

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05417

研究課題名(和文) 膵癌の新たな転移・再発機序の解明；膵管内播種に着目して

研究課題名(英文) Study on novel metastatic mechanism in pancreatic cancer focusing on intraductal dissemination

研究代表者

大塚 隆生(OHTSUKA, Takao)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20372766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌前駆病変として知られる主膵管型膵管内乳頭粘液性腫瘍の異字性残膵癌と初回切除膵癌の分子生物学的特徴を病理組織学的、遺伝子変異様式、mRNA発現様式から比較した。特徴として初回尾側膵病変が残膵頭部に異字性病変が発生する様式が多く、MUC免疫染色による形質様式とKRAS/GNAS遺伝子変異形式が一致し、mRNAマイクロアレイでもmRNA発現様式が類似することから、膵癌細胞が膵液の流れに乗って、膵管内播種を来すことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌細胞が膵液の流れに乗り、膵管内を移動して主病変とは離れたところに生着することを示した報告はこれまでなく、本研究で膵癌の新たな進展形式を示した。また、本研究結果により膵癌切除後には肝、リンパ節、腹膜などの遠隔臓器への転移のみならず、残膵にも注意を払う必要があることが示された。また膵管内播種を来しやすい病変に対しては、初回手術時に膵全摘術を選択するオプションを示す必要があるなど、実臨床に直結し、膵癌の予後改善が得られる社会的意義とともに、膵癌の悪性度評価を行う際の新たな指標を得る学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Main duct intraductal papillary mucinous neoplasm (MD-IPMN) of the pancreas, known as precursor lesion of the pancreatic cancer, often has metachronous lesion in the remnant pancreas after partial pancreatectomy for primary lesion. This study demonstrated that metachronous lesion has same pathological subtype, same KRAS/GNAS mutational status, and similar expression pattern of mRNA assessed by microarray, compared with the primary lesion. These results indicate that cancer cells might have monoclonal skip progression via intraductal spread mechanism. In addition, after resection of MD-IPMN, we should also focus on the remnant pancreas as well as liver, lymph node, and peritoneum to detect the possible development of metachronous lesion.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 IPMN 膵管内播種 転移 再発

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

主膵管型膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)切除後の残膵に類似した病変が異時性に発生することについて報告されているが、この病変の病理学的特徴をみると 1. 悪性 IPMN→悪性 IPMN、2. IPMN 組織亜型は同一(腸型→腸型、胆膵型→胆膵型)、3. 尾側膵→膵頭部と、膵液の流れに乗って初回の尾側膵悪性病変が膵頭部に生着して発症した可能性を想起させる所見が得られている。さらに遺伝子変異解析を行うと、初回病変と再発病変は同一の *GNAS/KRSA* 変異形態を有しており、膵管内播種を支持する所見も得られている。しかし病理組織学的所見と2種類の遺伝子解析のみで腫瘍の同一性を決定するとは困難であり、網羅的な遺伝子解析を行い、さらに *in vivo* の実験により実際に膵管内播種が起こりうることを示した上で論じる必要がある。一方、通常型膵癌も最近では早期診断例が増えてきており、根治切除後の経過観察中に第二の通常型膵癌が残膵に発生することもしばしば経験するようになった。我々はこれまで早期の膵癌の診断契機と膵液細胞診を利用した早期診断法に関する報告してきており、その中で多くの異時性多発通常型膵癌も経験してきた。しかし、異時性病変が初回病変の再発であるか、別の多中心性発癌であるかは明らかにされてきておらず、またどういった膵癌が再発しやすいかの危険因子についても十分に解明されていない。これまで膵癌の膵管内播種の可能性については時に論じられてきたが、まとまった症例数での臨床病理学的検討や分子生物学的解析は行われておらず、想像の域を出ていなかった。当該施設が IPMN 切除例を多数経験していることから、主膵管型 IPMN や IPMN 併存膵癌の切除後残膵に発生した第二の膵癌を多く経験しており、その残膵発癌のメカニズムの解明と高危険群の同定が重要であることを認識し、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では以下のことを明らかにすることを目的とする。

1. 初回 IPMN 由来膵癌と異時性 IPMN 由来膵癌の網羅的遺伝子解析による相同性の検討
2. 異時性 IPMN 由来浸潤膵癌の特徴(初回病変と比較して遊走能、接着因子発現の違い)
3. 通常型膵癌異時性残膵再発例の臨床病理学的検討と分子生物学的解析
4. 膵管内播種モデルの作成
5. 残膵再発高危険群の同定と早期診断法開発

具体的には膵癌膵管内播種のメカニズムを網羅的マイクロアレイと *in vitro* モデルを作成して証明し、これにより得られた遺伝子マーカーを用いた膵癌早期診断法を開発する。膵癌初回切除標本と残膵再発病変の新鮮凍結切片より RNA を抽出してマイクロアレイでその相動性を調べる。またその中で膵管内播種に関連する機能として遊走能と浸潤能に着目し、上皮間葉転換(EMT)に関連した遺伝子異常を同定する。この異常遺伝子を利用して膵癌膵管内播種モデルを作成し、さらに膵液中の遺伝子マーカーを用いた残膵膵癌の早期診断法の開発を目指す。

3. 研究の方法

初回 IPMN 由来膵癌と異時性 IPMN 由来膵癌の網羅的遺伝子解析による相同性の検討については、同一膵内に発症し切除された初回 IPMN 由来膵癌と異時性 IPMN 由来膵癌の凍結切片およびパラフィン包埋(FFPE)切片を用いた解析を行う。凍結切片から抽出した RNA を用いて、隣接する正常膵組織をコントロールとして約 40,000 の遺伝子の過剰発現と発現抑制をマイクロアレイで網羅的に解析し、初回病変と異時性病変の比較を heatmap ならびに hierarchical cluster 解析により可視的に行う。さらに客観的な指標として Pearson 係数と Spearman 係数、発現量に差がある遺伝子数を算出する。Pearson 係数と Spearman 係数が高く、遺伝子数が少ないほど相動性が高いことを示す。また IPMN の組織亜型分類に必要な *MUC1*, *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC6*, *CDX* の発現解析を、FFPE を用いた免疫染色法で行う。特に *MUC2* の染色性が重要であり、*MUC2* 陽性が腸型 IPMN、*MUC2* 陰性が非腸型(主に胃型、胆膵型)となり、IPMN 組織亜型分類の基本となる。さらに *KRAS/GNAS* 変異の解析も併せて行う。IPMN における *KRAS* 変異は Codon 12, 13、*GNAS* 変異は codon 201 に起こることがわかっており、これをコードする配列を含む exon のシーケンスを行うようプライマーを設計する。DNA は安定性の問題から凍結切片から抽出し、感度の高い Competitive allele specific TaqMan PCR 法で配列のシーケンスを行い、変異の有無を確認する。またマイクロアレイで過剰発現が確認された遺伝子については、定量的 PCR 法で mRNA 発現量を可視的に確認し、さらに蛋白発現量を免疫染色法で確認する。特に IPMN 非浸潤癌において初回病変と異時性病変の分子生物学的相動性が示され、さらに初回病変が膵体尾部で異時性が残膵頭部にある場合には、膵管内播種の重要な証左となる。

異時性 IPMN 由来浸潤癌の特徴(初回病変と比較して遊走能、接着因子発現能の違い)については、マイクロアレイでは遺伝子の機能ごとに発現量を比較する。この中で膵管内播種に関連する機能として細胞遊走能や細胞接着能に注目し、関連する遺伝子発現が高い腫瘍を膵管内播種高危険群と判断し、その関連遺伝子を残膵転移再発予測マーカーとする。後の膵管内播種再発を来しやすい高危険群の診断法へ向けて、候補となる遺伝子を定量的 PCR 法、ウエスタンブロット法で同定する。さらに IPMN 由来膵癌細胞株 BXP3 を用いて、候補遺伝子の導入を行い、遊走能や接着能を調べる。本来はマウスによる *in vivo* の検討が望ましいが、マウスの膵管は極めて細く現実的には遂行不能であるため、*in vitro* で代用する。

通常型膵癌異時性残膵再発例の臨床病理学的検討と分子生物学的解析については、通常型膵癌（非浸潤癌）をマイクロアレイ法で初回病変と異時性病変の網羅的遺伝子解析を行い、同様の方法で相動性を調べ、過剰発現を認める遺伝子で代表的なものの validation を定量的 RT-PCR 法、ウエスタンブロット法で行う。また機能面から異時性病変で遊走・接着に関する遺伝子の発現上昇に着目して解析する。通常型膵癌では *GNAS* 遺伝子変異をほとんど認めないため、*KRAS*(codon 12, 13)と *p53* の遺伝子変異解析を行い、2つの病変の相動性について検討する。またマイクロアレイで検出された遺伝子を膵癌細胞株に導入し、遊走・接着能などの膵管内播種に関連した機能解析を行う。

動物を用いた vivo モデルは、膵管径が非常に細く膵管内への細胞株導入自体が困難であるため、*in vitro* モデルを作成する。正常膵管上皮細胞株をシート状に生着させ、培養液内に膵癌細胞株を播いて、24~48時間後に培養液を洗浄し接着した癌細胞数をカウントしていく。浮遊細胞の接着には上皮間葉転換(EMT)が関与していることが予想されるため、EMT 誘導遺伝子である *vimentin* や *fibronectin* を IPMN 由来膵癌細胞株 BXPC3 に誘導し、接着能を遺伝子非誘導細胞株と比較する。

膵癌術前の確定診断には超音波内視鏡下生検(EUS-FNA)や内視鏡的膵管造影(ERP)下膵液細胞診が行われるが、腫瘍を形成しない極めて早期の膵癌診断や穿刺に伴う播種予防の観点からは ERP 下膵液細胞診が優れる。代表者はこれまで膵液中の分子マーカーを用いた膵癌早期診断や膵癌発症高危険群の同定に関する研究を多数行ってきた。この際に採取し凍結保存した膵液を用いて膵癌残膵再発高危険群の同定と早期診断法の開発を行う。残膵再発高危険群のマーカーとして膵液中の *GNAS* 変異、*MUC2*、*vimentin*、*fibronectin* を検索する。*GNAS* 変異は感度の高い次世代シーケンサーで、他のマーカーは RT-PCR もしくは cell block の免疫染色法を用いる。*GNAS* 変異と *MUC2* は腸型 IPMN 由来の粘液癌のマーカーで主膵管型 IPMN に多い組織亜型であり、*vimentin* と *fibronectin* は EMT のマーカーである。膵癌患者の膵液中マーカーを測定し、先の4つのいずれかのマーカー上昇群にのちの残膵再発例が含まれていれば残膵再発高危険群とみなすことができる。さらに残膵再発切除時に採取した膵液中で4つのマーカーのいずれかが上昇していれば、これを膵癌残膵再発の早期診断につなげることができる。すなわち高危険群に対して定期的に膵液採取/細胞診を行うことで、早期に膵癌を診断できることが期待できる。あるいは初回手術時に残膵再発高危険群が判明していれば、一期的に予防的膵全摘術を行うことも考慮される。マーカー測定は最終的にはキットによる簡便な方法を開発する予定である。

4. 研究成果

膵癌前駆病変として知られる主膵管型膵管内乳頭粘液性腫瘍の異字性残膵癌と初回切除膵癌の分子生物学的特徴を病理組織学的、遺伝子変異様式、mRNA 発現様式から比較した。特徴として初回尾側膵病変が残膵頭部に異字性病変が発生する様式が多く、MUC 免疫染色による形質様式と *KRAS*/*GNAS* 遺伝子変異形式が一致し、mRNA マイクロアレイでも mRNA 発現様式が類似することから、膵癌細胞が膵液の流れに乗って、膵管内播種を来すことが示された。膵癌細胞が膵液の流れに乗り、膵管内を移動して主病変とは離れたところに生着することを示した報告はこれまでなく、本研究で膵癌の新たな進展形式を示した。また、本研究結果により膵癌切除後には肝、リンパ節、腹膜などの遠隔臓器への転移のみならず、残膵にも注意を払う必要があることが示された。また膵管内播種を来しやすい病変に対しては、初回手術時に膵全摘術を選択するオプションを示す必要があるなど、実臨床に直結し、膵癌の予後改善が得られる社会的意義とともに、膵癌の悪性度評価を行う際の新たな指標を得る学問的意義がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Gotoh Y, Ohtsuka T, Nakamura S, Shindo K, Ohuchida K, Miyasaka Y, Mori Y, Mochidome N, Oda Y, Nakamura M. Genetic assessment of recurrent pancreatic high risk lesions in the remnant pancreas: metachronous multifocal lesion or local recurrence? *Surgery*, 165(4); 767-74, 2019, 査読有
DOI: 10.1016/j.surg.2018.10.025

Date K, Ohtsuka T, Nakamura S, Mochidome N, Mori Y, Miyasaka Y, Oda Y, Nakamura M. Surveillance of patients with IPMN with and without pancreatectomy with special reference to the incidence of concomitant pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surgery*, 163(2): 291-9, 2018, 査読有
DOI: 10.1016/j.surg.2017.09.040

Date K, Ohtsuka T, Fujimoto T, Tamura T, Kimura H, Matsunaga T, Mochidome N, Miyazaki T, Mori Y, Oda Y, Nakamura M, Tanaka M. Molecular evidence for monoclonal skip progression in MD-IPMNs of the pancreas. *Ann Surg*, 265(5); 969-77, 2017, 査読有
DOI:10.1097/SLA.0000000000001755

Matsunaga T, Ohtsuka T, Asano K, Kimura H, Ohuchida K, Kitada H, Ideno N, Mori Y, Tokunaga S, Oda Y, Guha S, Raimondo M, Nakamura M, Tanaka M. S100P in duodenal fluid is a useful diagnostic marker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*, 46(10); 1288-95, 2017, 査読有
DOI:10.1097/MPA.0000000000000940

〔学会発表〕(計 3 件)

Ohtsuka T, Tanaka M, Nakamura M. Cyst Management. Indication of surgery; Branch duct. Pancreas 2018. April 27th, 2018, USA.

Ohtsuka T. Management of IPMN based on IAP consensus guidelines. 13th International HepatoPancreatoBiliary Association World Congress. September 6th, 2018, Switzerland.

大塚隆生、宮坂義浩、中村雅史: 分子マーカーによる IPMN 由来癌と併存通常型膵癌の鑑別. 第 25 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2017)、2017 年, 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 宮坂 義浩

ローマ字氏名: (MIYASAKA, yoshihiro)

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 大学病院

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 40507795

(2016 年度)

研究分担者氏名: 森 泰寿

ローマ字氏名: (MORI, yasuhisa)

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 大学病院

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 50632642

(2016 年度)

研究分担者氏名：森山 大樹

ローマ字氏名：(MORIYAMA, taiki)

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 70586859

(2016年度)

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。