

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09451

研究課題名(和文) 若年発症膵癌の分子構造

研究課題名(英文) Genetic alterations in early-onset pancreatic cancer

研究代表者

笹島 順平 (Sasajima, Junpei)

旭川医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：80451467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵癌発症の危険群特定に予測に役立つ新規の感受性遺伝子探索を目的に、50歳未満で発症した日本人膵癌患者52例を対象に、生殖細胞系列の全エクソーム解析を行った。その結果、日本人膵癌に特有な感受性遺伝子を3つ同定した。また、公開されているUT Southwestern Medical Centerにおける109例の膵癌体細胞変異情報の再解析により、50歳未満の若年発症例で、有意に多いコピー数変異を特定した。上記日本人コホートのうち、外科切除を行い腫瘍・正常組織ペアの解析が可能であった例と、70歳以上の発症例とを比較した結果、このコピー数変異は、若年発症群に有意に多く検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の発症年齢中央値は70歳台前半であるが、30-40歳台の若年発症を稀に見る。これまでに、BRCA1/2, CDKN2A, STK11など、複数の膵癌感受性遺伝子が一部同定されており、ゲノム異常の全貌を明らかにすることは、膵癌の高危険群を特定する重要な情報と考えられる。自験例から得た新規の膵癌感受性遺伝子に関する情報、及び既存データベースの再解析結果を基に、膵癌発症の高危険群を絞り込むためのアルゴリズムを構築し、その臨床的な意義を今後検証する。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine novel genetic alterations that are useful for predicting the onset of pancreatic cancer. Fifty-two early-onset Japanese pancreatic cancer patients who developed the disease under the age of 50 were enrolled, and exome sequencing was performed to identify pathogenic germline variants. Three potential susceptibility genes were found. A reanalysis of publicly available somatic mutation data, including 109 cases from UT Southwestern Medical Center, identified a significant number of copy number mutations in young-onset cases. Using tumor-normal tissue pair from our Japanese cohort, we validated the abnormality was more frequently observed in the early onset cases relative to average aged patients. Our findings will support the algorithm's basis to predict subjects who are at high risk of developing pancreatic cancer.

研究分野：消化器内科、がんゲノム、遺伝学

キーワード：膵癌 感受性遺伝子 若年発症

1. 研究開始当初の背景

難治がんの克服は、対がん政策における最重要課題である。特に膵癌は生存率の著しい改善がみられず、バイオマーカー探索や創薬に繋がる新情報を得て、早急に診断・治療戦略を見直す必要がある。特にリスク管理の具体的手段を得てがん精密医療を実現するため、膵癌を分子ネットワークレベルで再分類する必要性を考える。

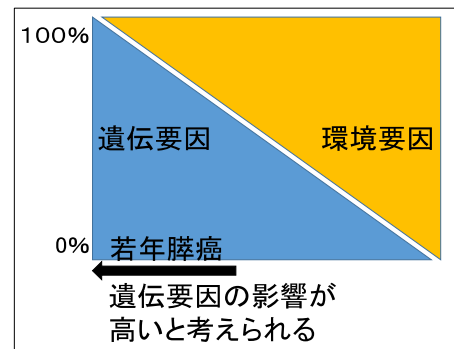
癌は多数の遺伝的要因と環境要因が複雑に関与して発生する多因子疾患である(図 1)。癌の罹患率は年齢とともに増加するが、稀にみる若年発症例は遺伝的素因をより濃厚に保有していると予測される。膵癌のリスクファクターには、膵炎や糖尿病などの基礎疾患、喫煙などの生活習慣があげられるが、膵癌の家族歴や多発する膵嚢胞を認める例において、遺伝的素因を有する場合がありますと考えられる。

家族性膵癌は膵癌の 5~10%を占めるといわれており、日本膵臓学会がまとめた「科学的根拠に基づく膵癌診療ガイドライン」には、第一度近親者(両親、兄弟姉妹、子)に2人以上の膵癌罹患者がいる家族性膵癌家系の標準化罹患比は一般人口の 6.79 倍であり、散发性膵癌家系の 2.41 倍と比較して有意に高く、家族性膵癌家系に 50 歳未満の若年発症がある場合には、さらにリスクが上がるとされるが、ゲノムレベルでの全容解明には至っていない。

膵癌を対象としたゲノムワイド関連解析も国際的に進められているが、患者背景、組織型、予後など、膨大なサンプル数を対象とした場合には、データ解析の煩雑性とモデル構築の複雑性が問題となる。

我々は、特定の疾患において、ゲノム解析の対象を顕著な表現型を有する症例に絞り込む手法(extreme-phenotype sampling)により、大腸鋸歯状ポリポーシス症候群の新規感受性遺伝子の特定に成功した経験がある(Gala M, Gastroenterol 2014)。膵癌においても遺伝素因が大きく影響すると考えられる 50 歳未満の若年性膵癌を対象を絞り込むことで、発癌を加速するゲノム構造を特定できるのではないかと考えた。

図 1 ; 発癌の要因



2. 研究の目的

本研究では 50 歳未満に発症した若年膵癌症例の外科切除標本を用い、体細胞変異の特徴を明らかにする。発症年齢により遺伝素因が濃厚であろう集団に絞り込むことで、発癌と関連する「分子ネットワーク」に特徴的なゲノム領域が発見されることを念頭に置いた。これらの希少集団における生殖細胞系列変異の解析を先行して進めているが、結果として発生した癌病変の heterogeneity を含む表現型の特徴と、体細胞変異(コピー数異常を含む)での異常のパターン化を試みる。この際に、喫煙群と非喫煙群での比較、短期予後をパラメーターとして加え、さらに膵癌全般との比較を加えることで、特徴的サブセットの膵癌における位置づけを明確にする。

3. 研究の方法

50 歳未満で発症、診断された若年発症膵癌患者を対象とした。本研究は、膵癌の新規感受性遺伝子の探索を目的とする国際共同研究の一環として行った(膵癌の感受性遺伝子に関する研究; UMIN000016984)。日本人、米国人(マサチューセッツ総合病院)それぞれ、50 例の症例集積を目標とした。日本人コホートは表 1 に示す 8 施設において患者登録を行い、生食細胞系列変異の解析には、末梢血単核球(密度勾配法により分離)もしくはだ液(Oragene・DNA キット; DNA GENOTECH 社製)から抽出したゲノム DNA を用いた。また、全症例より喫煙などの生活習慣、糖尿病や膵炎、膵嚢胞の既往、家族歴、予後に関する診療情報を得た。

外科切除例においては、癌部の代表的な組織切片と対象となる正常組織(十二指腸や脾臓等)の未染材料の提供を得た。腫瘍、正常組織それぞれより、市販の精製キット(GeneRead DNA FFPE kit; Qiagen 社製)を用いてゲノム DNA を抽出し、既報(Omori Y, Gastroenterology)に準じて、KRAS をはじめとするドライバー遺伝子の変異の有無を解析した。また、cBio-Portal(<https://www.cbioportal.org/>)に公開されているテキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター(UT Southwestern Medical Center; 以下、UTSW コホート; Witkiewicz AK, Nat Commun 2015, doi: 10.1038/ncomms7744)の膵癌切除組織の全エクソシーケンスのデータセットを用いて 50 歳未満の若年発症膵癌と 75 歳以上での発症例の遺伝子変異を比較し、膵癌若年発症例において高頻度にコピー数異常が見られる領域の抽出を行った。最後に、自験例の日本人コホートにおいて、その結果の再現性をデジタル PCR(QX200 Droplet Digital PCR system; Bio-Rad 社製)を用いたコピー数解析により確認した。

表 1 ; 登録施設

| 病院名 (50音順) |
|------------|
| 旭川医科大学病院 |
| 宇治徳洲会病院 |
| 岸和田徳洲会病院 |
| 湘南鎌倉総合病院 |
| 千葉徳洲会病院 |
| 千葉西総合病院 |
| 手稲溪仁会病院 |
| 北海道大学病院 |

4. 研究成果

登録期間中に 50 症例の若年発症例を集積した。1 例は切除組織の病理学的な検討によって胆道癌の可能性があるため除外し、残りの 49 例を解析対象とした。喫煙歴は 32 例 (65.3%) と、我が国での平均値に比べ高いことがわかった。cBioPortal for Cancer Genomics に公開されているデータにおいても我々の結果と同様に、若年発症例における喫煙率が高いことが示されている (図 2 ; Bailey P, Nature 2016, URL: www.cbioportal.org)。糖尿病や、膵炎、及び膵嚢胞の既往・合併は、それぞれ 12 例 (24.5%)、3 例 (6.1%)、4 例 (8.2%) にみられた。第二度近親者に癌の家族歴を有する例は、23 例 (46.9%) であり、そのうち 5 例 (10.2%) で膵癌の罹患がみられた。

図2 喫煙と膵癌の発症年齢との関連

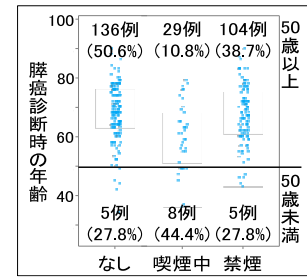
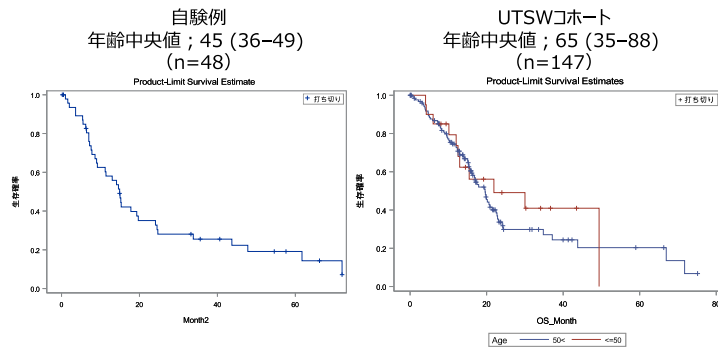


図 2 に対象例の生存曲線を示す (比較のため、UTSW コホートにおいて 50 歳を区切りに若年とそれ以外に分けて提示)。自験例 (若年発症患者) では 5 年生存率が約 2 割であり、UTSC コホート全体とほぼ同等であった (図 3)。UTSW コホートでは、統計学的有意差はないものの若年発症例は、それ以外に比較し予後不良ではなかった ($P=0.5474$)。対象症例の全例で生殖細胞系列での全エクソン解析を終了し、新規の膵癌感受性遺伝子を三つ特定した。これは、42 例の米国人コホート (マサチューセッツ総合病院) においては認めず、日本人に特有の疾患関連遺伝子と考えられた (これらの遺伝子について機能解析を含め論文投稿準備中のため、詳細は割愛する)。

図3 自験例及びUTSWコホートにおける生存曲線

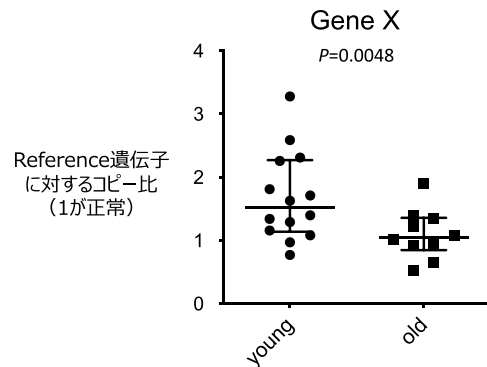


次に、若年発症膵癌に特徴的な体細胞変異について検証した。UTSW コホートで、全エクソン解析データが公開されている 109 例中 107 例に年齢情報があり、50 歳未満の若年群 7 例、75 歳以上の高齢者群 26 例の 2 群についてコピー数変異 (以下、CNA) を比較した。全 35,270 の CNA のうち、若年群で 2 例以上認めた 1,162 遺伝子を抽出し (Amplification/Deletion が一致しないものを除外)、1,162 遺伝子について高齢発症群と比較 (Fisher 直接検定) し、有意差 ($P<0.05$) を認めた 199 遺伝子に若年発症膵癌に特徴的な CNA とした。これらの候補遺伝子群を遺伝子座でグループ化したところ、表 2 の結果となった。この遺伝子座のうちの 1 カ所より、CNA 陽性群・陰性群の年齢の平均値の差を検定 (U 検定) し、 $P<0.01$ を満たす「候補遺伝子 X」を抽出した。自験例で外科切除が行われた 21 例のうち (UICC stage I/II/III/IV; 6/9/5/1)、16 例で病理組織の取得が可能であった。組織型は高分化型腺癌が 5 例、高分化型腺癌が 13 例、腺房細胞癌や退形成性膵管癌などの特殊形が 3 例であった。ゲノム DNA の抽出に成功した 14 例中、12 例において KRAS 変異が確認された。この 14 例において UTSW コホートから抽出した「遺伝子 X」のコピー数解析を行い、同時期に集積した 75 歳以上で発症した高齢膵癌 10 例と比較した (図 4)。若年発症例において高頻度に「遺伝子 X」の増幅がみられ ($P=0.0048$)、今後、膵癌の危険因子を有する集団における発症予測因子としての有用性を検討する予定である (論文投稿準備中)。

表2 若年膵癌に特徴的なCNAマーカーの遺伝子座

| 遺伝子座 | 候補遺伝子数 |
|-------------------------|--------|
| CH2:112584437-112663825 | 3 |
| CH2:179860836-181063427 | 3 |
| Ch12:15882354-21501669 | 21 |
| CH12:25052101-25648604 | 5 |
| Ch12:30628981-33439819 | 19 |
| Ch12:53251251-53446643 | 9 |
| CH11:62419035-62921861 | 6 |
| CH11:64223799-67258082 | 94 |
| Ch14:24136158-24239242 | 11 |
| CH16:14632811-14824792 | 3 |
| CH16:28258628-28735730 | 3 |
| CH16:31214021-31426513 | 4 |

図4 自験例における若年発症膵癌に特徴的なコピー数異常マーカー「遺伝子X」の増幅



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計24件（うち査読付論文 24件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 8件）

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Omori Yuko, Ono Yusuke, Tanino Mishie, Karasaki Hidenori, Yamaguchi Hiroshi, Furukawa Toru, Enomoto Katsuro, Ueda Jun, Sumi Atsuko, Katayama Jin, Muraki Miho, Taniue Kenzui, Takahashi Kuniyuki, Ambo Yoshiyasu, Shinohara Toshiya, Nishihara Hiroshi, Sasajima Junpei et al. | 4. 巻 156 |
| 2. 論文標題 Pathways of Progression From Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Molecular Features | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 647 ~ 661.e2 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2018.10.029 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Patra Krushna C., Kato Yasutaka, Mizukami Yusuke, Widholz Sebastian, Boukhali Myriam, Revenco Iulia, Grossman Elizabeth A., Ji Fei, Sadreyev Ruslan I., Liss Andrew S., Sreaton Robert A., Sakamoto Kei, Ryan David P., Mino-Kenudson Mari, Castillo Carlos Fernandez-del, Nomura Daniel K., Haas Wilhelm, Bardeesy Nabeel | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Mutant GNAS drives pancreatic tumorigenesis by inducing PKA-mediated SIK suppression and reprogramming lipid metabolism | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nature Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 811 ~ 822 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-018-0122-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Okada Tetsuhiro, Iwano Hiroto, Ono Yusuke, Karasaki Hidenori, Sato Takayuki, Yamada Masataka, Omori Yuko, Sato Hiroki, Hayashi Akihiro, Kawabata Hidemasa, Goto Takuma, Sasajima Junpei, Takauji Shuhei, Nagashima Kazuo, Mizukami Yusuke, Okumura Toshikatsu | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Utility of "liquid biopsy" using pancreatic juice for early detection of pancreatic cancer | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Endoscopy International Open | 6. 最初と最後の頁 E1454 ~ E1461 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-0721-1747 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Patra Krushna C, Bardeesy Nabeel, Mizukami Yusuke | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Diversity of Precursor Lesions For Pancreatic Cancer: The Genetics and Biology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Translational Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 e86 ~ e86 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ctg.2017.3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ono Yusuke, Sugitani Ayumu, Karasaki Hidenori, Ogata Munehiko, Nozaki Reo, Sasajima Junpei, Yokochi Tomoki, Asahara Shingo, Koizumi Kazuya, Ando Kiyohiro, Hironaka Katsunori, Daito Tsutomu, Mizukami Yusuke | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving 'subsampling' issues | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Oncology | 6. 最初と最後の頁 1448 ~ 1458 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12110 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Sato Hiroki, Sasajima Junpei, Okada Tetsuhiro, Hayashi Akihiro, Kawabata Hidemasa, Goto Takuma, Koizumi Kazuya, Tamamura Nobue, Tanabe Hiroki, Fujiya Mikihiro, Chiba Shin-ichi, Tanino Mishie, Ono Yusuke, Mizukami Yusuke, Okumura Toshikatsu | 4. 巻 99 |
| 2. 論文標題 Resection for pancreatic cancer metastases contributes to survival | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Medicine | 6. 最初と最後の頁 e20564 ~ e20564 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000020564 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Qiao Shuxi, Koh Siang-Boon, Vivekanandan Varunika, Salunke Devika, Patra Krushna Chandra, Zaganjor Elma, Ross Kenneth, Mizukami Yusuke, Jeanfavre Sarah, Chen Athena, Mino-Kenudson Mari, Ramaswamy Sridhar, Clish Clary, Haigis Marcia, Bardeesy Nabeel, Ellisen Leif W. | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 REDD1 loss reprograms lipid metabolism to drive progression of RAS mutant tumors | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Genes & Development | 6. 最初と最後の頁 751 ~ 766 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.335166.119 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Kawabata Hidemasa, Miyazawa Yuki, Sato Hiroki, Okada Tetsuhiro, Hayashi Akihiro, Iwama Takuya, Fujibayashi Shugo, Goto Takuma, Sasajima Junpei, Takauji Shuhei, Fujiya Mikihiro, Torimoto Yoshihiro, Tanino Mishie, Omori Yuko, Ono Yusuke, Karasaki Hidenori, Mizukami Yusuke, Okumura Toshikatsu | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Genetic analysis of postoperative recurrence of pancreatic cancer potentially owing to needle tract seeding during EUS-FNB | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Endoscopy International Open | 6. 最初と最後の頁 E1768 ~ E1772 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1034-7700 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Omori Y, Ueda J, Okumura T |
| 2. 発表標題 Diversity of precursor lesions for pancreatic cancer: Genetics and biology of intraductal papillary mucinous neoplasm. |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 腫瘍別シンポジウム 2: 胆肝膵悪性腫瘍における現況と展望 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mizukami Y, Omori Y, Ono Y, Karasaki H, Tanino M, Yamaguchi H, Furukawa T, Takahashi K Ambo Y, Shinohara T, Sasajima J, Tanaka S, Maguchi H |
| 2. 発表標題 A revised model of clonal evolution of intraductal papillary mucinous neoplasm-related pancreatic carcinogenesis |
| 3. 学会等名 Digestive Disease Week 2018. Research Forum: Pancreatic Cystic Neoplasms, IPMN and Neuroendocrine Tumors (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Koizumi K, Okada T, Sasajima J, Yamada M, Asahara S, Kawakubo K, Maguchi H |
| 2. 発表標題 Plasma DNA genotyping using digital PCR for surveillance of pancreatic cancer in high-risk individuals |
| 3. 学会等名 25th UEG Week (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ono Y, Sugitani A, Karasaki H, Ogata M, Nozaki R, Sasajima J, Mizukami Y |
| 2. 発表標題 An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving "subsampling" issues |
| 3. 学会等名 25th UEG Week (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mizukami Y, Ono Y, Karasaki H, Okada T, Sasajima J |
| 2. 発表標題 Digital PCR-based liquid biopsy for early detection of pancreatic cancer |
| 3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ono Y, Karasaki H, Sasajima J, Mizukami Y |
| 2. 発表標題 Improved digital PCR protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by pre-amplification 血漿由来遊離核酸より微量変異を検出する感度の向上を目的としたデジタルPCR法の応用 |
| 3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水上裕輔 |
| 2. 発表標題 Liquid biopsyによる早期発見、再発転移の評価システムの開発 (Liquid biopsy for Cancer Screening & Detection) |
| 3. 学会等名 第15回日本臨床腫瘍学会学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 水上裕輔 |
| 2. 発表標題 膵臓がん CTOS 培養法と臨床応用 |
| 3. 学会等名 第30回日本動物実験代替法学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 水上 裕輔 (Mizukami Yusuke) (30400089) | 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・がん研究部・ 部門長 (90101) | |
| 研究分担者 | 小野 裕介 (Ono Yusuke) (40742648) | 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・臨床生体情報 解析部・部門長 (90101) | |
| 研究分担者 | 田中 宏樹 (Tanaka Hiroki) (70596155) | 旭川医科大学・医学部・助教 (10107) | |