同一膵癌患者より採取した血清・血漿からドロップレットデジタル PCR を用いて KRAS 変異を検出し、その検出感度を直接比較することでリキッドバイオプシーに最適な血液検体を探索した。

### [材料と方法]

#### 対象患者

2013 年 9 月から 2016 年 2 月にかけて当院にて病理学的に膵癌と診断された患者を対象とした。当院倫理委員会の承認を得た上で対象者にはインフォームドコンセント後に同意を取得した。40 人の膵癌患者より検体を採取し、また 10 人の健常人からもコントロールとして検体を採取した。

#### DNA 抽出

対象患者全員より組織・血清・血漿を採取した。組織については 16 症例が手術により切除された膵癌組織のパラフィン包埋切片を使用し、24 症例では診断目的で行われた超音波内視鏡下針生検組織を使用した。それぞれは QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いて DNA $50\mu\text{l}$  を抽出した。血清・血漿は各 1ml より QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) を使用し DNA $50\mu\text{l}$  を抽出した。抽出した DNA はドロップレットデジタル PCR を行うまで-30 度で保管した。健常人 10 名からも血清・血漿を各 1ml 採取し同様の方法で DNA $50\mu\text{l}$  を抽出した。すべての DNA は Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて DNA 量を測定した。

#### ドロップレットデジタル PCR

QX200 droplet digital PCR system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた。KRAS 変異 G12D、G12V、G12R のそれぞれに対応するプローブを使用した。ドロップレットデジタル PCR には抽出した DNA $5\mu\text{l}$ 、Droplet PCR Supermix (Bio-Rad Laboratories) を  $10\mu\text{l}$ 、プライマー $2\mu\text{l}$ 、そして  $5\mu\text{L}$  の DNase-and RNase-free water を加え合計  $22\mu\text{L}$  の混合液を作成した。そして、 $70\mu\text{L}$  の Droplet generator oil (Bio-Rad Laboratories) を用いてドロップレットを作成した後に PCR を行った。PCR は 95 度 10 分間で DNA ポリメラーゼを活性化した後、94 度 30 秒間

に続き 60 度 1 分間のサイクルを 40 サイクル行った。PCR 終了後に 98 度 10 分間で DNA ポリメラーゼの不活化を行った。完了した反応液は蛍光強度を測定した。

### データ解析

PCR 後の反応液は Quanta software program, version 1.4.0 (Bio-Rad Laboratories) を用いて蛍光強度を測定した。今回の研究では各ドロップレットの蛍光強度は野生型変異型とともに 2000 以上を陽性と定義した。検出頻度の解析にはポアソン分布を使用した。

### 統計解析

全生存期間は診断日から死亡日までもしくは最終診察日までとした。また、全生存期間の比較はカプランマイヤー曲線・ログランク検定により評価した。P 値は 0.05 未満を有意な差と定めた。これらすべての解析には JMP ソフトウェア ver 11.0 (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。

## [結果]

### 患者背景

年齢中央値は 71 歳 (49-92 歳)、26 症例が男性であった。腫瘍径は中央値 30mm (14-69mm)、UICC Stage は Stage I:2 症例 (5%)、Stage II:21 症例 (52%)、Stage III:11 症例 (28%)、Stage IV:11 症例 (28%) であった。観察期間中央値は 7.8 ヶ月 (0.3-30.2 ヶ月) であった。

### 血清・血漿での DNA 量

膵癌患者・健常人での血漿中 DNA 量はそれぞれ 17.9ng/ml・10.7ng/ml であり膵癌患者の血漿に有意に多い DNA が含まれていた ( $P < 0.01$ )。膵癌患者の病期での比較では Stage I/II 患者は 15 ng/ml に対し、Stage III/IV 患者は 22.6ng/ml とやや高かったが有意な差ではなかった ( $P=0.27$ )。一方、血清では膵癌患者が 129ng/ml、健常人が 110ng/ml であり有意な差はなかった ( $P=0.73$ )。血清中 DNA 量は血漿中に比し膵癌患者・健常者で血漿中の 7.2 倍、10.3 倍の量であった。

### ドロップレットデジタル PCR におけるカットオフ値設定

我々は 10 名の健常者より採取した血清・血漿中の KRAS 変異の有無を解析した。このうち、血清 1 サンプルにて G12D を認めた。変異型ドロップレット 1 個に対し野生型ドロップレットが 3807 個であり、ポアソン分布を用いると 0.0222% の頻度であった。このドロップレットを偽陽性と判断し 0.022% 以上の頻度で変異型ドロップレットを認めた場合を変異ありと定義した。

### KRAS 変異の頻度

膵癌組織内での KRAS 変異は G12D/G12V/G12R のそれぞれ 29 症例 (73%) / 17 症例 (43%) / 9 症例 (23%) であり合計では 37 症例 (93%) が KRAS 変異を有していた。血清・血漿では KRAS の変異検出頻度は共に 19 症例 (48%) であった。G12D が最も頻度が高く、血清で 16 症例 (40%)、血漿では 15 症例 (38%) であった。次に G12V が高く血清・血漿でそれぞれ 4 症例 (10%)・血漿 5 症例 (13%) であった。G12R は血清血漿ともに検出しなかった。また、病期による KRAS 変異の検出感度に差は認めなかった。

### 全生存期間への KRAS 変異の寄与

観察期間内に 12 症例 (30%) が膵癌により死亡した。組織内の KRAS 変異の有無は全生存期間に寄与しなかった。血清・血漿では G12D の有無は全生存期間に寄与しなかったが、G12V を有している症例は有意に全生存期間が短い結果であった ( $p < 0.01$ )。また、血漿中に G12V を有していた 4 症例は血清中にも G12V を有していた。

### [考察]

我々は膵癌患者における血液中 KRAS 変異の検出の検体として血清・血漿とともに有用であることを証明した。今回の研究では血清は血漿に比し 7.2 倍の DNA 量を有していた。これは分離過程の違

いであり、血清では血液凝固が必要でありその間に血球破壊が起こり血球内の DNA が流出するためである。現在までの報告でも血清 DNA 量は血漿の 4-24 倍と報告されており、今回の結果に合致する。従来の Direct sequencing や RT-PCR ではこの血球細胞由来の変異のない DNA の影響により癌特異的な変異の頻度が低下し検出を困難としている。しかし、今回の研究ではドロップレットデジタル PCR は感度が高く、血漿と同様に血清も癌由来 DNA の探索に有用であることを示した。我々は以前に血清中の KRAS 変異の存在は全生存期間の予測に有用であることを報告している。今回の研究でも血清だけでなく血漿中の KRAS 変異 G12V が予後予測の有用な因子であった。一方で、最も頻度の高い変異である G12D は予後との関連はなかった。しかし、約 40% の患者に認める変異であり治療効果の評価に期待できる可能性がある。

この研究患者の約半数が StageI もしくは II の比較的早期の膵癌患者であったにも関わらず、StageI/II の患者と StageIII/IV の患者で KRAS 変異の検出率はほぼ同等であり、早期の癌であっても血液検体より遺伝子変異の検索が可能であることを示している。

ドロップレットデジタル PCR の検出感度は 0.01% と言われており、これは血液中の癌由来 DNA の検出に十分な感度であり、血清と血漿のどちらを検体として使用しても有意な差はないことがわかった。

### [結論]

血清と血漿は KRAS 変異を検出感度はほぼ同等であり、共に膵癌の予後予測因子として有用であった。