

25-A-3 高速シーケンス解析技術を応用した血中・体液中の遊離核酸によるがんの高感度分子診断法の基盤確立

谷内田 真一 国立がん研究センター 研究所 がんゲノミクス研究分野

研究の分類・属性

発がん・がん生物学

研究の概要

近年の次世代シーケンス技術の革新的な進歩と血中・体液中の遊離 DNA (cell-free DNA: cf-DNA) の抽出技術の開発により、これまで不可能と考えられていた血中・体液中の遊離核酸中に存在するがんのゲノム異常(点突然変異あるいは染色体再編成)を検出する技術が開発されつつある。遊離核酸中のゲノム異常を検出することは、膵臓がん等の難治がんの早期診断を可能にするだけでなく、術後再発や分子標的治療に対する抵抗変異獲得クローンの出現を超早期から経時的かつ定量的に検出することができ、CEA や CA19-9 といった既存の腫瘍マーカーを越えた、緻密でかつ個別化された次世代のがん分子モニタリングを実現する可能性も期待されている。さらに腫瘍部位の影響や患者の病状が悪く、組織生検が採取困難な症例についても、本技術を応用することで分子治療標的を同定するいわゆる “Liquid Clinical Sequencing” による個別化医療の基盤ともなる技術である。

本研究では、高速シーケンス技術を応用した遊離核酸 (cf-DNA) による、がんの早期発見や分子モニタリングの標準手法の確立・有効性の評価と解析基盤の構築(サンプルの採取法や前処理法、cf-DNA の抽出法、cf-DNA シーケンス解析法)を目指す。まず、国立がん研究センターで既に全エクソン解読を行った乳がん等における血液を試料として予備実験を行う。血漿中の遊離 DNA の抽出には、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (キアゲン社)等の市販の抽出キットを用いる。さらに、シーケンス解析には当センター・研究所に設置されている高速シーケンサー (HiSeq 2000、イルミナ社)を用いる。さらに、臨床応用の実施を目指した Feasibility Test として、難治がんや希少がん患者の血漿や体液を用いた早期診断法の開発や、治療抵抗性獲得症例における経時的採血サンプルを用いた抵抗獲得変異のモニタリングについて検討を進める。なお、本プロジェクトは、愛知県がんセンター・中央病院や鳥取大学医学部、米国・Johns Hopkins 大学との共同研究である。

平成 27 年度研究経費

9,416 千円

研究班の組織

第3年次

①研究者名	②年齢	③最終卒業校・卒業年次・学位・専攻科目、現在の専門	④所属研究機関名・職名	⑤分担する研究課題名・項目	⑥研究費配分予定額(千円)	⑦エフォート(%)

谷内田真一	45	香川医科大学大学院・平成10年卒・医学博士・外科学、腫瘍学	国立がん研究センター研究所 がんゲノミクス研究分野・ユニット長	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・研究総括ならびに遊離核酸の抽出と試料の保存・管理、臨床情報の解析	主任研究者に一括計上 3,050	10
高井英里奈	29	東京理科大学大学院・平成26年卒・薬学博士・放射線生命科学、腫瘍生物学	国立がん研究センター研究所 がんゲノミクス研究分野・特任研究員	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・遊離DNAの抽出とデジタルPCRや高速シーケンサーを用いた解析		35
十時 泰	52	名古屋大学理学部物理学科・昭和62年卒・学士・物理学、バイオインフォマティクス	国立がん研究センター研究所 がんゲノミクス研究分野・ユニット長	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・シーケンスデータの情報解析	2,300	5
島田和明	58	京都府立医科大学・昭和57年卒・医学博士・外科学、肝胆膵外科	国立がん研究センター中央病院 肝胆膵外科・科長	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取と臨床情報の収集	肝胆膵外科に一括計上 650	3
奈良 聡	41	京都大学医学部・平成10年卒・学士・外科学、肝胆膵外科	国立がん研究センター中央病院 肝胆膵外科・医員	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取と臨床情報の収集		3
森實千種	42	横浜市立大学医学部・平成9年卒・医学博士・消化器内科学、腫瘍内科学	国立がん研究センター中央病院 肝胆膵内科・医員	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取と臨床情報の収集	400	3
吉永繁高	42	鹿児島大学医学部・平成9年卒・医学博士・消化器内科学、消化器内視鏡学	国立がん研究センター中央病院 内視鏡科・医員	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取と臨床情報の収集	400	3
古田 耕	59	九州大学医学部・昭和57年卒・医学博士・臨床検査学、臨床検査学	神奈川県立がんセンター病院 医療技術部・部長	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取と臨床情報の収集	400	3
平岡伸介	49	慶應義塾大学大学院・平成7年卒・医学博士・病理学、腫瘍免疫学	国立がん研究センター中央病院 病理臨床検査科・科長	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取と病理診断	400	3
松本和也	42	鳥取大学大学院・平成17年卒・医学博士・内科学、胆膵内視鏡	鳥取大学医学部 消化器内科・助教	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取（特にセクレチン負荷）と臨床情報の収集	700	3
山雄健次	64	名古屋大学医学部・昭和51年卒・医学博士・消化器内科学、胆膵内視鏡	愛知県がんセンター中央病院 消化器内科・部長	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取と臨床情報の収集	愛知県がんセンター中央病院 消化器内科に一括計上	3

脇岡 範	42	自治医科大学・平成10年卒・医学博士・消化器内科学、胆膵がんの診断及び内視鏡治療と化学療法	愛知県がんセンター中央病院 消化器内科・医長	血中・体液中の遊離核酸によるがんの分子診断法の基盤整備・試料の採取と臨床情報の収集	1,200	3
------	----	---	------------------------	---	-------	---

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標)

<目的>

がんを診断する「直接的」な検査法は、生検や手術で摘出された組織の病理組織診断であった。しかし、いずれも侵襲的な試料の採取法で、腫瘍が採取困難な部位にいたり、治療ごとの複数回の生検が必要であったりすると、採取が困難なことも多い。

これまでの既存の腫瘍マーカー（CEA や CA19-9 など）やプロテオーム解析で発見された新規バイオマーカーの多くは、がんが産生するタンパクやがんに伴う二次的な生体反応を評価し、「間接的」にがんの病状を推測したものである。その結果、がんの量的なモニタリングに用いることは出来ても、早期診断や個々のがんの生物学的な特性、個別化治療には応用出来なかった。非侵襲的に、そしてリアルタイムにがんを「直接的」に診断する究極の検査法は、血液・体液中からがん細胞や遊離核酸中の遺伝子異常を検出することである。

近年の次世代シーケンズ技術の革新的な進歩に加えて、血中・体液中の遊離核酸（cell-free DNA: cf-DNA）の抽出技術の開発により、これまで不可能と考えられていた血中・体液中の遊離核酸中に存在するがんゲノムの異常を検出する技術が開発されつつある（Rebecca JL et al *Sci Transl Med* 2010）。

本研究の目的は、高速・高感度の次世代シーケンズ技術を用いて、血中・体液中の遊離核酸中に存在するがんのゲノム異常を検出する研究基盤の整備と解析法を確立することである。これらの解析基盤が構築されれば、遊離核酸中にあるごく微量のがんゲノムの遺伝子変異を検出することで、膵臓がん等の難治がんの早期診断法の開発が期待できる。さらに、術後再発や抗がん剤、分子標的薬剤に対する抵抗変異獲得クローンの出現を超早期から経時的かつ定量的に検出することができ、CEA や CA19-9 といった既存の腫瘍マーカーを越えた、緻密でかつ個別化された次世代のがん分子モニタリングを実現する可能性も期待されている。

<到達目標>

1. 遊離核酸の解析に関する研究基盤の整備と解析法の確立

血漿や体液サンプルの採取や保存、前処理法を確立し、全施設で使用できる共通した試料収集に関するプロトコールを作成する。次に、試料から安定した遊離核酸の抽出法を確立し、高速・高感度シーケンズ技術とデータの情報解析を駆使して、がんのゲノム異常を検出する。これらの基盤整備は、Johns Hopkins 大学と連携して行う。

2. 臨床応用に向けた Feasibility Test の実施

臨床応用の実施を目指した Feasibility Test として、難治がんや希少がん患者の血漿や体液を用いた早期診断法の開発や、治療抵抗性獲得症例における経時的採血サンプルを用いた抵抗獲得変異のモニタリングについて検討し、有効性を評価する予定である。

(第3年次評価時点の実績要点)

血液から高品質かつ出来るだけ多くの遊離核酸（DNA）を抽出するための試料収集法を確立した。第3年次に入り、欧米の企業から様々な市販の抽出キットが発売されたが、いずれのキットにおいても従来法に対する優位性はみられなかった。

259名の膵臓がん患者の血漿から抽出した遊離 DNA（cell-free DNA、cf-DNA）を用いて、高感度のデジタル PCR を用いて KRAS 変異の検出を試みた。少量（0.25 mL）の血漿を用いた検討では、他臓器

転移を有する症例においては、約 60%で *KRAS* 遺伝子の変異が検出可能であった。次に血漿 (1.75 mL) 由来の遊離 DNA を研究試料として次世代シーケンス技術を用いて Targeted deep sequencing を行った。膵臓がんで高頻度に変異がみられる遺伝子や治療標的となり得る遺伝子を含む 60 遺伝子を標的に検討したところ、全例 (48 例) で何らかの遺伝子変異や遺伝子増幅を認めた。さらに約 30%の症例で、治療標的となり得る遺伝子変異を認めた。本研究から、進行した膵臓がん症例では少量 (2 mL) の血漿で、治療標的となり得る遺伝子を探索できる可能性が示唆された (Takai E et al. *Sci Rep* 2015)。

また、米国・Johns Hopkins 大学と共同研究を行い、膵嚢胞液を用いた分子診断法の基盤構築を行い (Springer S et al. *Gastroenterology* 2015)、継続して検証実験を行っている。さらに平成 26 年度からシスメックス社との共同研究も始まり、十二指腸液中に含まれる遊離 DNA を用いた診断法を開発している。

平成 27 年度は、難治がんである悪性黒色腫を対象疾患に研究計画書を作成し、個別同意のもとに経時的な採血を約 30 名に行っている (平成 27 年 12 月 11 日現在)。“Liquid Clinical Sequencing”による分子標的治療や免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測を行い、さらに治療効果の早期診断を目標に研究を行っている。

第 3 年次

(到達目標)

1. 第 1 年次と第 2 年次の研究成果をもとに、さらに感度の高い分子診断法の開発を目指す。具体的にはサンプルの増量や種類の変更、検出機器の改良、共同研究施設の検出機器 (BEAMing や Safe-SeqS 等) との比較検討を行う。
2. 膵臓がん以外のがん腫の血漿を用いて、がん腫に差異による検出感度の違いを検討し、Liquid clinical sequencing が有益ながん腫を選定する。
3. 経時的採血サンプルを用いて、がんの Heterogeneity や治療抵抗性獲得症例における抵抗獲得変異のモニタリングなど、がんの個別化診断に供する研究を行う。

(年次評価時点の実績要点)

1. 膵臓がん患者のごく少量の血漿 (0.25 mL) においても、デジタル PCR により、遠隔転移を有する患者においては約 60%でがん由来の遊離 DNA (circulating tumor DNA、ct-DNA) の *KRAS* 変異を検出した。しかし、手術症例においては 8%の検出率であった。がん由来の遊離 DNA で *KRAS* 変異を検出した症例 (48 例) において、1.75 mL の血漿を研究試料として次世代シーケンサー (Illumina プラットホーム) を用いて Targeted deep sequencing を行い、全例になんらかの遺伝子変異や増幅を認め、約 30%で治療標的となり得る遺伝子変異を認めた。
2. 膵臓がん以外のがん種として、悪性黒色腫を対象に検討を行った。本邦における悪性黒色腫では約 25%に *BRAF* 遺伝子変異を認めることからこれをベンチマークとして、血漿中の腫瘍由来遊離 DNA の検出可能性を、デジタル PCR で検証した。
3. 現在、新たな治療法が続々と開発されている悪性黒色腫の患者 (約 30 名) を対象に経時的な採血を行い、治療モニタリングを開始している。免疫チェックポイント阻害薬のような免疫療法は画像診断では効果判定に時間を要し、副作用の発症頻度も高く、さらに高価 (年間約 1,500 万円〜) である。したがって、症例ごとに遊離 DNA 中の特定の遺伝子変異をバイオマーカーとして経時的に測定することで、早期の治療予測と不利益な治療の回避を目標に研究を進めている。

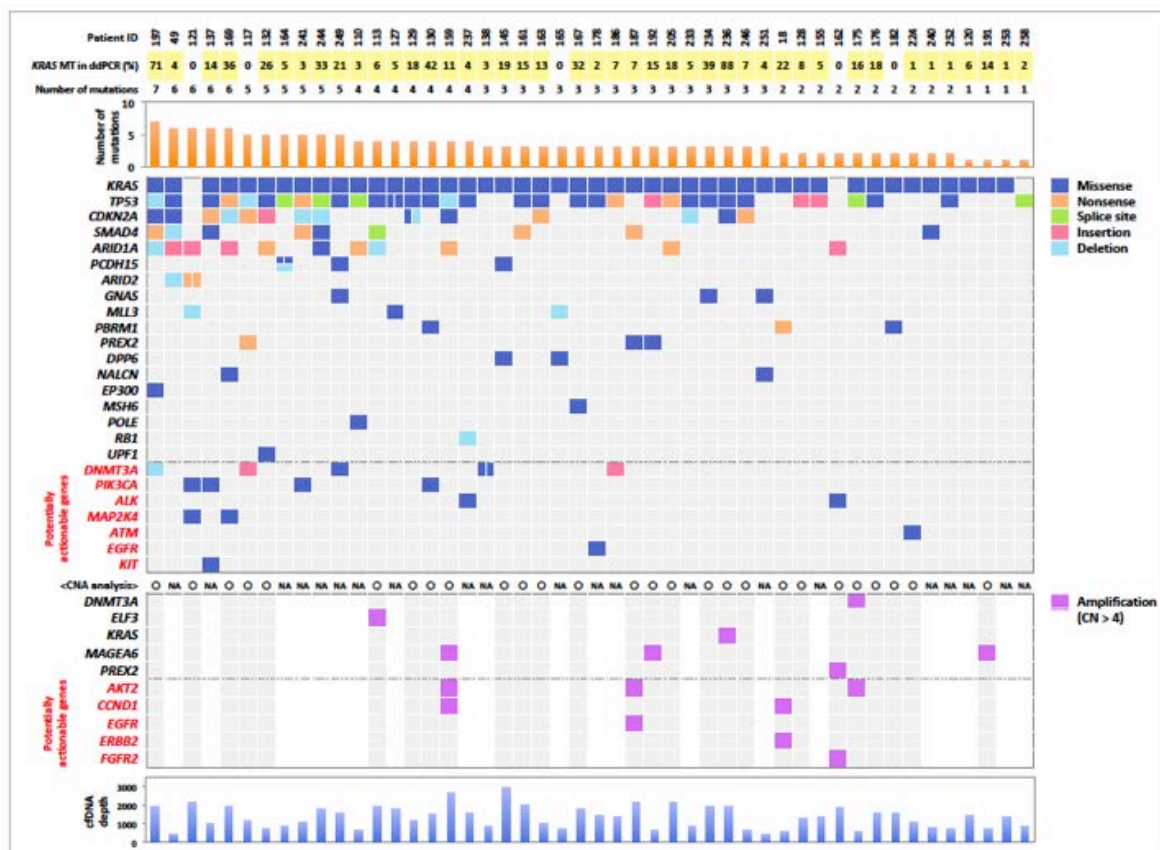
研究成果と考察

第 3 年次評価時点

- A) 膵臓がん患者の血漿における次世代シーケンサーを用いた Targeted deep sequencing
第 2 年次にデジタル PCR で血漿遊離 DNA 中に *KRAS* 変異を認めた症例や、*KRAS* 変異は認めないが遠隔転移を認めた症例 (計 48 例) を研究対象に Targeted deep sequencing を行った。微量の DNA を Starting template に用いた次世代シーケンス解析の既報は、Amplicon-based

sequencing (Ion AmpliSeq Technology など) であった。我々は、SureSelect Target Enrichment System (Agilent Technologies) と KAPA Hyper Prep Kit (Kapa Biosystems) を組み合わせる新たなライブラリ作製のプロトコルを作成した。ターゲット濃縮キットとしては世界的に評価の高い SureSelect Target Enrichment System のプロトコルでは、200 ng を Starting template にしている。今回我々は、KAPA Hyper Prep Kit を組み合わせることで、PCR duplication を増やすことなく“10 ng”の微量の DNA を Starting template とする独自のプロトコル作成に成功した。すなわち、Starting template が微量であっても、Amplicon-based sequencing と比較し、精度の高い次世代シーケンス解析の前処理法 (ライブラリ作製法) を開発した。

Targeted deep sequencing に用いた遺伝子は、膵臓がんで高頻度に変異がみられる遺伝子 (*KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* など) と他臓器のがん種で治療標的となり得る遺伝子 (*PIK3CA*、*EGFR*、*ERBB2* など) を組み合わせ、60 遺伝子のオリジナルパネル (Agilent Technologies) を作成した。シーケンスは精度の高い Illumina プラットホームで行った。



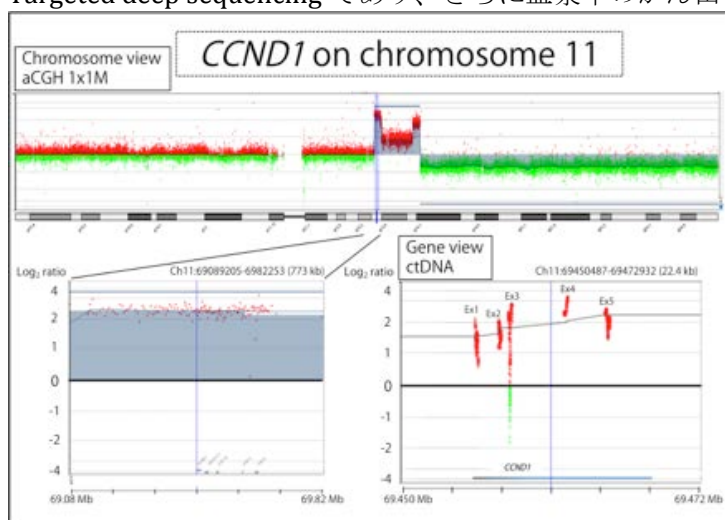
その結果を上に示す。平均の Coverage depth は 1,356X であった。60 遺伝子のうち、中央値で 3 個 (1~7 個) の遺伝子変異を認めた。変異の多かった遺伝子は順に *KRAS*、*TP53*、*CDKN2A* の順であった。*KRAS* 変異の塩基配列は、デジタル PCR の結果と 100% の一致をみた。加えて、治療標的となり得る遺伝子変異が 48 症例のうち 14 例 (29.2%) で観察された。具体的には、*ALK*、*ATM*、*DNMT3A*、*EGFR*、*KIT*、*MAP2K4* や *PIK3CA* である (赤色で示した遺伝子)。*PIK3CA* は、変異を認めた 4 例のうち 3 例はいわゆる Hot spot (p.H1047L、p.E545K と p.Q546K) であった。

B) Targeted deep sequencing データを用いたコピー数解析

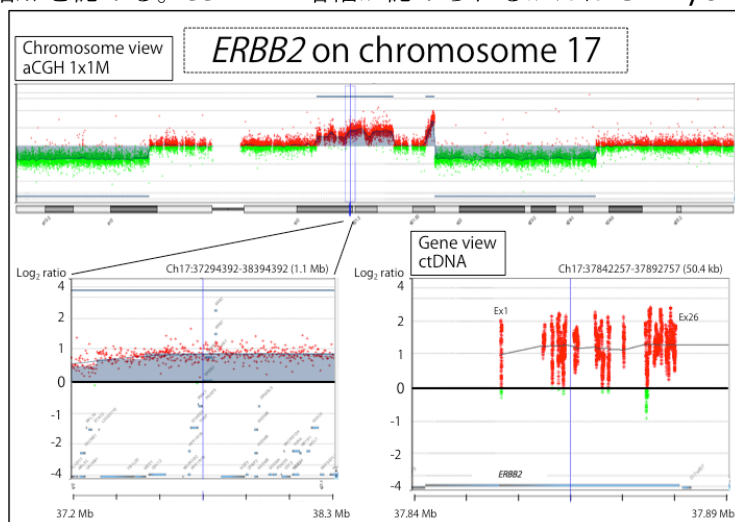
シーケンス・データの情報解析技術の進歩により、シーケンス・データからコピー数解析が可能となってきた。これまでは全エクソン解析のような多数の遺伝子 (2 万遺伝子以上) からコピー数予測は行われてきた。

しかし、今回はわずか 60 遺伝子の Targeted deep sequencing であり、さらに血漿中のがん由来 DNA の変異アレル頻度は通常のがん組織由来の場合と比較して極端に低い。しかし試行錯誤の上、オリジナルのアルゴリズムでコピー数解析が可能となった(十時 泰 班員)。

その一例を示す。本症例においては手術の際の余剰凍結試料があり、幸い組織中の腫瘍率も高く、原発巣の aCGH (Array Comparative Genomic Hybridization) で正確なコピー数異常を検出することが出来た。そのうち **CCND1** を右に示している。図の左が原発巣の aCGH の結果で単位は $\text{Log}_2 \text{ ratio}$ であり、**CCND1** を含む領域の明らかな増幅を示している。一方、図の右が血漿中の遊離 DNA (cf-DNA) 中の **CCND1** のコピー数の異常を、コントロールとなる遺伝子変異のアレル頻度で補正し、一塩基ごとにプロットしたものである。単位は同様に $\text{Log}_2 \text{ ratio}$ であり、**CCND1** 遺伝子の明らかなコピー数の増加を認める。**CCND1** の増幅が認められるがんは **CDK4/6** 阻害薬が分子標的治療の候補に上がる。



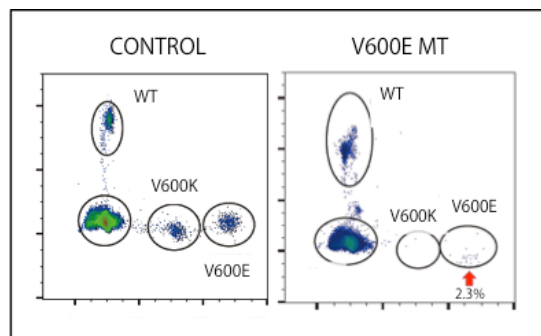
本症例においては、**ERBB2 (HER2)** の増幅も原発巣と血漿中の遊離 DNA (cf-DNA) で認められ(右図)、**Trastuzumab** が分子標的治療の候補に上がる。コピー数異常のうち、我々のアルゴリズムで顕著な増幅は検出可能であるが、欠失の検出に関しては依然として不正確である可能性が否定できない。しかし、治療標的となるのは一般に遺伝子増幅であることから、血漿 DNA からの遺伝子増幅の検出は有益性が高いと考える。前ページの図の下カラムの紫色は、顕著なコピー数の増幅を示した遺伝子で、赤色で示したものは治療標的となり得る可能性のある遺伝子である。



C) 悪性黒色腫における血漿中の腫瘍由来 DNA の検出

膵臓がん以外のがん種として悪性黒色腫を対象疾患とした。研究計画書を新たに作成し、研究倫理審査委員会の承認後に研究を開始した。本邦における悪性黒色腫は希少ではあるが、国立がん研究センター・中央病院には年間約 200 名の新規患者が来院する。近年、免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体) が開発され、悪性黒色腫に対して著効を示す多くの症例が報告されている。その一方で薬剤の性質上、免疫関連有害事象や重篤な副作用 (間質性肺炎や消化管穿孔など) がある。また、他の分子標的薬剤と異なり、画像診断による治療効果判定に時間を要することに加え、極めて高価な薬剤でもある (年間約 1,500 万円〜)。したがって、①免疫チェックポイント阻害剤の適応や副作用軽減のための患者の層別化と②早期に治療効果の判定に有益なバイオマーカーの開発が急務である。

悪性黒色腫では **BRAF** 変異を比較的高頻度に認



めることで知られている。原発巣において *BRAF* 変異が検出されている症例の血漿をバイオバンクから抽出しを受け、デジタル PCR で血漿中の腫瘍由来 *BRAF* 変異の存在を確認した（前ページの図）。

D) 悪性黒色腫患者の血漿における次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析

本邦の悪性黒色腫は、*BRAF* 変異を有する患者の割合は全体の約 25%と報告されている。しかし悪性黒色腫においては、*BRAF* 以外に *NRAS* や *NF1/NF2* などのキーとなるドライバー遺伝子の変異があることが知られている。本研究では免疫チェックポイント阻害剤の治療の層別化を目的に、免疫チェックポイント阻害剤治療を行った患者の血漿中の遊離 DNA を用いて全エクソン解析を行っている。免疫チェックポイント阻害剤による治療を行う症例は全身に転移を有する症例が多いことから、原発巣や転移巣の生検材料を用いた全エクソン解析ではなく、現在の病状に最もドミナントなクローンの変異情報を獲得するために、血漿由来の遊離 DNA を研究試料として用いることとした。遺伝子異常と治療効果についてレトロスペクティブに解析する。

E) 悪性黒色腫患者の血漿遊離 DNA によるモニタリングの実現に向けて

悪性黒色腫には特異的な腫瘍マーカーが存在しない。さらに免疫チェックポイント阻害剤は、他の分子標的薬剤と異なり、画像診断による治療効果判定に時間を要することに加え、副作用も多い。そのため早期に治療効果を判定できるバイオマーカーの開発が急務である。上述のように悪性黒色腫には *BRAF* もしくはそれ以外のキーとなるドライバー遺伝子を有することから、第 1 回目の採血で血漿中の遊離 DNA を用いて全エクソン解析（もしくは Targeted sequencing）を行い、各患者の個々の腫瘍マーカーとなり得る遺伝子変異を特定する。その後、定期的な採血によりその遺伝子変異の血漿中の絶対量をデジタル PCR で測定することで、低侵襲かつ安価（約 5,000 円）で画像診断より早期の段階で治療効果の判定が可能になる可能性がある。

平成 27 年度は悪性黒色腫の新規患者に個別同意を行い、治療前と治療後定期的に採血を行い、血漿を保存している。平成 27 年度末の登録症例数は約 30 名である。

F) 十二指腸液を用いた膵臓がんの早期診断法の開発

膵臓がんの早期においては、少量の血漿からがんを検出することは困難であることが明らかとなった。しかし、上部消化管内視鏡検査の際に得られるファーター乳頭部周囲の十二指腸洗浄液には、より多くのがん由来の遊離 DNA が存在すると考える。これまでの血漿を用いた遊離 DNA の抽出法（カラム法）では、十二指腸液には不純物が多いことや pH の影響等で遊離 DNA の抽出が容易ではないことが判明した。現在、シスメックス社と共同で十二指腸液から安定して遊離 DNA を収集する機器の開発とプロトコールの作成を行っている。

G) 血中・体液中の遊離核酸に関する国際共同研究の推進

米国・Johns Hopkins 大学が主幹施設である Vogelstein Molecular Study に本邦からは国立がん研究センターと愛知県がんセンター・中央病院（山雄健次 班員と脇岡 範 班員）が参画している。第一弾として、EUS-FNA（超音波内視鏡下穿刺吸引術）下もしくは外科切除で得られた膵臓の嚢胞液中の遊離 DNA を用いて各嚢胞疾患に特徴的な遺伝子変異の検出を Targeted sequencing で行った。臨床情報を組み合わせることで、高精度に嚢胞疾患を鑑別できることを共同で発表した（Springer S et al. *Gastroenterology* 2015）。

倫理面への配慮

提供者、その家族、血縁者その他の関係者の人権および利益の保護の取り扱いについては、提供者側の同意、協力や社会的コンセンサスを十分に配慮した上で行う。本研究は、国立がん研究センター 研究倫理審査委員会で承認されている「高感度の最新シーケンス技術を用いた膵腫瘍の早期診断法の開発（研究課題番号：2012-081）」を包含する後継事業に位置づける。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」ならびに「疫学研究に関する倫理指針」を遵守し、国立がん研究センターの研究倫理審査委員会に新たな研究計画書を提出し、承認後に研究を開始する。また、共同研究機関であ

る愛知県がんセンター、鳥取大学医学部、米国・Johns Hopkins 大学においても各施設の倫理審査委員会に研究計画書を提出する。

個人情報とは、「国立がん研究センターが扱う個人情報に関するガイドライン」に従って、厳重に保護され慎重に扱うものとする。本研究に登録された患者氏名は、国立がん研究センターから、データセンターをはじめとする外部施設および外部の研究者に知られることはない。登録患者の同定や照会とは、登録時に発行される登録符号を用いて研究代表者（谷内田真一）によって行われる（連結可能匿名化）。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

第3年次

(雑誌論文)

- ・ がん研究開発費による成果であることが記載されているもの
 1. [Takai E](#), [Totoki Y](#), Nakamura H, [Morizane C](#), [Nara S](#), Hama N, Suzuki M, Furukawa E, Kato M, Hayashi H, Kohno T, Ueno H, [Shimada K](#), Okusaka K, Nakagama H, [Shibata T](#), [Yachida S](#). Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep* 2015 5: 18425.
 2. [Yachida S](#), Wood LD, Suzuki M, [Takai E](#), [Totoki T](#), Kato M, Luchini C, Arai Y, Nakamura H, Hama N, Elzawahry A, Hosoda F, Shiota T, Morimoto N, Hori K, Funazaki J, Tanaka H, [Morizane C](#), Okusaka T, [Nara S](#), [Shimada K](#), [Hiraoka N](#), Taniguchi H, Higuchi R, Oshima M, Okano K, Hirono S, Mizuma M, Arihiro K, Yamamoto M, Unno M, Yamaue H, Weiss MJ, Wolfgang CL, Furukawa T, Nakagama H, [Vogelstein B](#), Kiyono T, [Hruban RH](#), [Shibata T](#). Genomic sequencing identifies *ELF3* as a driver of ampullary carcinoma. *Cancer Cell* 2016 29: 2290240.
 3. [Takai E](#), [Yachida S](#). Genomic alterations in pancreatic cancer their relevance to therapy. *World J Gastrointest Oncol* 2015 7: 250-258.
 4. Springer S, Wang Y, Dal Molin M, Masica DL, Jiao Y, Kinde I, Blackford A, Raman SP, Wolfgang CL, Tomita T, Niknafs N, Douville C, Ptak J, Dobbyn L, Allen PJ, Klimstra DS, Schttner MA, Schmidt CM, Yip-Schneider M, Cummings OW, Brand Rem She HJ, Singhi AD, Scarpa A, Salvia R, Malleo G, Zamboni G, Falconi M, Jang JY, Kim SW, Kwon W, Hong SM, Sog KB, Kim SC, Swan N, Murphy J, Geoghegan J, Brugge W, Fernandez-Del Catillo C, Mino-Kenudson M, Schulick R, Edil BH, Adsay V, Paulini J, van Hooft J, [Yachida S](#), [Nara S](#), [Hiraoka N](#), [Yamao K](#), [Hijioka S](#), van der Merwe S, Goggins M, Canto MI, Ahuja N, Hirose K, Makary M, Weiss MJ, Cameron J, Pittman M, Eshleman JR, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Karchin R, [Hruban RH](#), [Vogelstein B](#), Lennon AM. A combination of molecular markers and clinical features improve the classification of pancreatic cysts. *Gastroenterology* 2015 149: 1501-1510.
 5. Shibayama Y, Fujimori T, Nguyen G, Hirose T, Totsune K, Ichihara A, Kitada K, Nakano D, Kobori H, Kohno M, Masaki T, Suzuki Y, [Yachida S](#), Nishiyama A. (Pre)renin receptor is crucial for Wnt/ β -catenin-dependent genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep* 2015 5: 8854.
 6. Ohmoto A, [Yachida S](#), Kubo E, [Takai E](#), Suzuki M, [Shimada K](#), Okusaka T, [Morizane C](#). Clinicopathologic features and germline sequence variants in young pancreatic ductal adenocarcinoma patients (≤ 40 years of age). *Pancreas* 2016 45: 1056-1061.
- ・ がん研究開発費による成果としての記載はないが、関連するもの
 1. Bastruk O, Hong SM, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Brosens LA, Fukushima N, Goggins M, [Hruban RH](#), Kato Y, Klimstra DS, Klöppel G, Krasinskas A, Longnecker DS, Matthaei H, Offerhaus GJ, Shimizu M, Takaori K, Terris B, [Yachida S](#), Esposito I, Furukawa T. A revised classification system and recommendation from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2015 39: 1730-1741.
 2. Matsuda Y, Ishiwata T, [Yachida S](#), Suzuki A, Hamashima Y, Hamayasu H, Yoshimura H, Honma N, Aida J, Yakubo K, Arai T. Clinicopathological features of 15 occult and 178 clinical pancreatic

- ductal adenocarcinomas in 8339 autopsied elderly patients. *Pancreas*, 2016 45: 234-240.
3. Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Sugimachi K, Hirata H, Sawada G, Iwaya K, Kurashige J, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi T, Chiba K, Shiraishi Y, Nagae G, Yoshida K, Nagata Y, Haeno H, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Iinuma H, Sasaki S, Nagayama S, Yamada K, Yachida S, Kato M, Shibata T, Oki E, Saeki H, Shirabe K, Oda Y, Maehara Y, Komune S, Mori M, Yamamoto K, Suzuki Y, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mimori K. Integrated multiregional analysis proposing a new model of colorectal cancer evolution. *PLoS Genetics* 2016 12: e1005778.

(学会発表)

1. Takai E. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment and precision medicine in pancreatic cancer (Oral presentation). IX. Congress CNAPS-Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (Berlin, Germany) 12 September 2015
2. 高井英里奈 膵がんにおける Liquid Clinical Sequencing (シンポジウム) 日本癌学会学術総会 (名古屋市) 2015年10月9日
3. 谷内田真一 膵臓がんのゲノム解析とその臨床応用 (基調講演) 日本膵臓学会大会 (名古屋市) 2015年6月20日
4. 谷内田真一 ゲノム異常に基づく膵臓がん治療の個別化による予後向上の可能性 (シンポジウム) 日本癌治療学会 (京都市) 2015年10月30日

(書籍)

1. Takai E, Yachida S. Liquid biopsy for early diagnosis of pancreatic cancer. Innovation of Diagnosis and Treatment for Pancreatic Cancer (Editor: Hiroki Yamaue) Springer 2016, *in press*.

(その他)

1. Takai E. **Best Abstract Award**. IX. Congress CNAPS-Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (Berlin, Germany). Title: Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment and precision medicine in pancreatic cancer. 12 September 2015