

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：90101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09070

研究課題名(和文)形態別にみた多発膵管内病変の膵内分布とclonality

研究課題名(英文) Distribution and clonality of multiple intraductal neoplasms of the pancreas evaluated by morphology

研究代表者

唐崎 秀則 (Karasaki, Hidenori)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院医学研究所・がん生物研究部・客員研究員

研究者番号：50374806

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)：膵腫瘍で今後臨床応用が期待される液体生検情報には、指標となる膵腫瘍そのもののみならず背景膵で起きている情報も混在する。膵全体に起こる変化の理解を深めるために高異型度-IPMNと重複膵癌をそれぞれ指標病変とする2例で正常膵管も含む多数部位の変異解析を行い、指標病変の大部分と背景膵検討部位の約40%になんらかの遺伝子変異を認めた。これら変異の大多数は低異型度膵管内病変であったが、一部の正常膵管にも変異を認めた。2例間で検討したサンプル数、異型度分布、指標病変-背景膵検討部位間のKRAS変異形式一致率に大きな開きはなかったが、KRAS変異種数には個体差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治癌である膵癌の早期発見のために液体生検の臨床応用が期待されている。その解析資料として血液、十二指腸液、膵液などが検討されているが、いずれであっても指標病変だけではなく、背景に起きている様々な分子情報が含まれることになる。これらの適切な解釈なしに液体生検の臨床応用はありえないが、背景膵の分子変化や、指標病変との関連の詳細は不明な点が多い。本研究は少数例ではあるが正常膵管も含め背景膵の多数箇所と指標病変の複数箇所の変異解析を行い、症例間で共通している、あるいは個体間で異なる変化を模索した。本研究の結果を基に多種類の膵腫瘍の背景情報を類型化することで液体生検の臨床応用に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The liquid biopsy, promising clinical application for early detection of pancreatic neoplasms consist of many molecular alterations about not only the index tumor but also the background. For better understanding of the genetic alterations occurring throughout the pancreas, mutation analysis of multiple sites, including normal pancreatic ducts, in two cases with high-grade IPMN and double pancreatic cancer as index lesions, respectively. Approximately 40% of the patients had some kind of gene mutation. The majority of these mutations were low-grade intraductal lesions, but mutations were also found in some normal pancreatic ducts. There was no significant difference in the number of samples examined between the two cases, the distribution of grades, and the rate of concordance in KRAS mutation type between index lesions and background pancreatic sites, but individual differences were observed in the number of KRAS mutations.

研究分野：消化器病学

キーワード：背景膵 膵管内病変 clonality 正常膵管 膵発癌 領域発癌 KRAS

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は今もって予後不良で、早期診断が求められるが、従来の画像診断や血液マーカーでは十分な効果が得られていない。そのなかで liquid biopsy (LB) が期待されているが、臨床応用に向けてはなお明らかにすべき点が多く残されている。その一つとして、液体生検で得られる情報の解釈がある。膵癌の背景膵には異型を伴う微小膵管内病変が多くみられることが知られていた。これら膵管内異型病変は形態的に pancreatic intraepithelial neoplasm (PanIN)、intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)、acinar to ductal metaplasia (ADM) など多彩であり、LB でえられる情報には指標病変 (Index) のみならずこういった背景膵からのものも含まれる。背景膵については少数箇所での解析では低異型度の段階で高率にドライバー遺伝子変異を有することが報告されているが、背景膵全体にわたる多数箇所でのデータは乏しい。さらに形態的には正常な膵管の変異情報も同様である。

## 2. 研究の目的

LB の根拠となる基礎データの集積を目標として、背景膵の正常形態、低異型度膵管内病変の頻度、異型度、変異頻度、Index との関係を検討する。

## 3. 研究の方法

症例 1 は膵尾部高異型度 (HG)-IPMN、症例 2 は膵体部と尾部の重複 pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) でいずれも膵体尾部切除を行った。これら 2 例を対象とした。

### (1) 検体の採取

切除の原因となった病変を Index 病変、それ以外の部分を Background (BG) とした。BG からは正常形態膵管も含めて microdissection 可能な膵管を可及的多数採取した。

### (2) 異型度判定

異型のない正常形態膵管 (N)、低異型度病変 (LG-PanIN と incipient IPMN (iIPMN) を含む)、高異型度病変 (HG-PanIN と iIPMN を含む)、扁平上皮化生 (SQM)、腺房膵管異形成 (ADM) に分類した。病理学的判定は消化器外科医 1 人、エキスパート膵臓病理医 2 人が独自に行ったのち協議により最終判定を決定した。

### (3) 変異解析

症例 1 (HG-IPMN) の Index 11 力所と BG 71 力所、症例 2 の Index 7 力所と BG 76 力所を独自に作成した膵癌で高率に変異を認める 8 遺伝子を搭載した遺伝子パネルを用いて変異解析を行った。パネル解析で変異が検出されなかった検体は、より高感度な multiplex digital PCR による KRAS/GNAS の変異解析を追加した。

## 4. 研究成果

### (1) Index・BG にみられる異型病変・遺伝子変異の頻度

液体生検資料には背景膵に起きているイベント情報も含まれるので、これらの情報を集積し、類別化できれば PDAC や IPMN のリスクの層別化が期待できる。

今回の結果では Index の全て (18/18 力所) と BG の 56.8% (83/146 力所) に異型病変を認めた。BG に認めた異型病変の大部分 (76 力所) は低異型度病変であった。調査した 8 種類の遺伝子に関して、Index の大部分 (17/18 力所) と BG の 38.4% (56/146 力所) になんらかの変異を認めた。BG の変異 56 力所中、ddPCR による validation も含めて KRAS 変異を認めなかったのは 4 力所だけで、それらには全て GNAS 変異を認めた (BG の KRAS 変異率は 52/146 力所で 35.6%)。これらの結果から液体生検情報の結果解釈のためには BG における、特に低異型度病変の多寡、分布などの特徴を知る必要があり、そのためには KRAS 変異 (変異種数や変異頻度など) に着目した類別化が合理的と考えられた。

### (2) BG における正常形態膵管 (N)・低異型度 (LG) foci の変異率

正常形態膵管や、PanIN を中心とする低異型度病変にみられる遺伝子変異については既報があるが、その結果は Index の種類や変異解析の手法などで異なる。

低異型度病変に関しては 2000 年以前の論文ではサンガー法を用いたものが多いためか変異率は低く、最も多数箇所での検討をしていると思われる Lüttges らの報告では、PDAC を Index とする 35 例の背景膵 364 力所の解析で LG-PanIN に相当する低異型度膵管内病変の KRAS 変異率を 33.6% (79/235 箇所) と報告している (Lüttges J, 1999, Cancer)。一方最近の報告では LG-PanIN の KRAS 変異率は高値であるとの報告があり、Kanda らは主に PDAC や IPMN を Index とする 89 人

の背景膵 169 力所の PanIN を高感度な変異検出法である pyrosequencing を用いて解析し、KRAS のコドン 12 の変異率を PanIN-1A が 92.0%、PanIN-1B が 92.3%、PanIN-2 で 93.3%と報告している。また Hosoda らは PDAC や IPMN を Index としない 10 人から採取した 16 力所の LG-PanIN の 94%に KRAS 変異を認めたと報告している (Hosoda W, 2017, J Pathol)。今回の検討では検討した LG foci 76 力所中 46 力所に何らかの変異を認め、そのうちの 43 力所には KRAS 変異を認めた (KRAS 変異率 55.8%)。

また正常形態膵管については、Lüttges らは 21%(21/98 力所)に KRAS 変異を認めたのに対し (Lüttges J, 1999, Cancer)、Kanda らは 20 人から採取した正常形態膵管には変異を認めなかったとしている (Kanda M, 2012, Gastroenterology)。われわれの検討では、7.9%(5/63 力所)の正常形態膵管に何らかの遺伝子変異を、6.3%(4/63 力所)に KRAS 変異を認めた。

低異型度病変と正常形態膵管における KRAS 変異率の高低は Lüttges らと Kanda らの間で入れ替わっており、われわれの結果はその中間的と言える。これら 3 研究はともに PDAC や IPMN を Index とする背景膵に関するものである。Lüttges らの報告は 1999 年と最も先行するもので、変異の検出感度が Kanda らのものよりも低かった可能性は否定できないが、それだけでは Lüttges らが示している正常形態膵管での高い変異率が説明できない。われわれの結果は NGS とデジタル PCR というこれら 3 研究の中では最も高感度な変異検出法を用いたものであったが、その結果は 3 者の中間的であった。Kanda らの研究では PanIN は一人平均 1.9 力所と少なく (正常膵管については 20 人との記載があるのみで、何力所の膵管を調べたかは記載がない) 異型細胞の占める割合が高い部分のみが選択された可能性は否定できない。しかしわれわれの検討では異型部分が採取した膵管の 20%以下の検体が低異型度膵管全体の 12%を占めたが、これらは 20%以上のものと比較しても KRAS 変異率に有意差はなかった ( $p=0.2757$ )。これらを勘案すると、PDAC や IPMN を Index とする背景膵には、正常形態膵管にもその一部に KRAS 変異を有する部分があり、低異型度病変ではその率は急激に上昇する。しかし低異型度病変でもなお KRAS 変異を認めないものはある存在すると考えられる。

### (3) BG の KRAS 変異種数と変異形式の Index-BG 共通性

Index と PanIN の変異プロファイルの比較に関して、Murphy らは PDAC10 例で Index と近傍の PanIN2~3 (15 力所) を全エクソン解析で比較し、PanIN は 34-96%の変異を Index と共有しており、Index と近傍の PanIN の多くは同じクローン由来であると述べている (Murphy S J, 2013, Gastroenterology)。一方、同一膵内の PanIN 間のクローン関連性に関して、Braxton らは PanIN を 3 次元的に詳細なサンプリングにより解析し、同じ PanIN 内では全エクソン解析で平均 14 個の共通する体細胞変異を認めたが、空間的に連続していない PanIN では KRAS 以外に共通する体細胞変異を認めなかったことから PanIN の多くは独立したクローンであると述べている (Braxton A M, 2023, bioRxiv)。しかし、これらはいずれも少数の PanIN の解析にとどまっており、同一膵内の多数部位における膵管同士、あるいは Index とのクローン関連性は不明である。今回、Index に認めた KRAS 変異形式は G12V の一種類のみであったが、BG には合計 7 種類の KRAS 変異形式を認めた。低異型度病変にはこれら全ての KRAS 変異形式を認め、その多様性を担うことが明らかとなった。膵腫瘍を標的とした液体生検で採取される検体にはこれら背景膵からの多様な情報が含まれるため、背景膵の理解を進めることの重要性が示唆された。

### (4) 症例間で共通する事項・相違する事項

正常形態も含めて可及的に沢山の背景膵管の形態 (異型度)・遺伝子変異を評価するポリシーで背景膵の膵管をマッピング・採取した結果、HG-IPMN を Index とする Case1 で 70 力所、重複 PDAC を Index とする Case2 で 76 力所とほぼ同等数の背景膵管を評価し得た。2 例とも腫瘍の主膵管閉塞による随伴性膵炎は来しておらず、いわゆる “soft pancreas” に対して膵体尾部切除を行った症例であり、特定の条件下では一定程度の背景膵管の形態的・分子的评价が可能といえる。評価し得た正常形態膵管、低異型度膵管、その他の数は Case1 が 33/34/3、Case2 が 30/42/4 と同等で、背景膵低異型度膵管の変異率も Case1 が 61.8%(21/34 力所)、Case2 が 59.5%(25/42 力所)と著変なかった。

背景膵に認める KRAS 変異膵管の変異形式が Index と同じものは Case1 で 47.6%、Case2 で 38.7%と著変なかった。一方 KRAS 変異種数は Case1 では 3 種類であるのに対し Case2 では 7 種類と個体差を認めた。

PDAC や IPMN の背景膵に多様な変化があることは古くから知られており、それらの前癌病変としての重要性は多く指摘されてきたが、その多様性と Index との関連についての報告は少なかった (Hruban R H, 2000, Clin Cancer Res)。われわれは、かつて IPMN 関連膵癌を IPMN と浸潤癌との分子プロファイリングパターンから由来癌に相当する「Sequential」タイプ、併存癌に相当する「De novo」タイプ、そして共通の創始病変からあるサブクローンが IPMN を、別のサブクローンが浸潤性膵管癌を形成する「Branch-off」タイプの 3 つに分類し、

「Sequential」タイプでは多の2型と比べて背景病変数と KRAS 変異種数が少ないことを報告した(Omori Y, 2019, Gastroenterology)。  
今回の研究はわずか2例の検討であり、Indexの種類による類別化はできないが、すくなくとも症例間で大きな差のある項目とそうではない項目があることがわかる。これらの多数例での情報を累積することで Indexの種類による背景腺の特徴が明らかになる可能性があり、これは液体生検で得られる情報から Indexの状態を類推することにつながる。

Braxton, A. M., Kiemen, A. L., Grahn, M. P., Forjaz, A., Babu, J. M., Zheng, L., . . . Wood, L. D. (2023). Three-dimensional genomic mapping of human pancreatic tissue reveals striking multifocality and genetic heterogeneity in precancerous lesions. *bioRxiv*. doi:10.1101/2023.01.27.525553

Hosoda, W., Chianchiano, P., Griffin, J. F., Pittman, M. E., Brosens, L. A., Noe, M., . . . Wood, L. D. (2017). Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *J Pathol*, *242*(1), 16-23. doi:10.1002/path.4884

Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, *6*(8), 2969-2972.

Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S. M., Yu, J., Borges, M., . . . Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, *142*(4), 730-733.e739. doi:10.1053/j.gastro.2011.12.042

Lüttges, J., Schlehe, B., Menke, M. A. O. H., Vogel, I., Henne-Bruns, D., & Klöppel, G. n. (1999). The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium. *Cancer*, *85*(8), 1703-1710. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19990415)85:8<1703::Aid-cnrcr9>3.0.Co;2-r

Murphy, S. J., Hart, S. N., Lima, J. F., Kipp, B. R., Klebig, M., Winters, J. L., . . . Couch, F. J. (2013). Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. *Gastroenterology*, *145*(5), 1098-1109 e1091. doi:10.1053/j.gastro.2013.07.049

Omori, Y., Ono, Y., Tanino, M., Karasaki, H., Yamaguchi, H., Furukawa, T., . . . Tanaka, S. (2019). Pathways of Progression From Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Molecular Features. *Gastroenterology*, *156*(3), 647-661.e642. doi:10.1053/j.gastro.2018.10.029

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Omori Yuko, Ono Yusuke, Morikawa Takanori, Motoi Fuyuhiko, Higuchi Ryota, Yamamoto Masakazu, Hayakawa Yuko, Karasaki Hidenori, Mizukami Yusuke, Unno Michiaki, Furukawa Toru	4. 巻 277
2. 論文標題 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	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 e384 ~ e395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/sla.0000000000004842	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 Kobayashi Toshikazu, Omori Yuko, Ono Yusuke, Karasaki Hidenori, Mizukami Yusuke, Makino Naohiko, Motoi Fuyuhiko, Unno Michiaki, Ueno Yoshiyuki, Furukawa Toru	4. 巻 56
2. 論文標題 Pathways for the development of multiple epithelial types of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 581 ~ 592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01783-2	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 Tachibana Shion, Mizukami Yusuke, Ono Yusuke, Sugiyama Yuya, Okada Tetsuhiro, Kitazaki Arisa, Sasajima Junpei, Tominaga Motoya, Sakamoto Jun, Kimura Keisuke, Omori Yuko, Furukawa Toru, Kimura Taichi, Tanaka Shinya, Nagashima Kazuo, Karasaki Hidenori, Ohta Tomoyuki, Okumura Toshikatsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Genetic Tracing of Clonal Expansion and Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Case Report and Multi-Region Sequencing Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.00728	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 Omori Yuko, Ono Yusuke, Kobayashi Toshikazu, Motoi Fuyuhiko, Karasaki Hidenori, Mizukami Yusuke, Makino Naohiko, Ueno Yoshiyuki, Unno Michiaki, Furukawa Toru	4. 巻 477
2. 論文標題 How does intestinal-type intraductal papillary mucinous neoplasm emerge? CDX2 plays a critical role in the process of intestinal differentiation and progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 21 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-020-02806-8	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 岡田哲弘 水上裕輔 林明宏 河端秀賢 佐藤裕基 河本徹 後藤拓磨 谷上賢端 小野裕介 唐崎秀則 奥村利勝	4. 巻 35
2. 論文標題 膵癌の初期発生とリキッドバイオプシーによる分子診断	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 膵臓	6. 最初と最後の頁 302～312
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 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大森優子、小野裕介、森川孝則、元井冬彦、樋口亮太、山本雅一、唐崎秀則、水上裕輔、海野倫明、古川 徹。
2. 発表標題 STK11 plays a canonical role in malignant progression of a subset of KRAS-mutant IPMNs.
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Okada T, Mizukami Y, Koizumi K, Takahashi K, Iwano H, Asahara S, Kuwatani M, Kawamoto T, Sato H, Hayashi A, Kawabata H, Goto T, Sasajima J, Fujiya M, Ono Y, Karasaki H, Okumura T.
2. 発表標題 FEASIBILITY OF DIGITAL PCR-BASED QUANTIFICATION AND MUTATION ANALYSIS OF PLASMA CELL-FREE DNA FOR DIAGNOSIS AND SURVEILLANCE OF EARLY-STAGE PANCREATIC TUMORS.
3. 学会等名 DDW2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Omori Y, Ono Y, Morikawa T, Motoi F, Higuchi R, Yamamoto M, Karasaki H, Mizukami Y, Unno M, Furukawa T.
2. 発表標題 STK11 Plays a Canonical Role in Malignant Progression of a Subset of KRAS-mutant Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms.
3. 学会等名 109th USCAP Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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)	
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・ゲノム診断研究部・部門長   (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
---------	---------