

# サイズ別cfDNA定量による 腎細胞癌検査方法

秋田大学 大学院医学系研究科 医学専攻  
助教 明石 英雄

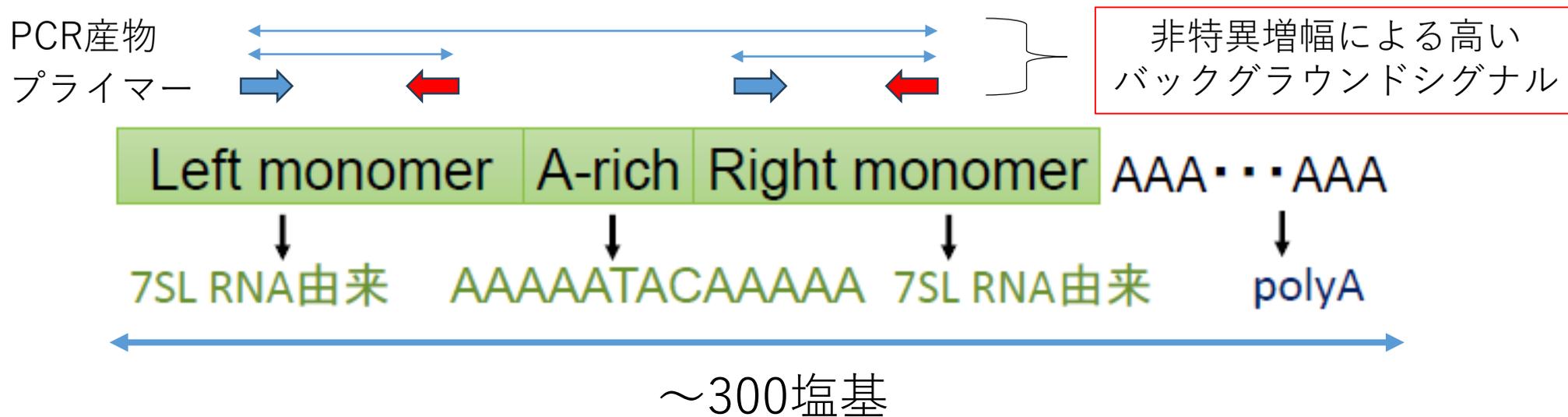
2025年3月6日

# 新技術の概要

- ・cfDNAは、細胞が破壊されて血中に放出される極微量の断片化DNAであり、そのサイズ分布は、担癌患者と健常者で異なることが示唆されている。
- ・本技術では、定量PCR([Alu-qPCR](#))によって、様々なサイズのcfDNAを超高感度に定量・数値化し、担癌患者と健常者のcfDNAサイズ分布の違いに基づく閾値を設定する。

# 高感度ヒトゲノム検出法の標的配列ーAlu配列

- ヒトゲノム中に存在する反復配列（SINE）の一種
- 100万コピー以上存在、ヒトゲノムの10%を占める
- 霊長類に特異的
- 2つの7SL RNA由来配列と、その間のA-rich配列からなる  
(7SL RNA由来配列は齧歯類等にも存在する)



# Alu-qPCRの理論的検出限界値

- 抽出後のゲノムDNAは断片化されている
  - 断片の長さ: 2~5万塩基対
  - 断片の個数: 12~30万
  - 1断片の重量: 0.02~0.05 fg
- 1断片には1以上のAlu配列が含まれる
- qPCRでは3コピー以上で検出が可能

理論的検出感度: 0.06~0.15 fg  
現状の検出感度: 1 pg

新たなプライマー・プローブの  
設計クライテリアが必要。

# プライマー・プローブ設計(1)

従来のプライマー

- ①他生物ゲノムと交叉する
- ②プライマー・プローブダイマーを形成する



**独自のクライテリア**

**バックグラウンドを下げる  
ことにより感度を上げる**

新しいプライマー

- ①他生物ゲノムと交叉**しない**
- ②プライマー・プローブダイマーを形成**しない**

# プライマー・プローブ設計(2)

```
1 GGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACTTGAGGTCAGGAGTTTCGAGACCAGCC 90
    101F:5'-GGTGAACCCCGTCTCTACT-3'
    98F:5'-CATGGTGAAACCCCGTCTCTA-3'  133FH:5'-ATTAGCCGGGCGTGGTGGCG-3'
91 TGGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCCGGGCGTGGTGGCGCGTGCCTGTAATCCAGCTACTCGGGAG 180
    144RH:3'-TATGTTTTTAATCGGCCCGC-5'
    188R:3'-GATGAGCCCTC
181 GCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGCCGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCG 270
    CGACTCCG-5'
    206R:3'-CGTCCTCTTAGCGAACTTGG-5'
271 AGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 300
```

\* McBrideと我々の配列は、極めて近くに位置し、オーバーラップする。

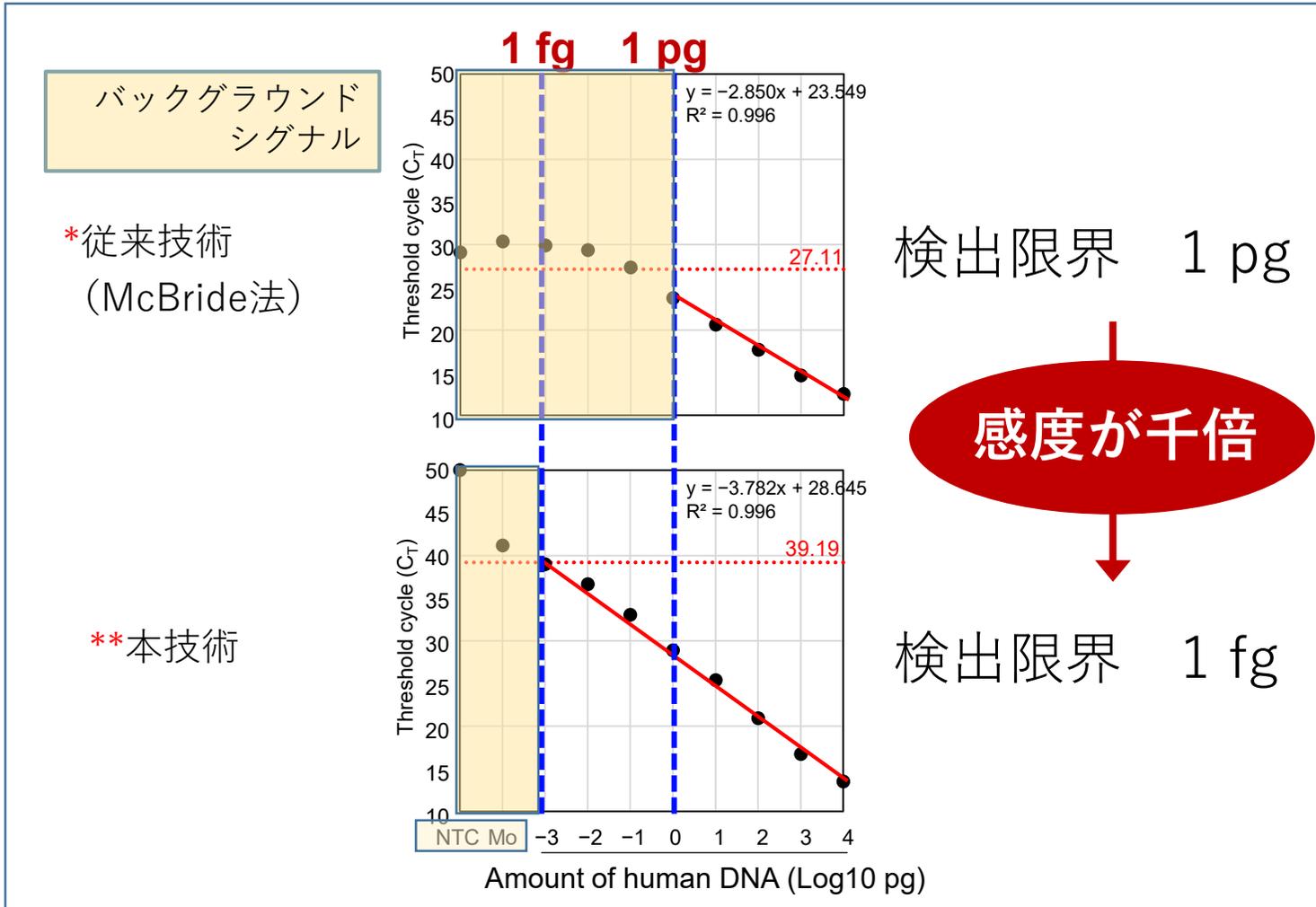
黒：Aluモデル配列

青：従来の配列 (McBride et al)

赤：我々の配列

\*McBride (2003) Cytotherapy 5, 7-18

# Alu-qPCR実施例



## 本技術の特徴

従来技術では、分析できない他動物ゲノム混合サンプルや、小さなDNA断片も定量可能

## \*\*ヒト細胞異種移植モデル動物のヒト幹細胞検出への応用

Funakoshi, K., Bagheri, M., Zhou, M., Suzuki, R., Abe, H., **Akashi, H\***. (2017) Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells. Sci. Rep. 7, 13202. (\*: corresponding author)

## 古人骨由来試料への応用

第66回東北・北海道連合支部学術集会  
第125回日本解剖学会総会・全国学術集会  
第123回日本解剖学会総会・全国学術集会  
第122回日本解剖学会総会・全国学術集会

# 想定される用途

## 臨床医療

**循環cell free DNA (cfDNA)**  
定量による癌診断



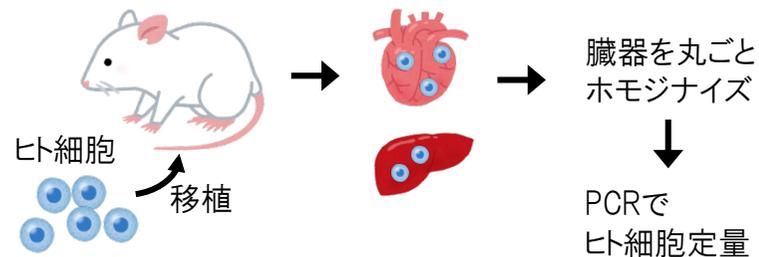
## 人類学

古人骨由来**核DNA**の解析による  
現生人類の父系祖先、日本人起源の探求



## 基礎医学・生物学

**異種移植**モデル動物の  
初期のヒト癌or幹細胞の検出



## 法科学

クマ等の獣害における  
加害個体の追跡・特定



# 従来技術とその問題点

## cfDNA (cell-free DNA)

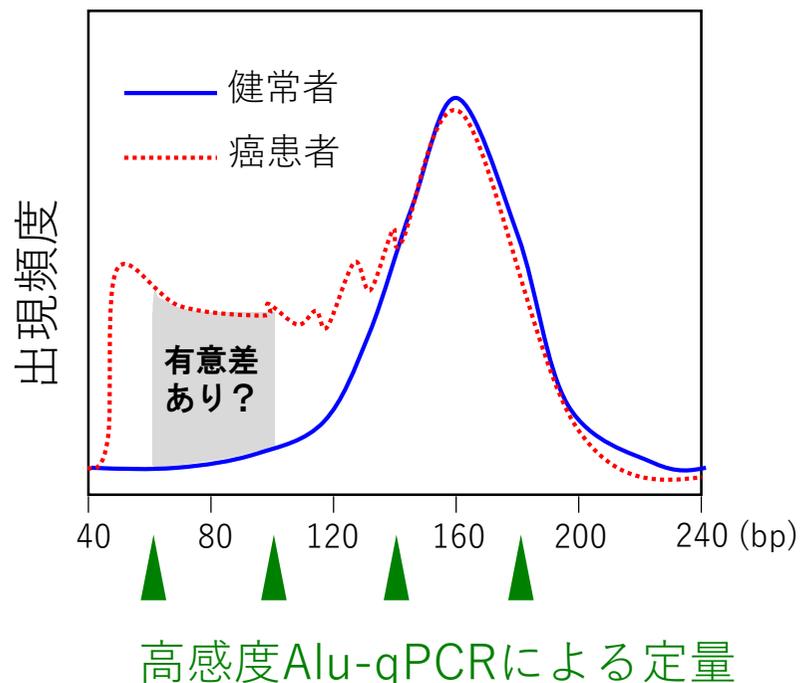
- ・細胞が破壊されて血中に放出されるDNA
- ・癌との関連性
- ・極微量 (数ng/ml血液程度)
- ・高度に断片化 (166塩基 (bp) がピーク)

## 腎細胞癌

- ・有用な腫瘍マーカーが無い
- ・再発率が数十%
- ・経過観察はCT検査が必要  
(腎機能低下、造影剤アレルギーでは造影不可)
- ・cfDNA量との関連において一定の見解が無い\*  
→cfDNA量のみでは診断が難しい

\*Lu (2016) Clin. Chim. Acta 452, 109-119等

## cfDNA量、サイズ分布との相関性は？

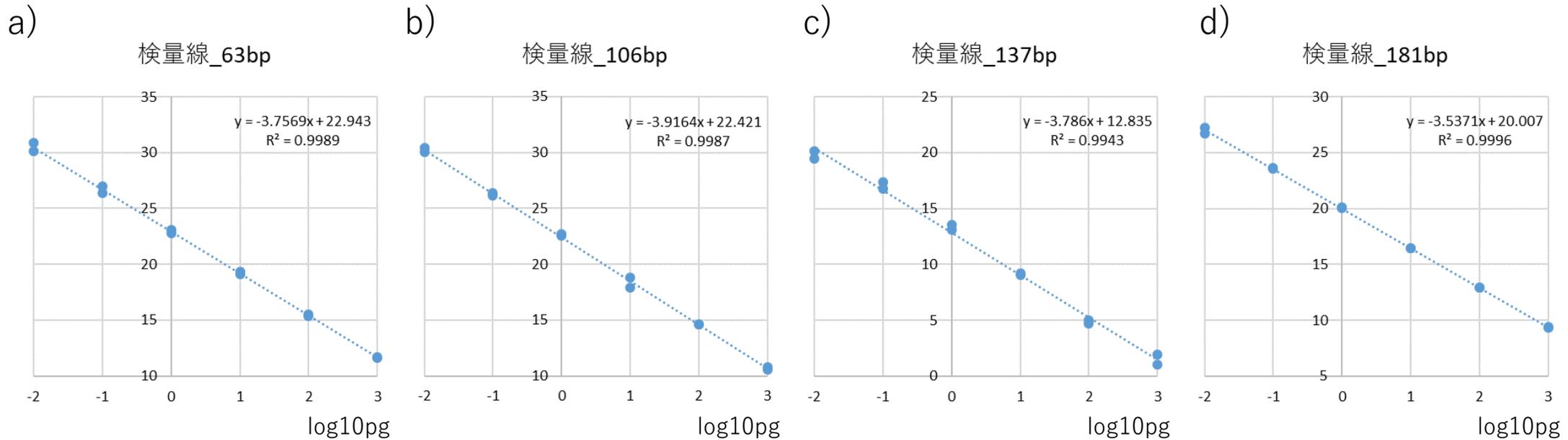


サイズ分布を定量PCRで計測可能か？



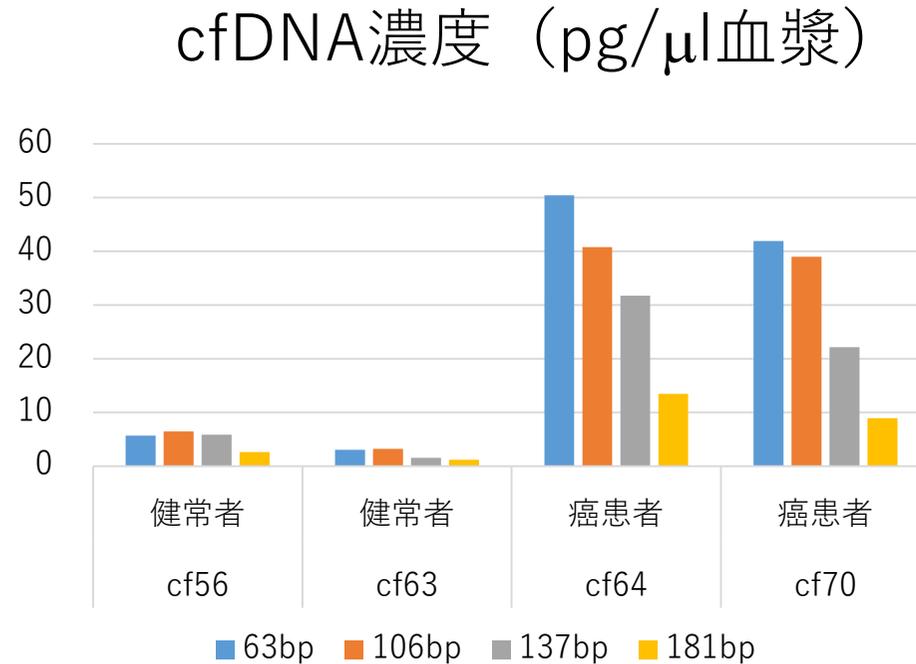
# サイズ別Alu-qPCR法の開発

63塩基、106塩基、137塩基、181塩基のプライマー・プローブによる検量線



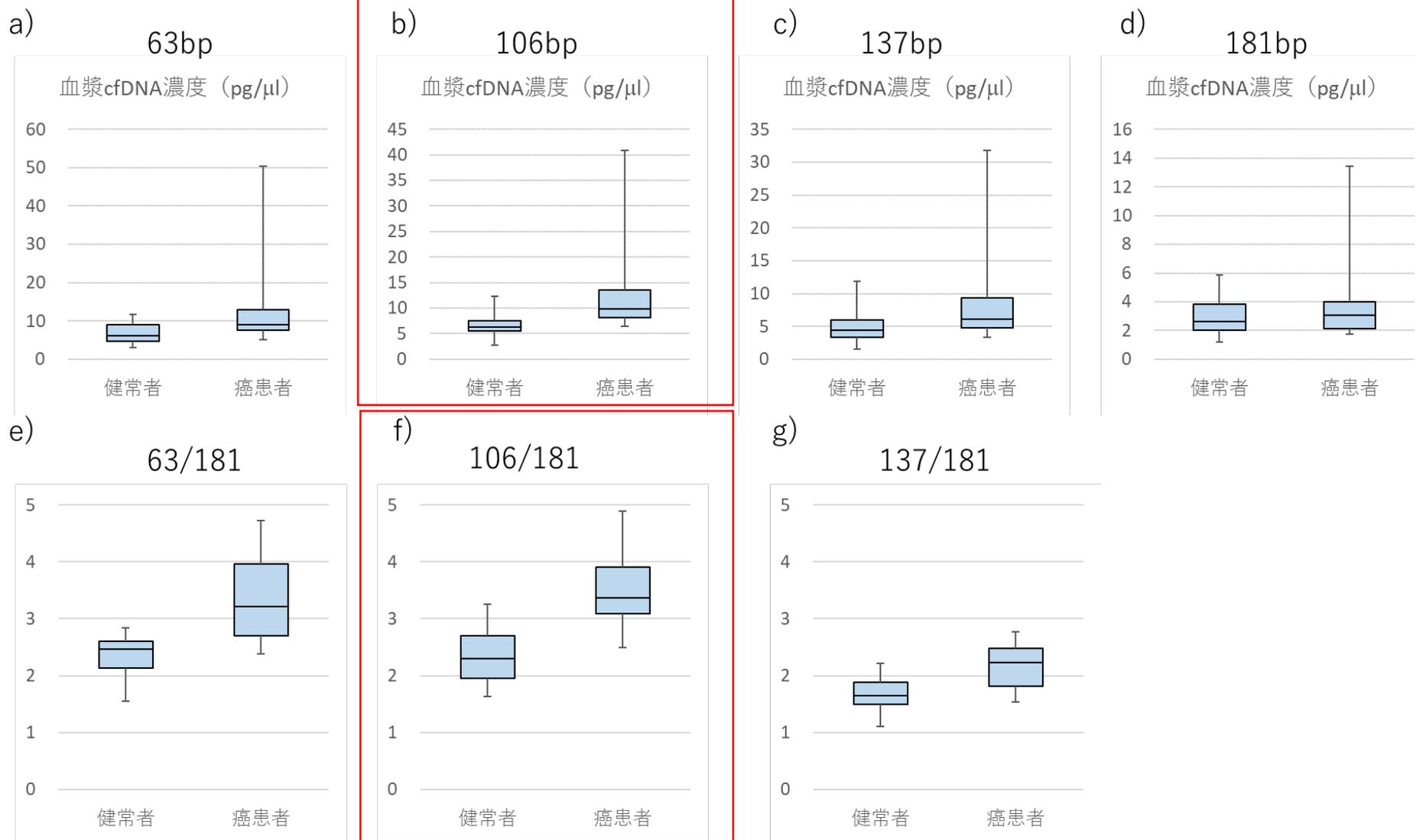
- 1ng~10fgのヒトゲノムDNA で、相関係数0.99以上の極めて直線性が高い検量線が得られた。
- 既存の技術と比較して~1,000倍の感度を有することから、数μl相当の血液に含まれるcfDNAが測定可能と考えられ、患者負担を大きく減らせる。

# サイズ別Alu-qPCRによるcfDNA定量



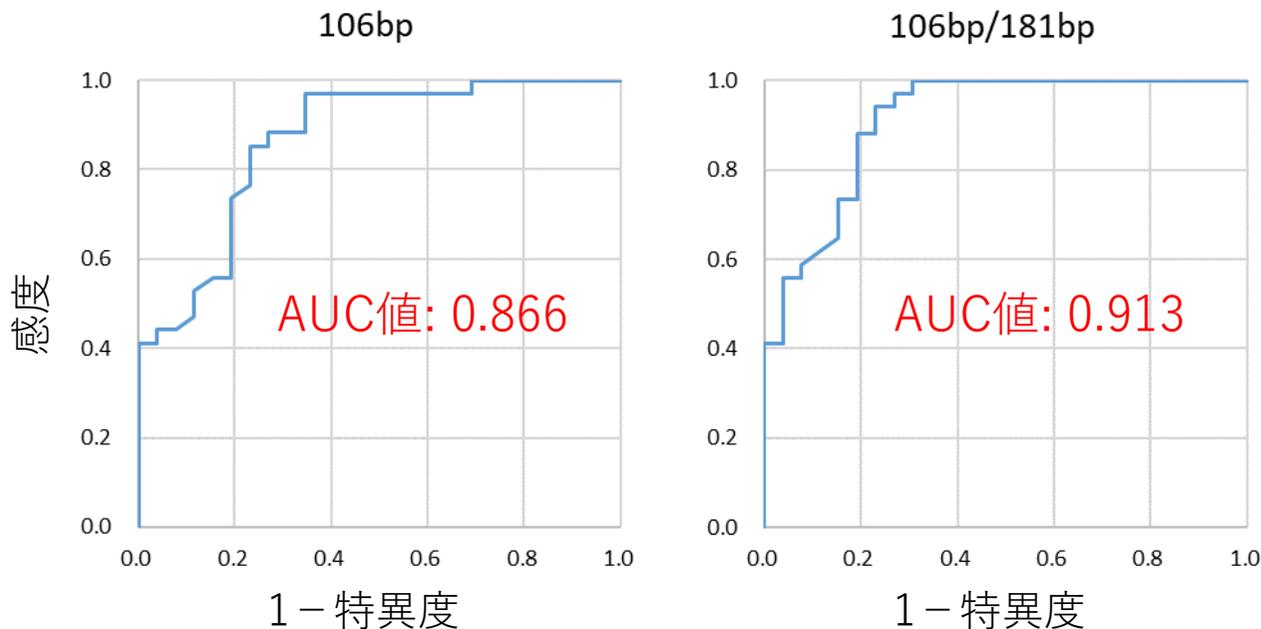
健常者2例、癌患者2例から抽出した**cfDNA**について、サイズ別Alu-qPCRによって定量した。増幅サイズの大きさに伴う測定値の減少の傾向が見られた。

# 健常者、腎細胞癌患者のサイズ別Alu-qPCR



106塩基増幅長 (106bp) によるcfDNA量、cfDNA濃度比106bp/181bpで顕著に差が認められた。

# 健常者と腎細胞癌患者の cfDNA濃度、濃度比のROC曲線



## ROC解析

- ・ 健常者と癌患者の識別を可視化
- ・ カットオフ値設定
- ・ AUC値0.8以上で有用な診断法と判断

# 腎細胞癌検出における感度と特異度の関係

106bp

感度	閾値	感度	特異度	感度+特異度
100%	5.3	1	0.308	1.308
>95%	6.6	0.971	0.654	1.625
>90%	6.7	0.912	0.654	1.566
>85%	7.8	0.853	0.769	1.622
>80%	7.9	0.824	0.769	1.593

106bpかつ106bp/181bp

感度	感度	特異度	感度+特異度
100%	1	0.769	1.769
>95%	0.971	0.923	1.894
>90%	0.882	0.923	1.805
>85%	0.765	0.962	1.726
>80%	0.706	0.962	1.667

106bp/181bp

感度	閾値	感度	特異度	感度+特異度
100%	2.71	1	0.692	1.692
>95%	2.73	0.971	0.731	1.701
>90%	2.76	0.912	0.769	1.681
>85%	2.86	0.882	0.808	1.690
>80%	2.94	0.824	0.808	1.631

## 腎細胞癌患者と健常者の識別

- ・ 感度 0.971 (33/34)
- ・ 特異度 0.923 (24/26)

# 新技術の特徴、従来技術との比較

- 特徴：
- ・超高感度ヒトゲノム/cfDNA定量法
  - ・血液検査なので侵襲度低
  - ・CT検査と比べて安価

医療ニーズ：

腎細胞癌は、有用な腫瘍マーカーがなく、再発率が数十%と高いことからCTによる経過観察が必要であるが、腎機能低下や造影剤アレルギー等の患者ではCTを適用できない。

経済・産業的ニーズ：

高齢化社会におけるCT検査の増加は、医療経済的に大きな負担である。本技術は、CT検査を補完・代替する、低侵襲で安価な検査方法となり得る。

# 実用化に向けた課題

- ・ 臨床検体を用いて本シーズの有望性を示すところまで開発済み。現在、症例数の拡大、臨床的意義の明確化に取り組んでいる。
- ・ 今後、多施設共同臨床研究（臨床性能試験）、がんの体外用診断薬の実用化に繋げるための研究開発を進める。
- ・ 実用化に向けて、コンタミや人為的エラーがない自動化機器（診断機器）の開発も検討する。

## 企業への期待

- ・ 定量PCRを用いた体外用診断薬開発に興味や実績がある企業との共同研究を希望。
- ・ 超微量ヒトゲノム定量に興味がある企業（ヒトゲノムフリー環境構築や希少ヒトゲノムのスクリーニングを実施する企業等）では、本技術の導入が有効。
- ・ 企業とともに研究費を申請、獲得し、技術移転や産学連携活動を目指した研究開発を進めたい。

# 企業への貢献、PRポイント

- ・ 本技術は、コロナ検査以外のPCR装置の用途を提供し、with/postコロナ社会変革の中で拡充されたPCR検査体制をがん診断に有効に活用する効果が期待できる。
- ・ 定量PCR機器や試薬の製造・サプライチェーンに関連する企業の持続的発展に貢献できると考えている。

# 本技術に関する知的財産権(1)

- ・ 発明の名称 : ヒトゲノムDNA検出法
- ・ 特許番号 : 特許6892695号
- ・ 出願番号 : 特願2018-554221
- ・ 出願人 : 国立大学法人秋田大学
- ・ 発明者 : 明石英雄、船越広大

## 本技術に関する知的財産権(2)

- ・ 発明の名称 : ヒトAlu検出用PCRプライマー対、ヒトAlu検出用PCRプローブ、ヒトAlu検出用PCRプライマー・プローブセット、ヒトゲノムDNAを検出及び／又は定量する方法、及び腎細胞癌の有無の予測を補助する方法
- ・ 出願番号 : 特願2022-137012
- ・ 出願人 : 秋田大学
- ・ 発明者 : 明石英雄、沼倉一幸、成田伸太郎

# 国際調査機関の見解書 (2024年10月9日)

## 1. 見解

新規性 (N)	請求項	8, 10-14	有
	請求項		無
進歩性 (IS)	請求項	8, 10-12	有
	請求項	13, 14	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求項	8, 10-14	有
	請求項		無

(3) 請求項8、10-12に係る発明は、何れの文献にも開示されておらず、新規性及び進歩性を有する。特に、所定のプライマー対及びプローブのセットを用いた血漿中のcfDNAの解析により、腎細胞癌又は前立腺癌の有無の予測を低侵襲かつ簡便に、また高い感度及び特異度で行うことが可能となる点は、何れの文献にも開示されていない。

**新規性、進歩性、産業上の利用可能性が認められた。**

# 産学連携の経歴

- 2020年 秋田県 社会課題解決型研究支援事業に採択
  - 2021年 JST A-STEPトラリアウトタイプに採択
  - 2022年 JST 新技術説明会に出展
  - 2022年 秋田県 技術イノベーション創出・活用促進事業に採択
  - 2022年 JST A-STEPトラリアウトに採択
  - 2022年 JST イノベーション・ジャパンに出展
  - 2025年 JST 新技術説明会に出展(本説明会)
- 
- 2020-2023年 国内企業N社、P社と共同研究実施
  - 2022-2024年 国内企業G社と共同研究実施

# お問い合わせ先

秋田大学  
産学連携推進機構

T E L 018-889-2712

e-mail [staff@crc.akita-u.ac.jp](mailto:staff@crc.akita-u.ac.jp)