

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09044

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた膵液網羅的遺伝子解析によるIPMN良悪性診断法の開発

研究課題名(英文)Next-generation sequencing of pancreatic juice to diagnose malignant intraductal papillary mucinous tumor

研究代表者

高野 伸一 (TAKANO, Shinichi)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：80377506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)は膵癌の前癌病変あるいは危険因子と認識され、IPMNの悪性度予測や併存膵癌の早期診断は、予後不良な膵癌の克服には重要である。本研究では最新の遺伝子解析機器である次世代シーケンスにより切除組織を解析し、悪性IPMNを決める遺伝子異常としてTP53変異やSMAD4遺伝子の欠失を同定した。これらの結果は従来の研究からも予測されていることであるが、本研究ではさらに、これらの遺伝子異常が切除組織からのみではなく、術前に採取可能な膵液からの検出を試み成功した。今後はこの研究をさらに発展させ、膵液のみならず完全に採取可能な血液での診断を目指していくこととなる。

研究成果の概要(英文)：Intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) are recognized as one of the risk factors and precursor of pancreatic cancer. To diagnose malignant IPMN before surgery, we conducted gene analysis of resected IPMN by next-generation sequencing and identified TP53 mutation and SMAD4 loss as malignant markers for IPMN. Moreover, we tried to detect these gene alterations with pancreatic juice samples which could be obtained before surgical operation, and we succeeded to detect TP53 mutations in pancreatic juice samples. In the future, we should develop methods to detect these gene alterations with blood samples.

研究分野：胆道・膵臓

キーワード：IPMN 膵液 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

(1) IPMN は膵癌の前癌病変あるいは危険因子として近年認識されている。この IPMN の良悪性診断は CT や超音波内視鏡 (EUS) などの画像診断で行われているが、いまだ十分な正診率には至っていない現状がある。特に膵疾患においては手術の術式が患者の大きな侵襲となり、確定診断がなされぬまま過大な手術侵襲あるいは経過観察したために病変が進行し手術のタイミングを逸してしまう現状がある。したがって、精度の高い良悪性診断法の開発が、予後不良な膵悪性腫瘍の克服には重要である。

(2) IPMN の良悪性診断は、最近では超音波内視鏡による結節高診断が非常に重要な位置を占めているが、ほぼコンセンサスとなっている結節高 6 mm 以上の症例を切除しても、癌でないことがしばしば経験され、より正確な診断法の開発が望まれる。

(3) 多数の遺伝子領域を同時並列的にシーケンズする革新的な次世代シーケンサーを用いた研究は近年全世界で活発に行われている。以前は困難であった複数領域の遺伝子配列の決定が短時間かつ高感度に施行することが可能となり、腫瘍以外の成分が混じる微量な臨床検体においても腫瘍由来の遺伝子変異を検出することが可能となっている。

(4) このような技術を用いて、膵癌や IPMN についても既に網羅的な Exome 解析が報告され、膵癌ではすでに知られている KRAS, TP53, p16, SMAD4 が主要な変異であることが報告され (Jones et al, 2008)、IPMN においては KRAS, GNAS, RNF43, APC などの変異が存在することが報告された (Wu et al, 2012)。しかしながら、これらの遺伝子変異の臨床的意義解明、あるいは良悪性診断や治療効果予測などの臨床応用は今後の課題である。

(5) 申請者らは最近次世代シーケンサーの技術を用い、膵切除組織および膵液から抽出した DNA の網羅的遺伝子解析および臨床因子との対比を行い、IPMN で GNAS 変異が特異的にみられることおよび GNAS 変異が IPMN の粘液高産生性に関与する可能性を報告した (Takano et al, PLoS One 2014)。

2. 研究の目的

本研究では上記の成果をさらに発展させ、次世代シーケンサーの中でも最新のハイエンドモデルを使用した網羅的遺伝子解析から悪性 IPMN に特異的な遺伝子マーカーを同定し、膵液などの臨床検体による悪性マーカーの検出法を確立することで、新しい IPMN 良悪性診断法を開発することおよび

難治性膵疾患の病態解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 検体採取(レーザーキャプチャーマイクロダイゼクション)

・切除検体や内視鏡下に得られた検体 (EUS-FNA 検体、膵液) から正確に目的組織を切り出し、DNA/RNA の抽出を行う。

・本教室は消化器内科の臨床教室であり、研究利用目的に同意書を得た臨床検体が豊富に存在する。得られた臨床検体は使用するまで -80 保存し (EUS-FNA 検体、膵液、凍結切除組織)、あるいはホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE) を用いる。

・本研究では悪性 IPMN に特異的な遺伝子変化を同定する必要があるが、これまでの研究では正常部組織の混在した検体で解析されることが多かった。特に膵組織ではわずかな腫瘍腺管の周りに豊富な線維化組織があるため、肉眼的に得た検体では腫瘍成分はわずかにしか含まれていないことになる。そのためいくら高感度な解析法を用いても真に重要なマーカーが発見されていない可能性がある。

・本研究では切除組織 (パラフィン包埋切片、凍結標本) よりレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションを用いて正確に腫瘍部と非腫瘍部を切り分け、それぞれの DNA/RNA を抽出する。

・核酸の抽出には既存の抽出キットを用いるが、効率的に DNA/RNA を抽出するために当施設では核酸抽出自動化装置を 2 台配備しており、多数の臨床検体にも対応可能である。

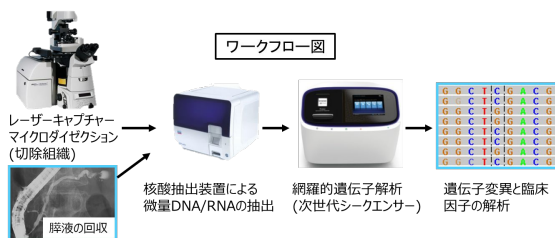
・遺伝子解析については本大学倫理委員会の承認をすでに得ている。臨床サンプルからの DNA 抽出は、得られる組織量が少ない場合があり時に困難となるが、その場合は全ゲノム増幅キット (REPLI-g Kits, QIAGEN 社など) を用いることで解決可能と考え、また腫瘍由来の DNA 量が少なければ目的の遺伝子変化も検出できないが、正確なレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションによる組織切り出しによりこれらの問題も解決可能と考えられる。

(2) 次世代シーケンサー (ハイエンド機) による遺伝子変異検索

・癌関連遺伝子変化検索を次世代シーケンサーにより網羅的に行う。検討する遺伝子変化は、遺伝子変異・copy number variation であり、必要に応じメチル化・遺伝子発現を解析する。

シーケンズ機器は Ion Proton Sequencer (Life Technologies Corp.) を用いる。これはヒトの Exome 解析は 1 日で、全 Genome 解析は 4 日間で施行することが可能で、現時点で存在する次世代シーケンサーの中ではハイエンドモデルになる。シーケンズ後の遺伝子配列の解析には、シーケンサー付属

の Torrent Suite Software や市販の解析ソフトを用いる。癌関連遺伝子変異は約 400 の癌関連遺伝子変異および既報で同定されている遺伝子を網羅的に解析することが可能であり、メチル化や遺伝子発現も従来の方法より高感度かつ高精度に解析することが可能である。これらの方法により悪性 IPMN で特異的にみられる変異を同定し、手術前に得られる膵液や EUS-FNA 検体での診断を次に試みる。



(3) 臨床データとの照合

- ・ 得られた結果と臨床データを照合し、変異の意義を解析し、良悪性診断や治療効果予測に重要な遺伝子変異の候補を選定する。
- ・ 得られた変異のみならず、関連する遺伝子(同じシグナル pathway に存在する遺伝子など)も必要に応じて候補に挙げる。

4. 研究成果

(1) 膵液の次世代シーケンサーによる悪性 IPMN 関連遺伝子の同定

【目的】悪性 IPMN を術前に診断することは重要な課題である。今回、次世代シーケンサーによる遺伝子解析から悪性 IPMN に関連する遺伝子マーカーを同定し、術前診断に利用可能な膵液での検出可能性を検討した。

【方法】IPMN の切除組織 50 例 [Low-grade dysplasia (LGD): 18 例, High-grade dysplasia (HGD): 10 例, IPMN-associated invasive cancer: 22 例] および術前の ERCP で採取可能であった膵液 19 検体を対象とした。切除組織よりレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションで精密に腫瘍部と非腫瘍部を切り抜き、抽出した DNA を用いて KRAS, GNAS, TP53, RNF43 を含む 51 遺伝子について変異と Copy number 異常について検討した。尚、悪性 IPMN は HGD 以上の病変と定義し、遺伝子解析は本大学倫理委員会の承認および対象者からの同意を得て施行した。検討 1: 悪性 IPMN で見られる遺伝子マーカーを同定し、免疫染色での確認を行った。検討 2: 得られた悪性 IPMN マーカーの膵液での検出を試みた。

【成績】切除組織の検討からは癌関連 51 遺伝子のうち KRAS (88%), GNAS (76%), SMAD4 (52%) RNF43 (42%), TP53 (38%)をはじめとする異常が検出された。結果 1: 切除組織から検出された遺伝子異常のうち、悪性 IPMN と関連していたのは TP53 ($p < 0.01$), SMAD4

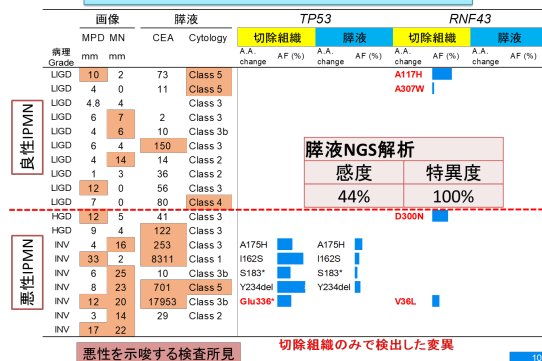
($p=0.01$)の二つであり、免疫染色の結果との一致率は TP53 ($p53$)で 84%, SMAD4 (Smad4) は 72%であった。結果 2: 膵液の検討では Copy number 異常が主となる SMAD4 遺伝子異常の検出は困難であり、変異を主体とする TP53 異常の検出が可能であった。

Histological subtype	G				FB
	LIGD	HGD	INV		
KRAS					
GNAS					
TP53					
RNF43					
SMAD4					
KMT2C					
CDKN2A					
BRAF					
PIK3CA					
RET					
APC					
ATM					
STK11					
CTNNB1					
KIT					
PTEN					
(100%)					

膵液 19 検体のうち悪性 IPMN は 9 例で、うち切除組織で TP53 変異を認めた 5 例中 4 例で膵液での遺伝子異常の検出が可能であった。

【結論】切除組織の遺伝子解析から、TP53 および SMAD4 の遺伝子異常が悪性 IPMN と関連していた。膵液で検出可能な遺伝子マーカーは変異を主体とする TP53 遺伝子異常であり、術前の IPMN 良悪性診断に寄与すると考えられた。

遺伝子マーカー(膵液)による良悪性診断



(2) 次世代シーケンサーとレーザーマイクロダイゼクションを組み合わせた IPMN 併存膵癌の高精度遺伝子解析

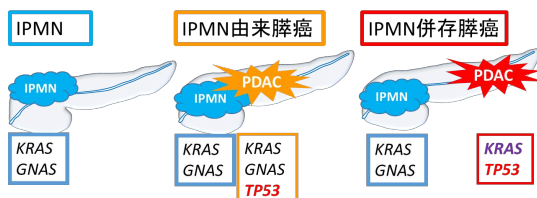
【目的】間質が多くを占める膵腫瘍組織の遺伝子解析では高純度の腫瘍由来 DNA を得る必要がある。今回、レーザーマイクロダイゼクションによる精密な組織採取法と高感度な次世代シーケンサーを組み合わせ、IPMN 由来浸潤癌 (IPMN-D) と IPMN 併存膵癌 (IPMN-C) の遺伝子背景を解析した。

【方法】対象は通常型膵癌 30 例, IPMN40 例, IPMN-D 16 例 (浸潤部・非浸潤部それぞれ 16 病変), IPMN-C 12 例 (IPMN: 5 病変, 膵癌: 12 病変) の計 98 症例 117 病変。浸潤部と非浸潤部を区別した精密な切り出し後に DNA を抽出し、KRAS, GNAS, TP53 を含む癌関連 50 遺伝子および RNF43 遺伝子の変異を次世代シーケンサーで検出した。検討 1: 癌関連 50 遺伝子変異の頻度を、通常型膵癌と IPMN-C、および IPMN と IPMN-C の IPMN 病変を比較した。

検討 2: IPMN-C の臨床病理学的特徴を検討した。検討 3: IPMN-C と IPMN 由来膵癌の浸潤部・非浸潤部の KRAS, GNAS, RNF43 遺伝子の変異パターンを検討した。

【結果】結果 1: 通常型膵癌と IPMN-C の変異は KRAS (90% vs 92%), TP53 (40% vs 50%) では差がなく, GNAS (0% vs 16.7%, p=0.02) で差を認めた。IPMN と IPMN-C の IPMN 病変では KRAS (75% vs 100%), GNAS (83% vs 100%) をはじめとし、変異頻度に差を認めなかった。結果 2: IPMN-C 12 症例中 4 例は IPMN 経過観察中に診断され、他の 8 例は同時に IPMN と膵癌が診断された。IPMN 病変は、分枝型 9 例・混合型 3 例、膵癌が IPMN 病変の尾側に位置するものは 7 例、組織が得られた IPMN 病変 5 例は全て軽から中等度異型で胃型であった。結果 3: IPMN-C と IPMN-D において、膵癌部分における GNAS 頻度は IPMN-C で低く (16% vs 50%), KRAS は同等であった (91.7% vs 100%)。RNF43 変異は IPMN-C には認めなかった (0% vs 40%)。アミノ酸変異パターンでみると、IPMN-D は浸潤部と非浸潤部の KRAS アミノ酸変異パターンがすべて一致しているのに対し、IPMN-C では 20% の一致率であった。

【結論】IPMN-C の IPMN 病変と膵癌病変の遺伝子変異は、それぞれ IPMN と通常型膵癌の遺伝子変異と類似し、IPMN-C での GNAS 変異頻度は低く、RNF43 変異は見られなかった。IPMN-D の浸潤部・非浸潤部でアミノ酸変異パターンが合致しているのに対し、IPMN-C では異なるのが特徴であった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Takano S, Fukasawa M, Kadokura M, Shindo H, Takahashi E, Hirose S, et al. Next-Generation Sequencing Revealed TP53 Mutations to Be Malignant Marker for Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms That Could Be Detected Using Pancreatic Juice. *Pancreas*. 2017. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000931 (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 早川 宏, 高野 伸一, 深澤 光晴 (2017) IPMN 良悪性診断における膵液 CEA

値・細胞診の有用性. *Gastroenterological Endoscopy* 59: 935.

2. 川上 智, 深澤 光晴, 高野 伸一, 門倉 信, 進藤 浩子, et al. (2017) IPMN 併存膵癌の診断と経過観察に有用な検査法の検討. *日本消化器病学会雑誌* 114: A779.
3. 川上 智, 深澤 光晴, 高野 伸一, 門倉 信, 進藤 浩子, et al. (2017) IPMN の手術適応と術式を再考する 混合型 IPMN の悪性度に関する検討. *膵臓* 32: 456.
4. 川井田 博充, 渡邊 光章, 細村 直弘, 雨宮 秀武, 河野 寛, 高野 伸一, et al. (2017) 当院で施行された IPMN 手術症例の検討. *日本消化器病学会雑誌* 114: A371.
5. 進藤 浩子, 深澤 光晴, 高野 伸一, 門倉 信, 高橋 英, et al. (2017) 膵嚢胞性腫瘍(IPMNを除く)に対する診断と治療の現状 膵漿液性嚢胞腫瘍の画像診断能および経過観察例の形態変化. *膵臓* 32: 452.
6. 高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸 (2017) レーザーマイクロダイセクションを併用した IPMN 由来浸潤癌と隣接併存膵癌の高精度遺伝子解析. *日本消化器病学会雑誌* 114: A413.
7. 川上 智, 深澤 光晴, 高野 伸一, 門倉 信, 進藤 浩子, et al. (2016) IPMN の術前悪性度予測および術後再発リスクに関する検討. *Gastroenterological Endoscopy* 58: 1979.
8. 今川 直人, 高橋 英, 川上 智, 廣瀬 純穂, 横田 雄大, 高野 伸一, et al. (2016) 主膵管径4mmで発見された非浸潤性膵管内腫瘍の1例. *山梨医学* 43: 191.
9. 高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸 (2016) 膵嚢胞性腫瘍の集学的医療 IPMN 集学的医療における膵液次世代シーケンズ解析のインパクト. *日本消化器病学会雑誌* 113: A113.
10. 高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸 (2016) IPMN 併存膵癌における諸問題と対策 次世代シーケンサーとレーザーマイクロダイセクションを組み合わせた IPMN 併存膵癌の高精度遺伝子解析. *日本消化器病学会雑誌* 113: A611.
11. 高野 伸一, 深澤 光晴, 進藤 浩子, 高橋 英, 横田 雄大, et al. (2015) 膵疾患の分子病態 Basics and Applications レーザーマイクロダイセクションと次世代シーケンサーによる IPMN 関連膵癌遺伝子解析. *膵臓* 30: 268.
12. 高野 伸一, 深澤 光晴, 佐藤 公, 榎本 信幸 (2015) 【生検を極める】膵液を用いた膵腫瘍(IPMN)の診断と癌遺伝子解析. *消化器内視鏡* 27: 1041-1044.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 伸一 (TAKANO, Shinichi)

山梨大学・大学院総合研究部・特任講師
研究者番号: 80377506

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
榎本 信幸 (ENOMOTO, Nobuyuki)
山梨大学・大学院総合研究部・教授
研究者番号：20251530