Pre-Amplificationによるサブサンプリング問題を克服した膵がん、大腸がんにおけるQX Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)による極少*KRAS*変異検出法の開発

Key words :膵がん, 大腸がん, liquid biopsy, 低頻度変異解析, サブサンプリング問題, Pre-Amplification

Research Background

近年、リキッドバイオプシーを用いたcell free DNA（cfDNA）によるがんの効果的な診断方法の確立への取り組みが進みつつあります。その中で、これまでcfDNAシーケンシングよりもより精確で、信頼性が高く、より短時間に労力を必要とせず、コスト効果的な検出方法としてドロップレットデジタルPCR（ddPCR）が非常に注目を集めています。このようなddPCRを用いた点変異検出の検出下限感度は0.01-0.05%とも言われており、ddPCRの持つポテンシャルを活かして、血漿サンプルなどを用いて様々な臓器のがんについて早期検出系確立の試みがなされています。

一方で、血漿中のcfDNA含有量は、tumor burdenの量に依存して増加すると考えられていますが、実際にはがんの組織、ステージ、患者間の違いで様々であり、特に初期のステージに於いては、がん由来のcfDNA量は著しく少なく、同一時期の同一患者由来サンプルを用いて複数のバイオロジカルレプリケートを置いて測定を行った場合、がん由来の変異DNAがピペッティングによりウェルごとによって含まれたり、含まれなかったり、また含まれていたとしても、ウェルや流路系への吸着などにより検出系に入らない可能性も考えられます。極少変異の検出におけるこのような問題は『サブサンプリング問題』と認識されており、測定データのバラつきや非検出の大きな原因と考えられていました。

Content

今回、札幌東徳洲会病院 医学研究所，旭川医科大学内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野 水上 裕輔先生、小野 裕介先生らがMolecular Oncology誌でご報告された サブサンプリング問題を克服した血漿cell free DNA中における極少コピー*KRAS*変異の改変ddPCR検出プロトコール法についてご紹介します。

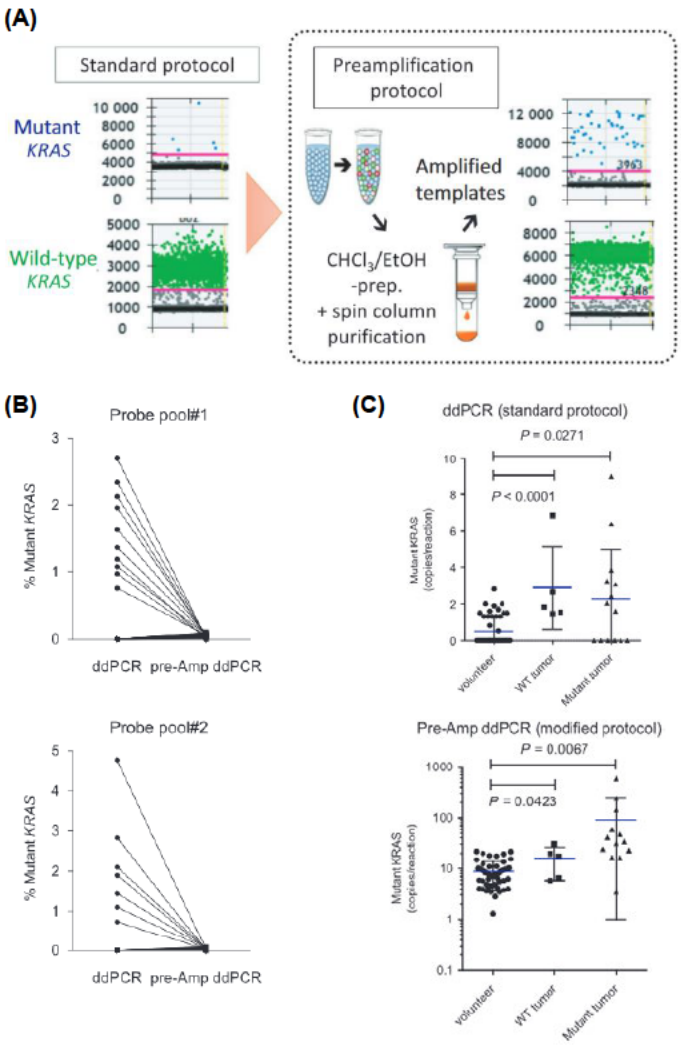

図1 Pre-Amplificationによるサブサンプリング問題を克服したddPCRを用いた極少*KRAS*変異検出プロトコール

ddPCRによる測定前にPre-Amplificationを行うことで、*KRAS*変異DNAの量を増幅し、結果としてddPCRによる検出時にポジティブドロップレットの数を増やすことでサブサンプリング問題の克服を図っています（A）。Pre-Amp ddPCR法では、*KRAS*野生型DNAによるバックグラウンドノイズは著しく抑えられています（B）。さらに結果として従来のddPCR法による検出よりも陽性・陰性のシグナル差をはっきりさせることに成功しています（C）。

Application Advantages

- Pre-Amplificationにより、変異DNAの初期サンプル中の割合などの定量情報は失われるものの、サブサンプリング問題の改善により、極少DNAサンプルにおける変異DNAの有無をより安定的に評価できるようになった
- Pre-Amplificationの手法は、陽性検出数が非常に少ないサンプルにおいて、検出された陽性ドロップレットがノイズによるものかを判別する手法として応用できる可能性が示された
- DNA含有量が非常に少ないサンプルでの変異検出などへの応用が期待できる

BIO-RAD

Case	Sex/age	Type of tumor	Stage (UICC)	Tumor volume (cm^2)	cfDNA conc. ($ng \cdot mL^{-1}$)	*KRAS* in tumor	Standard protocol[a] Mutant *KRAS* (copy/reaction)	Standard protocol[a] WT *KRAS* (copy/reaction)	Standard protocol[a] % ddPCR	Preamplification protocol[b] Mutant *KRAS* (copy/reaction)	Preamplification protocol[b] WT *KRAS* (copy/reaction)	Preamplification protocol[b] % ddPCR with preamp.
1	F/78	CRC	IIIC	87.5	13.7	WT	1.47	210.2	0.70	6.6	12 070.7	0.05
2	F/64	CRC	IIIB	18.0	21.1	WT	1.54	407.0	0.38	19.8	28 842.0	0.07
3	M/68	CRC	IIA	600.0	25.4	WT	2.64	723.8	0.36	30.6	74 646.0	0.05
4	F/73	CRC	IIA	9.4	19.8	WT	1.83	426.6	0.43	17.6	41 250.0	0.04
5	M/84	CRC	I	3.2	18.8	WT	**6.88**	517.0	1.33	5.8	45 622.5	0.01
6	M/76	CRC	IIA	3.6	12.5	G13D	0.00	176.0	0	59.7	27 233.7	**0.22**
7	M/72	CRC	IIIB	36.0	25.4	G12V	**6.38**	961.4	0.66	31.7	94 908.0	0.03
8	M/72	CRC	0	24.5	22.4	G12D	2.42	484.0	0.50	16.5	56 034.0	0.03
9	F/74	CRC	IIIB	42.9	13.8	G13C	**9.02**	239.8	3.76	594.0	28 710.0	**2.07**
10	M/63	CRC	IIIB	50.6	12.8	G12V	**3.26**	260.7	1.25	24.4	22 391.1	**0.11**
11	M/79	PDA	IB	4.4	14.3	G12D	0.00	199.2	0	3.5	20 981.1	0.02
12	F/72	PDA	IIB	2.5	24.1	G12D	0.00	1232.7	0	244.2	78 210.0	**0.31**
13	F/65	PDA	IIA	1.8	14.2	G12V	**3.07**	194.4	1.58	23.1	24 618.0	**0.09**
14	F/66	PDA	IIB	1.3	17.9	G12R	0.00	429.7	0	47.5	31 482.0	**0.15**
15	F/62	PDA	0	0.1	20.0	G12D	0.00	770.7	0	41.4	35 376.0	**0.12**
16	M/81	PDA	IIA	0.8	17.5	G12R	**3.84**	428.4	0.90	0.0	52 470.0	0.00
17	M/81	PDA	IIA	81.3	26.5	G12D	0.00	761.6	0	34.2	114 057.8	0.03
18	F/72	PDA	IIA	7.1	17.7	G12R	2.05	375.1	0.55	16.7	53 548.0	0.03
19	F/69	PDA	IIB	10.9	37.0	G12D	1.61	882.9	0.18	145.2	66 660.0	**0.22**

Table1 従来ddPCR法及びPre-Amp ddPCR法によるcfDNAにおけるKRAS変異のジェノタイピング結果
従来のddPCR法では、1反応当たりに検出される変異型KRAS DNAのコピー数が3以上のものを陽性サンプルとして、Pre-Amp ddPCR法では、変異型KRAS DNAの割合である（変異型KRAS DNA）/（野生型KRAS DNA)の値が0.09%以上のものを同じく陽性サンプルとして判断した。

Conclusion

今回の論文により、目的臓器のがん細胞由来のcfDNAの量が著しく少なく、特に安定的な測定が非常に困難であった血中cfDNAを用いた膵がん検出に於いて、Pre-Amplificationを組み合わせることで陽性・陰性のシグナル差をはっきりさせ、サブサンプリング問題を改善し、サンプルDNA量が限られた中でのcfDNAによるKRAS変異検出の精度を向上できる方法が示されました。

※ 本資料作成に当たり、札幌東徳洲会病院 医学研究所, 旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野 水上 裕輔先生、小野裕介先生よりデータをご提供頂いております。

Publication

An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy *KRAS* mutations in plasma cell-free DNA by resolving 'subsampling' issues

Yusuke Ono, Ayumu Sugitani, Hidenori Karasaki, Munehiko Ogata, Reo Nozaki, Junpei Sasajima, Tomoki Yokochi, Shingo Asahara, Kazuya Koizumi, Kiyohiro Ando, Katsunori Hironaka, Tsutomu Daito and Yusuke Mizukami.

Mol Oncol. 2017 Oct; 11(10): 1448–1458***.***

Related Articles

・**Measuring digital PCR quality: performance parameters and their optimization.**
Lievens A, Jacchia S, Kagkli D, Savini C and Querci M. ***PLoS One 11,*** e0153317. pigenetics. 2016 May 3;11(5):363-80.

論文検索サイト

ddPCRを用いた論文の検索サイトはこちら（**www.bio-rad.com/ddPCR/publications**）

BIO-RAD バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 取扱店

ライフサイエンス www.bio-rad.com
本 社 〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24 TEL：03-6361-7000
大阪営業所 〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11 TEL：06-6308-6568
福岡営業所 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28 TEL：092-475-4856
※学術的お問い合わせは TEL：03-6404-0331

※価格(税抜き）、仕様などは予告無く変更することがありますので、ご了承ください。
※価格は2019年6月現在のもので、メーカー希望小売価格（税別）です。
※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。

C12103L 1907a