

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19301

研究課題名(和文) 超音波内視鏡下経穿刺針的のう胞壁生検による膵のう胞性腫瘍の新たな診断法の確立

研究課題名(英文) Endoscopic ultrasound-guided through-the-needle-biopsy for the diagnosis of pancreatic cystic neoplasms

研究代表者

川久保 和道 (Kawakubo, Kazumichi)

北海道大学・医学研究科・助教

研究者番号：80633578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1例は71才女性、膵頭部に3.2mm大の嚢胞性病変に対し、EUS-TNCBを施行。硝子化した繊維結合間質とともに、淡抗酸性の胞体と小型の核を有する腺上皮が断片化して出現しており、粘液は目立たなかった。免疫組織学的には、Ki67陽性細胞は判然とせず、p53は少数弱陽性を呈していた。もう1例は、48才男性、膵体部に2.0mm大の嚢胞性病変を認め、内部に結節を疑う病変があった。同部位に対しEUS-TNCBを施行。組織学的には、末梢血および既存の腺房組織とともに、繊維性結合間質が採取されていた。同検体からの、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析では、主要な遺伝子変異は検出されなかった。

研究成果の概要(英文)：Endoscopic ultrasonography-guided through-the-needle cyst wall biopsy (EUS-TNCB) was performed in two patients. A 71-year-old female had 3.2mm cystic lesion in the head of the pancreas. EUS-TNCB revealed fragmented epithelial cells with small nucleus with interstitial fibrotic tissue. A 48-year-old male had 2.0mm cystic lesion in the body of the pancreas. EUS-TNCB revealed no epithelial cells but interstitial fibrotic tissue. Gene mutation analysis by next-generation sequencer could not detect any mutation in both samples.

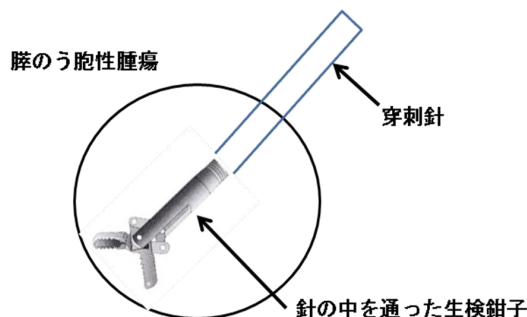
研究分野：膵嚢胞性腫瘍

キーワード：膵嚢胞性腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

本邦では、年間約3万人の膵臓がんの罹患数があり、近年増加傾向である。しかも、年間罹患数と死亡数が等しく難治癌の代表であり、安全で有効な診断法および治療法の確立が望まれる。申請者らは、膵のう胞性腫瘍の中で最も頻度の高い、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN; intraductal papillary mucinous neoplasm) 患者の前向き観察研究を行い、同疾患が膵発癌の高危険群であることを報告してきたが (Kawakubo K et al. Gut 2011.)、従来の臨床的手法では膵発癌の超高危険群の同定、早期発見は困難である。しかし、一方では、膵のう胞性腫瘍は CT や MRI といった画像による診断では、約 20% と高い確率で間違った診断により、外科的に手術されていたという報告がある。つまり、現在のところ膵のう胞性腫瘍と診断することはできても、正確な組織診断および悪性度診断は困難と言わざるを得ない。したがって、画像診断を凌駕するような、新たな診断方法の開発が求められている。近年、膵腫瘍性病変に対する超音波内視鏡下穿刺吸引法 (EUS-guided fine needle aspiration; EUS-FNA) の技術が確立し、自施設を始めその有用性が数多く報告されるようになってきた。この技術を応用することで、従来までは外科的に切除することでは膵のう胞性腫瘍の組織を得ることができなかったものが、低侵襲で、直接採取することが可能になり、膵のう胞性腫瘍の確定診断に有用なのではないかと考えられた (下図 EUS-TNCB: EUS-guided Through the Needle Cyst wall Biopsy; 超音波内視鏡下経穿刺針的膵のう胞壁生検)。さらに、得られた検体から、DNA を抽出し遺伝子の変異解析を行うことにより、膵のう胞性腫瘍の病態解析につながる、画期的な診断方法につながるのではないかと考えられた。

申請者らは、次世代シーケンサーを用いた EUS-FNA で得られた微小な膵腫瘍組織の遺伝子解析を多数行っており、従来のダイレクトシーケンス法では検出できないような頻度の遺伝子変異の解析に成功している (Kubota Y, Kawakubo K, et al. Journal of Gastroenterology 2015.)。これらの技術を組み合わせることにより、膵のう胞性腫瘍の組織学的診断、病態解明が可能になると考えた。



### 2. 研究の目的

- (1) 超音波内視鏡下、経穿刺針的に直接、膵のう胞性腫瘍の組織を採取し、病理専門医により、組織学的評価が可能であるか調べる。本法は、従来の EUS-FNA と同様の技術で可能であるが、全く新しい方法であり、当院自主臨床研究審査委員会での承認を得てから、臨床試験として行う。
- (2) 超音波内視鏡下経穿刺針的のう胞壁生検 (EUS-TNCB) で得られた、膵のう胞性腫瘍の組織から、DNA を抽出、がん関連遺伝子のキャンサーパネルを作成し、Ion PGM™ シーケンサーにてがん関連遺伝子の網羅的解析を行う。
- (3) 上記で得られた、病理学的診断と遺伝子網羅的解析結果を対比することで、その悪性度や予後など膵のう胞性腫瘍の病態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 北海道大学病院において通院中の膵のう胞性腫瘍の患者から、患者本人より同意取得の後、EUS-TNCB を行い、膵のう胞性腫瘍の組織を採取する。
- (2) 採取された検体について、通常の Hematoxylin & Eosin 染色により、組織学的評価を行う。
- (3) EUS-TNCB による、膵のう胞性腫瘍の組織採取が困難な場合は、経乳頭的にアプローチにより、膵のう胞性腫瘍の組織採取を試みる。
- (4) 上記で得られた検体から、DNA を抽出する。
- (5) 次世代シーケンサーでの解析用に、Ion AmpliSeq™ Cancer Panel Kit を用い library を増幅、Template 作成後、Ion PGM™ シーケンサー (Thermo Fisher Scientific 社製) にてがん関連遺伝子 (18 遺伝子 220 領域、KRAS, TP53, SMAD4, CDKN2A/p16, GNAS, RNF43, PIK3CA, BRAF, STK11, IDH1, CTNNB1, MAP2K4, TGFBR1, TGFBR2, ARID1A, SF3B1, RBM10, KDM6A) の網羅的解析を行う。
- (6) K-ras 遺伝子変異には、KRAS コドン 12/13 周辺の約 100 bp の領域に関して、コドン 12/13 が正しい塩基のプロープと変異型の塩基のプロープ (G12C/D/V/A/R/S, G13C/D の 8 種類) を設計し、ddPCR™ Supermix for probes (BioRad 社) をポリメラーゼ Primer Mix として、QX200™ Droplet Digital™ PCR System (BioRad 社) を用いた、デジタル PCR にて Validation を行った。

### 4. 研究成果

- (1) 超音波内視鏡下経穿刺針的のう胞壁生検

(EUS-TNCB)による組織診断

超音波内視鏡下経穿刺的嚢胞壁生検 (EUS-TNCB) を2例に施行。1例は71才女性、膵頭部に32mm大の嚢胞性病変に対し、EUS-TNCBを施行。硝子化した繊維結合間質とともに、淡抗酸性の胞体と小型の核を有する腺上皮が断片化して出現しており、粘液は目立たなかった。免疫組織学的には、Ki67陽性細胞は判然とせず、p53は少数弱陽性を呈していた。明らかな悪性所見は認めず、術後2年経過を見ているが、嚢胞性腫瘍の増大はなく、また、膵悪性疾患は認めていない。もう1例は、48才男性、膵体部に20mm大の嚢胞性病変を認め、内部に結節を疑う病変があった。同部位に対しEUS-TNCBを施行。組織学的には、末梢血および既存の腺房組織とともに、繊維性結合間質が採取されていた。検体中、明らかな悪性所見は認めず、術後1年経過を見ているところ、やはり、嚢胞内に結節を疑う病変を認め、外科的切除を行う方針となった。両病変とも、EUS-TNCBでは、繊維性結合間質が多く採取されており、膵の嚢胞性腫瘍の質的診断は、十分であるとは言えない。

(2) 検体を用いた遺伝子変異解析

EUS-TNCBで得られた2例のうち、1例は検体量が足りずに、遺伝子変異解析を行う事ができなかった。残りの1例と、経乳頭の生検を行った3例の、合わせて4例から、DNAを抽出し、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を行った。(下表)

Case	1	2	3	4
Age	48	84	56	64
Sample	EUS-TNCB	生検	生検	生検
Qubit (ng/ul)	<0.05	2.28	21.3	27.5
Mean Depth	2,253	2,698	3,418	2,870
Uniformity (%)	92.68%	94.97%	93.95%	94.75%
Target base coverage at 100x (%)	98.14%	98.77%	99.19%	98.50%
Target base coverage at 500x (%)	92.27%	95.71%	98.39%	95.21%
Mut (Custom panel)	N.D	N.D	N.D	N.D
KRAS mut by ddPCR	N.D	N.D	N.D	N.D

表に示すように、今回、解析を行った検体からは、Custom panelを用いた遺伝子変異は検出されなかった。また、デジタルPCRによるK-ras遺伝子変異のバリデーションを行ったが、変異を検出することができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kawakubo K, Ohnishi S, Fujita H, Kuwatani M, Onishi R, Masamune A, Takeda H, Sakamoto N. Effect of Fetal Membrane-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rats With Acute and Chronic Pancreatitis. *Pancreas*. 45,707-13,2016.

Kawakubo K, Kawakami H, Kuwatani M, Haba S, Kudo T, Taya YA, Kawahata S, Kubota Y, Kubo K, Eto K, Ehira N, Yamato H, Onodera M, Sakamoto N. Lower incidence of complications in endoscopic nasobiliary drainage for hilar cholangiocarcinoma. *World J Gastrointest Endosc*. 8,385-90,2016.

Kawakubo K, Ohnishi S, Hatanaka Y, Hatanaka KC, Hosono H, Kubota Y, Kamiya M, Kuwatani M, Kawakami H, Urano Y, Sakamoto N. Feasibility of Using an Enzymatically Activatable Fluorescence Probe for the Rapid Evaluation of Pancreatic Tissue Obtained Using Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration: a Pilot Study. *Mol Imaging Biol*. 18,463-71,2016.

Kawakubo K, Kawakami H, Kuwatani M, Kubota Y, Kawahata S, Kubo K, Sakamoto N. Endoscopic ultrasound-guided choledochoduodenostomy vs. transpapillary stenting for distal biliary obstruction. *Endoscopy*. 48,164-9,2016.

〔学会発表〕(計3件)

Mizukai Y, Ono Y, Karasaki H, Ogata M, Sugitani A, Koizumi K, Asahara S, Kawakubo K, Takahashi K, Maguchi H, Nagashima K. Liquid Biopsy for early detection of pancreatic cancer. APA2016, 2016/10/27, Boston (USA).

Kawakubo K, Yane K, Eto K, Ishiwatari H, Ehira N, Haba S, Matsumoto R, Shinada K, Yamato H, Kudo T, Onodera M, Okuda T, Taya Y, Kawahata S, Kubo K, Kubota Y, Kuwatani M, Kawakami H, Katanuma A, Ono M, Hayashi T, Uebayashi M, Sakamoto N. Risk of bleeding after endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration for patients with antithrombotic agents; a prospective multicenter study. DDW2016, 2016/5/21, SanDiego(USA).

Kubota Y, Kawakami H, Natsuiizaka M, Kuwatani M, Kawakubo K, Abe Y, Kawata

S, Kubo K, Sakamoto N. Mutational Analysis of Pancreatic Neuroendocrine Tumor Using Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration and Next-Generation Deep Sequencing. DDW2015, 2015/5/9, Washington D.C.(USA).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川久保 和道 (KAWAKUBO Kazumichi)  
北海道大学大学院・医学研究科・内科学講座・消化器内科学分野・助教  
研究者番号： 80633578

### (4) 研究協力者

三橋 智子 (MITSUHASHI Tomoko)  
北海道大学病院・病理診断部/病理部・准教授

水上 裕輔 (MIZUKAMI Yusuke)  
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・准教授

小野 裕介 (ONO Yusuke)  
札幌東徳洲会病院・附属臨床研究センター・臨床生体情報解析部

栞谷 将城 (KUWATANI Masaki)  
北海道大学病院・光学医療診療部・助教