

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09025

研究課題名（和文）膵管内乳頭粘液性腫瘍の進展を担う分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms responsible for IPMNs progression

研究代表者

今井 浩二（IMAI, KOJI）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10516420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では膵IPMNの外科切除材料を用い、病理マッピングと多領域シーケンシングによる遺伝子変異の分布解析を行い、浸潤癌を発生しやすいIPMNの特徴を明らかにすることを目的とした。全割標本を上で組織学的異型度や上皮亜型の異なるコンポーネントに分け、肉眼的正常膵に分布する微小病変を含めサンプリングし、ターゲットシーケンスを行った。その結果、少数の変異マーカーによって各領域におけるクローン類縁性と、空間分布の推定が可能であった。今後、腫瘍性病変の組織学的異型度が増す過程で、少数のドライバー変異では説明のつかない遺伝子発現が悪性化のトリガーとなっている可能性を念頭に空間発現解析による検証を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵管内乳頭粘液性腫瘍を含む膵嚢胞性疾患は膵癌の危険因子とされるが、その多くが臨床的には良性と考えられる。本腫瘍の悪性化機構の理解を通じて悪性化しやすい病変の特性を定義することは、膵癌の早期診断はもとより、外科切除の適応と時期を適切に判断する根拠を提示し、このことは国民の健康福祉の観点から大きな意義がある。

研究成果の概要（英文）：We conducted a precise pathological mapping and multiregional sequencing analysis on a surgically resected pancreas to identify characteristics of IPMN that may lead to invasive cancer. We marked the specimens into different components with varying histological grades and epithelial subtypes. Each region, including microscopic lesions in the normal-looking pancreas, underwent targeted sequencing, enabling us to estimate clonal relatedness and spatial distribution in each area using minimal mutation markers. Our goal is to investigate the mechanisms behind malignant transformation by increasing the histological grade of neoplastic lesions and performing spatial expression analysis to identify any factors that cannot be explained by a few driver mutations.

研究分野：消化器（外科）

キーワード：IPMN 膵癌 病理マッピング ゲノムプロファイリング Visium空間トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

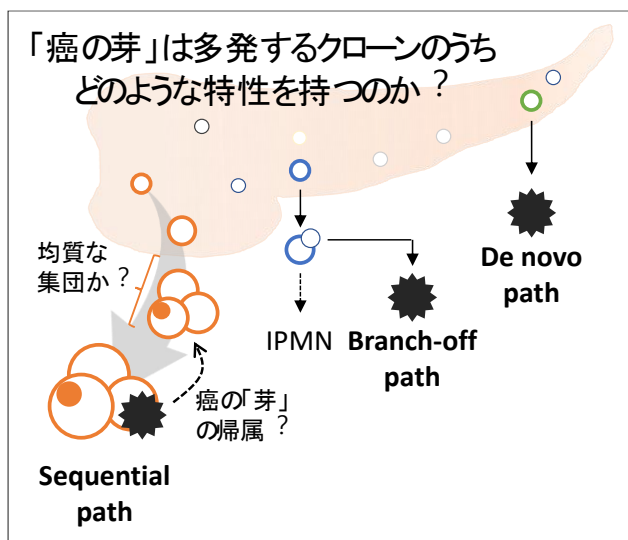
膵管内乳頭粘液性腫瘍（以下、IPMN）の臨床的終末像は浸潤癌であり、嚢胞自体が癌化する「由来癌」と、嚢胞とは独立して発生する「併存癌」に分類されてきた。本来、これらに対して別個の対策が設けられるべきであるが、IPMNを有する膵に浸潤癌が発生した場合、臨床病理学的に両者を鑑別することはしばしば困難である。この問題を解決するため、我々は先行研究において IPMN 関連膵癌の詳細な病理マッピングと多領域分割シーケンスにより、発癌の初期段階で腫瘍の進化方向に分岐が生じ浸潤癌が発生する第三のタイプが存在することを発見した（Gastroenterology 2019）。このタイプを Branch-off type と名付けたが、IPMN の初期クローンが段階的に進化し浸潤癌へ至る Sequential type や初期クローンとは完全に独立した他の多中心性発生したクローンを母地とする De novo type と比較し、無再発生存期間の有意な延長を認め、他の2タイプとは異なる分子機構を有する可能性がある。

IPMN が実質浸潤を起こし始める段階において、上記3タイプの進展パターンがどのような頻度で膵内に分布しているのか、未だ十分に理解されていない。また、肉眼的に単一とみなされる IPMN 病変がどのようなクローンを背景にいわゆる「浸潤の芽」を生み出すのか？ドライバ変異の発生する順列により、形質や悪性度に差が生じるのか？も未解決である。このように、IPMN 治療ならびに発癌サーベイランスを効果的に行うためには、潜在的に悪性度の高い病変の特性を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、浸潤癌を含まない IPMN 症例に解析の対象を拡大し、これらの遺伝子変異・発現情報を得て「浸潤癌を発生しやすい IPMN」の特徴を明らかにすることを目的とした。これまで申請者自身が進めてきた研究対象を浸潤癌に至る前段階の IPMN へ拡大することで、浸潤癌が発生しやすい IPMN の特徴を明らかにする。具体的に、以下の三つの課題解決を目指した（右図参照）。

- 上皮内病変が実質浸潤を起こす早期段階において、Sequential type と定義した癌の芽が、IPMN 病変のどの「領域」に帰属するか？
- 浸潤要素を持たない IPMN 切除膵において、De novo 及び Branch-off type と定義した発癌ルートで説明される癌の芽（=浸潤癌へ移行しうる high-grade dysplasia）が、どのように分布するのか？
- GNAS 変異が KRAS 変異に先行する病変の存在率と、その潜在的な浸潤リスク



このようなアプローチにより、浸潤癌への進展リスクに基づく適切な IPMN のサーベイランスや、外科切除の至適なタイミングを明らかにすることを目指した。

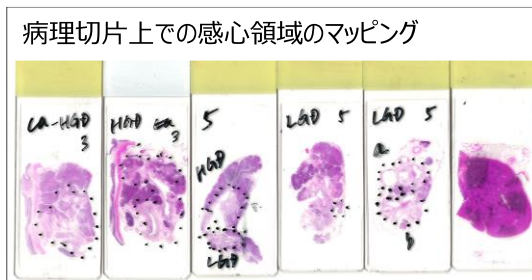
3. 研究の方法

先行研究で提唱した IPMN 関連浸潤癌の進化ルートに関するより詳細なデータを得るため、IPMN 患者の外科切除材料を用いて、以下の方法により膵内でのがん進化ネットワークの可視化を試みた。

多段階発癌の理論に基づくと、遺伝子変異の蓄積によって段階的に浸潤癌が形成されることが予測されるが、アレル不均衡やエピゲノム異常に関連する発現情報を加味することで、浸潤癌や転移形成に進化しやすい非浸潤性 IPMN、ならびに由来となった初期クローンの特徴が明らかとなる可能性がある。このため、IPMN 外科切除材料の病理組織像を詳細に見直し、腫瘍の悪性

化に関わるであろう関心領域を選定し、以下の3つのアプローチによる解析を行った。

①IPMN 切除材料における詳細な病理マッピング
 上皮内成分のうち異型度 (Baltimore コンセンサス分類に基づく) や上皮亜型の異なるコンポーネント、微小浸潤部 (移行部)、さらに肉眼的正常膵に分布する微小病変や膵管内播種が想定される病変 (右図参照) をマーキングし、MUCタンパクの発現や p53 や SMAD4 を始めとする癌抑制遺伝子のタンパク発現を解析した。



②Multi-region sequencing によるゲノムプロファイリング

①で指定された関心領域より FFPE 材料を用いて拡散抽出を行い、複数の膵癌関連遺伝子変異とコピー数異常を検出・定量するカスタムパネル (Ion AmpliSeq) による変異プロファイリングを行った。

Oncogene		Tumor suppressor gene			
hotspot		whole exon			hotspot
KRAS	HRAS	TP53	STK11	DNA damage response 4 genes	14 genes
GNAS	NRAS	CDKN2A	RNF43	Chromatin regulator 6 genes	
BRAF	PIK3CA	SMAD4	CTNNB1		

③空間発現解析

①②において組織学的異型度と変異プロファイリングを行った関心領域について、浸潤先進部と考えられる各上皮亜型の代表的なサンプルを厳選し、Visium 空間トランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

IPMN 関連膵癌の切除標本を用い (n=107)、異なる上皮亜型 (胃型、腸型、胆膵型、オンコサイト型) の分布を調べた。66%に単独、34%に複数の上皮亜型が混在することが分かった (文献 1)。また、全体の 83%で胃型形質が確認され、上皮亜型が混在するタイプにも多く観察された。上皮亜型の混在が見られた例において、遺伝子変異をトレースした結果を用いて「progressive」「divergent」「independent」の3タイプに分類したところ、前者2つにおいて低異型度の胃型病変をベースとした多様性進化が多く観察されること、また「progressive」では腸型へ、「divergent」では胆膵型へのシフトが生ずる傾向が見られた。また、「independent」タイプでは各上皮亜型の高異型度病変がランダムに発生していた。

次に胃型からその他の上皮亜型へのシフトがどのように生ずるのかを同様に検証した。GNAS 変異はヒト IPMN の 40-70%に認められ、その割合は特に腸型において高い。そこで胃型及び腸型亜型が混在する例において、転写因子 CDX2 と MUC2 のタンパク発現、さらに Alcian Blue 染色による硫酸基を含む粘液多糖類の産生を組織学的に確認したところ、IPMN 標本において GNAS 変異を有する腫瘍では胃型から腸型への移行部分において CDX2、MUC2、Alcian Blue の順に発現上昇が確認され、変異型 GNAS による胃型から腸型への進化促進の可能性が資されていた (文献 2)。また、一方で IPMN の一部で Peutz-Jeghers 症候群の原因遺伝子である STK11/LKB1 の発現低下が見られることが報告されていることから、IPMN 切除標本を STK11 免疫染色により評価したところ、同タンパク発現低下を有するサブセットが全体の約 14%にみられ、その約 6 割に STK11 の機能欠失型変異を認めた。これら STK11 の発現異常を有する IPMN のほとんどの例で KRAS または BRAF 変異を伴っていたが GNAS 変異例はなく、その多くが胆膵型またはオンコサイト型の形質を有し、予後不良な患者集団に集積する異常であることが分かった (文献 3)。

現在、同一の腫瘍関心領域から特に浸潤先進部と考えられる領域を選別し、Visium 空間トランスクリプトーム解析を行い、遺伝子変異の分布との対比を進めている。

文献

- 1 Kobayashi, T. et al. Pathways for the development of multiple epithelial types of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *J Gastroenterol* 56, 581-592 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00535-021-01783-2>
- 2 Omori, Y. et al. How does intestinal-type intraductal papillary mucinous neoplasm emerge? CDX2 plays a critical role in the process of intestinal differentiation and progression. *Virchows Arch* 477, 21-31 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02806-8>
- 3 Omori, Y. et al. Serine/Threonine Kinase 11 Plays a Canonical Role in Malignant Progression of KRAS -Mutant and GNAS -Wild-Type Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *Ann Surg* 277, e384-e395 (2023). <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000004842>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井浩二
2. 発表標題 膵切除周術期栄養療法の意義 膵体尾部切除後の食事開始時期は栄養と合併症に影響を与えるか?
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井浩二
2. 発表標題 膵頭十二指腸切除におけるNo Drain手術の試み
3. 学会等名 第77回 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井浩二
2. 発表標題 膵体尾部切除後の食事開始時期は術後膵瘻に影響を与えるか?
3. 学会等名 第49回 日本膵切研究会
4. 発表年 2022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)	旭川医科大学・医学部・教授 (10107)	

6. 研究組織（つづき）

	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	唐崎 秀則 (KARASAKI HIDENORI) (50374806)	医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・外科的消化器病疾患研究部・客員研究員 (90101)	

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