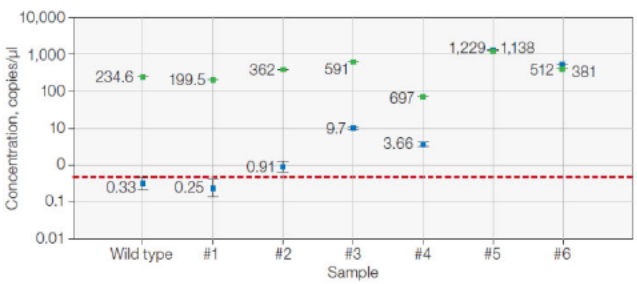
QX Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)を用いた膵癌特異的 反復配列RNAの血中高感度測定法による膵癌スクリーニング法開発と前膵癌病態囲い込みの可能性

Key words :膵癌, 癌特異的反復配列RNA, 癌診断マーカー, liquid biopsy, 癌スクリーニング法開発

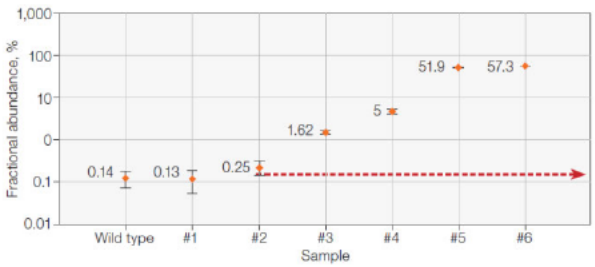
ddPCR and Liquid Biopsy

リキッドバイオプシーは血漿、尿およびCSF(脳脊髄液)をはじめとする体液由来サンプルを用い、特定の疾患を検出およびモニタリングする革新的な非侵襲性検査法で、非常に関心が高まっています。特に血中循環cell-free DNA(cfDNA)を用いた測定では、その手軽さや安定性等の理由により多くの研究者・企業が検査法の確立に注力し、実用化が検証されています。特にddPCRにおいてはcfDNAの絶対定量による評価およびctDNAにおける高い変異検出能力(参考データ1)、またTATの速さやアッセイの価格面等により早期の実用化が求められています。

(A)



(B)



参考データ1 バイオ・ラッドのddPCR KRAS Screening Multiplex Kitを用いたセルフリーDNAサンプルのスクリーニング(バイオ・ラッド提供※)

ddPCR KRAS Screening Multiplex Kitを用いて測定した6つのMDACCセルフリー血漿DNAサンプル由来の変異型KRAS(■)、野生型KRAS(■)および変異型の比率(■)の測定結果。赤い点線は変異型の検出率の範囲を示す。

※本データはバイオ・ラッド提供によるものであり(Bulletin 6407 Ver B, p80)、論文掲載データとは異なります。

Research Background

膵癌は早期診断が非常に困難なため、確定診断時に高度進行状態で発見されることが多く、難治性癌の代表であり、現在わが国での臓器別癌死因の第4位となっています。このため膵癌克服を目指す上で、検診レベルで早期発見を可能にするバイオマーカー開発と、血液などの非侵襲性サンプルを用いた膵癌スクリーニング法の開発は、非常に重要な希求課題の一つでもあります。

近年の急速な次世代シーケンサーの発展に伴い、2011年にマサチューセッツ総合病院のTing DT先生らのグループがRNAディープシーケンシングにより、膵癌及びその前癌病態である膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)病態で、HSATIIと呼ばれるゲノム領域から転写される反復配列RNAが正常組織と比較して高発現していることを報告し、膵癌バイオマーカーとして有望である可能性が示唆されました。

一方で、このような反復配列RNAの定量は、プライマーアニーリング箇所の多さとその組み合わせの多様性により、従来のPCR法での増幅が難しく、また安定して正確かつ簡便に定量することは困難でした。さらに検診レベルでの測定法開発は、癌組織よりもさらに膵癌バイオマーカーの存在比量が少ない血液サンプルでの堅牢な測定が理想であり、極微量検体を安定して測定できる感度と精確性が求められるところでした。

Content

今回、東京大学医学部附属病院 消化器内科 岸川 孝弘先生、大塚 基之先生、小池 和彦先生らの研究グループがJCI insight誌でご報告された 膵癌の早期診断に役立つ血中の反復配列RNAの高感度測定法の開発についてご紹介します。

Application Advantages

- 微量サンプルに対しても精確に増幅して安定的な定量を行うことができる
- 従来のqPCR法では定量が難しかった反復配列RNAの安定・簡便・正確な定量が可能
- 絶対定量の為、サンプル種類(臓器別)の影響を受けず、多検体測定時にプレート間インターナルコントロールが不要
- 様々な反復配列RNAが関わる発癌機構や疾患における当該反復配列RNAのコピー数検出にも応用が期待できる

BIO-RAD

論文にはTRAP法を用い「HSAII RNA中のコア配列に相補的なビオチン化RNAプローブとハイブリダイズしない領域」と「その他のRNA」を分解しコア配列のみを濃縮回収した手法や、TRAP法を用いることで安定したPCR増幅が可能となったアッセイ系の確立、TRAP法とqPCR、またはddPCRを組み合わせたTRAP-qPCR法およびTRAP-ddPCR法でHSAII RNA量測定データの精確性検討、さらにTRAP-ddPCR法による反復配列を含むHSAII RNAの血清中濃度測定など、数々の興味深い結果が掲載されています。詳細は下記Publicationに記載されている論文をご参照ください。

Conclusion

今回の論文により、これまで測定が困難であった反復配列RNAと呼ばれる特殊なRNAの定量法（TRAP-ddPCR法）を開発するとともに、HSATII RNAが膵癌患者及び前膵癌病態患者の血中に高頻度で検出されることを見出し、膵癌スクリーニング法として一つの有用な手法になりうることが示唆されました。

更に、HSAII RNA血中濃度が前膵癌病態でも既に健常人と比較して高値を示したことから、膵癌患者の早期診断を目的としたスクリーニングだけに留まらず、膵癌の前癌病態の囲い込みにも有用である可能性が示唆されました。

※ 本資料作成に当たり、東京大学医学部附属病院　消化器内科　岸川 孝弘先生、大塚　基之先生、小池　和彦先生より監修を頂いております。

Publication

Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients

Takahiro Kishikawa, Motoyuki Otsuka, Takeshi Yoshikawa, Motoko Ohno, Keisuke Yamamoto, Natsuyo Yamamoto, Ai Kotani and Kazuhiko Koike.

JCI insight. 2016;1(8):e86646. https://doi.org/10.1172/jci.insight.86646.

本文献の詳細につきましては、下記 東京大学病院ホームページ上でプレスリリースとして掲載されています

東京大学病院ホームページPDFファイルダウンロードサイト
（https://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/　icsFiles/afieldfile/2019/07/03/release_20160603-2.pdf ）

Related Articles

- **Droplet digital PCR measurement of *HER2* in patients with gastric cancer.**
Kinugasa H, Nouso K, Tanaka T, Miyahara K, Morimoto Y, Dohi C, Matsubara T, Okada H, Yamamoto K.
Br J Cancer. 2015 May 12;112(10):1652-5.

- **Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer.**
Kinugasa H, Nouso K, Miyahara K, Morimoto Y, Dohi C, Tsutsumi K, Kato H, Matsubara T, Okada H, Yamamoto K.
Cancer. 2015 Jul 1;121(13):2271-80.

- **Prognostic role of PIK3CA mutations of cell-free DNA in early-stage triple negative breast cancer.**
Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, Omoto Y, Iwase H.
Cancer Sci. 2015 Nov;106(11):1582-9.

- **Individualized Mutation Detection in Circulating Tumor DNA for Monitoring Colorectal Tumor Burden Using a Cancer-Associated Gene Sequencing Panel.**
Sato KA, Hachiya T, Iwaya T, Kume K, Matsuo T, Kawasaki K, Abiko Y, Akasaka R, Matsumoto T, Otsuka K, Nishizuka SS.
PLoS One. 2016 Jan 4;11(1):e0146275. doi: 10.1371/journal.pone.0146275.

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8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。

C12151L 1908a