

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16338

研究課題名(和文)小膵癌を標的とした診断パネルの開発とリキッドバイオプシーによる早期診断法の確立

研究課題名(英文)Development of the novel diagnostic panel by liquid-biopsy for predicting the early-stage pancreatic cancer.

研究代表者

畠 達夫(Hata, Tatsuo)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：30806237

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):膵癌のハイリスク病変である膵嚢胞、中でも比較的高い癌化のポテンシャルが高い膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)に着目し、IPMNの良悪性の鑑別を可能にするバイオマーカーを多角的に検討した。血液生化学検査からは炎症性マーカー、栄養マーカーの有用性を明らかにし、さらに高特異度な血中マーカーとして抗p53抗体を見出した。ゲノム解析嚢胞液を用いてシーケンス解析を行うと、悪性IPMNのみから複数の癌関連遺伝子異常が検出された。さらにいくつかのメチル化DNAマーカーについても有用性が示唆される結果が得られており、今後はこれらのマーカーを併用することでさらなる診断精度の向上が期待されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果をもとに、血液中と嚢胞液中からそれぞれ得られたバイオマーカーを統合・併用することによって、非浸潤性の膵管内乳頭粘液性腺癌の存在を高精度に診断することが可能になる。今後は、膵癌の危険因子である無症候性の膵嚢胞を囲い込んだ上で、さらにこれらのハイリスク例に対して集中的に行うサーベイランスや超音波内視鏡検査などの精査に本研究で得られた診断パネル検査を付随させることで、合理性と実現可能性を兼ね備えた小膵癌の診断バイオマーカーの実現が期待される。

研究成果の概要(英文):We focused on the intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas (IPMN), a major precursor of invasive carcinoma of the pancreas. To identify the diagnostic markers differentiating malignant (high-grade dysplasia with and without invasion) from benign (low-grade dysplasia) IPMN, we revealed the several candidates such as blood based inflammatory markers, nutritional makers, and serum anti-p53 antibody. Furthermore, we performed the droplet digital-PCR (ddPCR) and next generation sequencing and demonstrated the pancreatic cancer associated gene mutations such as TP53, IDH1/2, PTEN, CTNNB1, and SMAD4, all of which were found only in pancreatic cyst fluid obtained from patients with malignant IPMN. Methylated DNA markers were also evaluated by ddPCR using cyst fluids and some potential candidates were identified. In the future, combination assay of these genome and epigenome markers (e.g. development of mini-panel) can contribute to further improvement of diagnostic performance.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 膵管内乳頭粘液性腫瘍 リキッドバイオプシー メチル化DNA デジタルPCR 次世代シーケンス

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

膵癌は依然として予後不良な難治癌である。近年は GEM+nab-PTX 療法、FOLFIRINOX 療法の中長期的な有効性が示され、全体として予後は改善傾向であることが明らかになりつつあるが、現時点で膵癌の根治を可能にする唯一の方法は「早期発見と遺残のない切除」であることは明白である。本邦の膵癌登録データベース解析によると、腫瘍径が 1.0cm 以下の膵癌については切除後の 5 年生存率が 80.4%と良好であることから、劇的な治療成績向上のためにはまず「いかに早期に診断するか？」が最重要課題であり、この課題克服のためには初期の膵癌に生じる腫瘍生物学的変化を高精度なバイオマーカーを用いて捉えることが肝要である。

しかしながら、無症状の集団を対象に生じうる散発性の小膵癌をスクリーニングによって抽出することは挑戦的かつ革新的な試みである一方、あらかじめハイリスク症例をしばり混んだ上で小膵癌の高精度な存在診断を可能にするアプローチも求められている。膵癌診療ガイドラインによると膵癌の危険因子として 1. 膵癌の家族歴、2. 膵嚢胞、3. 慢性膵炎、などが挙げられる。嚢胞性膵腫瘍で最も多いとされる膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)は、低異型度の上皮内病変から浸潤癌に至るまで様々な組織異型度を呈する slow growing な腫瘍であり、上皮内癌(高異型度上皮, high-grade dysplasia)の段階で遺残のない切除が施行されれば、治癒しうる疾患である。このように、膵癌ハイリスク症例を囲い込んだ上で、集中的に行うサーベイランスや超音波内視鏡検査などの精査に付随させることで、合理性と実現可能性を兼ね備えた膵癌早期診断バイオマーカーの開発が可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小膵癌ならびに膵癌のハイリスク病変とみなされる IPMN に生じるゲノム・エピゲノム変化に注目し、小膵癌を高精度に診断しうるバイオマーカーを同定することである。診断精度を高めるために、膵上皮内癌の組織を用いた網羅的解析から抽出された因子を複数組み合わせパネル化する。さらに、患者由来の液性検査を用いて“広義の”リキッドバイオプシーとしての診断能を検証する。

IPMN については現行のガイドラインに照らし合わせ、悪性化の予測、つまり組織異型度の予測診断に焦点を置き、経過観察可能ないわゆる“良性”と定義される低異型度上皮(low-grade dysplasia)と、手術適応であるいわゆる“悪性”と定義される高異型度上皮(high-grade dysplasia)/IPMN 由来浸潤癌の鑑別診断を可能にするバイオマーカーの同定を目的とした。

3. 研究の方法

膵上皮内癌、または IPMN の切除組織から DNA を抽出し、癌関連遺伝子異常を次世代シーケンス(Ion AmpliSeq technology, ThermoFisher Scientific)またはデジタル PCR(droplet digital-PCR system, Bio-rad)を用いて検出する。エピゲノムマーカーについては既報およびデータベース解析から標的遺伝子を絞り込み、組織または生体試料から DNA を抽出し、バイサルファイト変換処理を行った上で、当該遺伝子のプロモーター領域のメチル化 DNA のコピー数をデジタル PCR を用いて定量する。

4. 研究成果

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織標本アーカイブを用いて、浸潤成分を伴わない膵上皮内癌 (high-grade PanIN) から腫瘍組織を laser capture microdissection (LCM) を用いて採取したが、次世代シーケンスのライブラリ作製において十分な収量を得ることができなかった。LCM に伴う DNA の断片化・品質低下などが影響と考えられた。

IPMN については当教室の切除症例を後視的に検討し組織異型度の予測因子を検索したところ、NLR (Neutrophil-lymphocyte ratio) (図 1, 文献 1), CAR (CRP-albumin ratio) (文献 1), systemic immune-inflammation index (SII) (文献 2), prognostic nutritional index (PNI) (文献 2) などの比較的簡便に施行される血液生化学的検査を用いたバイオマーカーが良悪性の鑑別診断に有用であることを明らかにした。さらに、これらのバイオマーカーと FDG-PET 検査による画像所見を併用すると感度 76%、特異度 80%の診断精度で良悪性の鑑別が可能であった(文献 2)。

IPMN の癌化において生じる遺伝子変異の多くは膵癌と共通している。膵癌の 90% 以上に変異を認める KRAS 遺伝子は、IPMN においては経過観察が可能である low-grade dysplasia においても認められることから、より悪性特異的であるとされる TP53 遺伝子および遺伝子異常に伴う変異タンパク質に対する自己抗体である血清抗 p53 抗体(S-p53Ab)に着目した。当教室で切除した

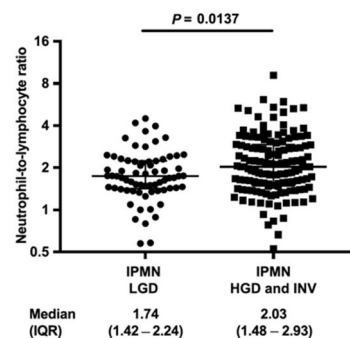


図1. IPMN切除例における組織異型度と術前血液検査から得られた好中球-リンパ球比。
LGD, low-grade dysplasia; HGD, high-grade dysplasia; INV, invasive carcinoma

111 例の IPMN 症例の S-p53Ab を検索すると high-grade dysplasia の 5.3%, IPMN 由来浸潤癌の 11.4% で S-p53Ab が陽性であったが、一方で low-grade dysplasia では 0% であった(図 2)。このことから S-p53Ab は感度は低いが高特異度な診断マーカーである可能性が示唆された。さらに、S-p53Ab 陽性例は既存の血清腫瘍マーカーである CEA, CA19-9 が共に陰性である傾向があり、これらのマーカーを併用すると感度 38.4%, 特異度 81.6% の診断精度が得られた(文献 3)。

メチル化 DNA マーカーについては複数の候補遺伝子を選択し、膵嚢胞液中から抽出した DNA を用いて解析を行った。low-grade dysplasia のサンプル数が少なく、結果にはややばらつきが見られるものの、一部のメチル化 DNA マーカーについては良悪性の鑑別診断に有用な可能性が示唆された(図 3)。

より低侵襲に採取可能な生体試料として血液サンプルに着目し、IPMN 切除例の術前に採取された血液中から得られた血漿成分からセルフリー DNA を抽出し、IPMN に関連した遺伝子異常である *KRAS*, *GNAS* 遺伝子変異をデジタル PCR を用いて検出した。*KRAS* 遺伝子変異は良悪性にかかわらず検出頻度が低かった一方、*GNAS* 遺伝子は全体の 3 割程度の症例で検出された。さらに検討を加えると、血中 *GNAS* 遺伝子変異の陽性率は良悪性で差がないものの、腸型の IPMN で有意に陽性率が高く、組織異型度ではなく組織サブタイプの鑑別に有用な可能性が示唆された(文献 4)。さらに、これらのサンプルを用いて次世代シーケンス解析を行ったところ、良性の IPMN から得られた嚢胞液からは *KRAS/GNAS* 以外の遺伝子異常は見出されなかったが、悪性 IPMN からは *TP53*, *IDH1/2*, *PTEN*, *CTNNB1*, *SMAD4* などの様々な癌関連遺伝子変異が検出された(論文未発表)。

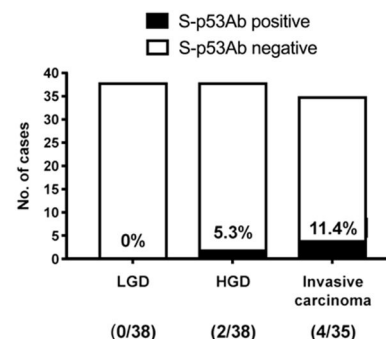


図2. IPMN 切除例における組織異型度と術前血液検査から得られた血清抗p53抗体の陽性率。LGD, low-grade dysplasia; HGD, high-grade dysplasia.

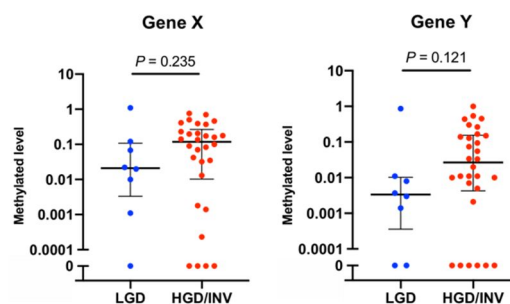


図3. IPMN 切除例における組織異型度と嚢胞液から得られたメチル化DNAのコピー数比。LGD, low-grade dysplasia; HGD, high-grade dysplasia; INV, invasive carcinoma

< 引用文献 >

1. Hata T, et al. *Pancreas*. 2019;48:99-106.
2. Hata T, et al. *Surg Today*. 2020;50:1039-1048.
3. Hata T, et al. *Pancreas*. 2020;49:768-773.
4. Hata T, et al. *Sci Rep*. 2020;10:17761.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hata T, Mizuma M, Motoi F, Ishida M, Morikawa T, Takadate T, Nakagawa K, Hayashi H, Kanno A, Masamune A, Kamei T, Furukawa T, Naitoh T, Unno M.	4. 巻 48
2. 論文標題 Diagnostic and Prognostic Impact of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio for Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas With High-Grade Dysplasia and Associated Invasive Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 99-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001202.	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 Hata T, Mizuma M, Motoi F, Ishida M, Morikawa T, Nakagawa K, Hayashi H, Kanno A, Masamune A, Kamei T, Naitoh T, Furukawa T, Unno M.	4. 巻 50
2. 論文標題 An integrated analysis of host- and tumor-derived markers for predicting high-grade dysplasia and associated invasive carcinoma of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Today	6. 最初と最後の頁 1039-1048
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-020-01982-z.	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 Hata T, Mizuma M, Motoi F, Iseki M, Omori Y, Hayashi H, Nakagawa K, Morikawa T, Kamei T, Naitoh T, Furukawa T, Unno M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Serum Anti-p53 Antibody Can Serve as a Predictive Marker for Histological Grade of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 768-773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001570.	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 Hata T, Mizuma M, Motoi F, Omori Y, Ishida M, Nakagawa K, Hayashi H, Morikawa T, Kamei T, Furukawa T, Unno M.	4. 巻 10
2. 論文標題 GNAS mutation detection in circulating cell-free DNA is a specific predictor for intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas, especially for intestinal subtype.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 17761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74868-2.	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 畠 達夫, 水間 正道, 林 洋毅, 森川 孝則, 元井 冬彦, 海野 倫明	4. 巻 41
2. 論文標題 【内視鏡下採取検体を用いた膵疾患バイオマーカー探索】膵嚢胞液中バイオマーカー解析による悪性度診断	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 293 - 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 畠 達夫, 水間 正道, 元井 冬彦, 海野 倫明, Goggins Michael	4. 巻 76
2. 論文標題 【肝胆膵疾患のエピジェネティクスを学ぶ】膵疾患のエピジェネティクス 膵IPMNのメチル化解析と診断への応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 肝・胆・膵	6. 最初と最後の頁 939 - 944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tatsuo Hata, Masamichi Mizuma, Fuyuhiko Motoi, Tatsuyuki Takadate, Kyohei Ariake, Shuichi Aoki, Kei Kawaguchi, Hideo Ohtsuka, Hiroki Hayashi, Michiaki Unno
2. 発表標題 Cell-free KRAS mutant allele predicts the micrometastasis in pancreatic cancer patients with curative-intent resection
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠 達夫, 水間正道, 元井冬彦, 高館達之, 伊関雅裕, 有明恭平, 川口 桂, 益田邦洋, 石田晶玄, 大塚英郎, 中川 圭, 森川孝則, 林 洋毅, 亀井 尚, 内藤 剛, 海野倫明
2. 発表標題 切除企図膵癌に対する血中循環DNAのKRAS変異は 画像診断で検出困難な微小病変の存在を予測しうるか?
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠 達夫, 水間 正道, 高館 達之, 有明 恭平, 川口 桂, 大塚 英郎, 林 洋毅, 元井 冬彦, 海野 倫明
2. 発表標題 切除企図膵癌における血中遊離DNAのKRAS変異測定の意義ー切除可能性分類に基づいたスクリーニングの有用性ー
3. 学会等名 第77回日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuo Hata, Masamichi Mizuma, Fuyuhiko Motoi, Masahiro Iseki, Tatsuyuki Takadate, Kyohei Ariake, Kei Kawaguchi, Kunihiro Masuda, Masaharu Ishida, Hideo Ohtsuka, Takanori Morikawa, Kei Nakagawa, Hiroki Hayashi, Takeshi Naitoh, Michiaki Unno
2. 発表標題 Integrated analysis of host- and tumor-derived parameters predicting high-grade dysplasia and associated invasive carcinoma of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas
3. 学会等名 第31回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsuo Hata, Masamichi Mizuma, Fuyuhiko Motoi, Masahiro Iseki, Yuko Omori, Shuichi Aoki, Tatsuyuki Takadate, Kei Kawaguchi, Takanori Morikawa, Kei Nakagawa, Hiroki Hayashi, Takashi Kamei, Takeshi Naitoh, Toru Furukawa, Michiaki Unno
2. 発表標題 Classification of cyst type through circulating cell-free DNA as a liquid biopsy for pancreatic cystic neoplasms
3. 学会等名 The 50th anniversary join meeting of American Pancreas Association and Japan Pancreas Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 畠 達夫, 水間 正道, 元井 冬彦, 森川 孝則, 高館 達之, 中川 圭, 林 洋毅, 亀井 尚, 内藤 剛, 海野 倫明
2. 発表標題 膵管内乳頭粘液性腺癌(IPMC)の予測診断における血液中の炎症性マーカー測定の有用性
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋 達夫, 水間 正道, 元井 冬彦, 伊関 雅裕, 高館 達之, 有明 恭平, 益田 邦洋, 石田 晶玄, 深瀬 耕二, 大塚 英郎, 森川 孝則, 中川 圭, 林 洋毅, 亀井 尚, 内藤 剛, 古川 徹, 江川 新一, 海野 倫明
2. 発表標題 膵管内乳頭粘液性腺癌の予測診断における血清抗p53抗体測定の意義
3. 学会等名 第49回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋 達夫, 水間 正道, 海野 倫明
2. 発表標題 血液中の血球細胞と蛋白成分から得た炎症性マーカーは膵管内乳頭粘液性腺癌(IPMC)の予測診断に有用か?
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋 達夫, 水間 正道, 森川 孝則, 元井 冬彦, 石田 孝宣, 亀井 尚, 内藤 剛, 海野 倫明, Hruban Ralph, Goggins Michael
2. 発表標題 膵管内乳頭粘液性腺癌の早期診断に有用なバイオマーカーの同定 嚢胞液を用いた探索的研究
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------