

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15963

研究課題名（和文）細胞診アーカイブスのゲノム情報；最難治癌に対する精密医療を目指して

研究課題名（英文）Genomic information in cytology archives; Toward precision medicine for the most refractory cancers

研究代表者

大山 広（Ohyama, Hiroshi）

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10814600

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：胆膵癌の多くはがんゲノムプロファイリングに必要な腫瘍組織が獲得できない。本研究では保管された細胞診検体(ACS)を用い、胆膵癌における精密医療の確立を目指した。胆膵疾患44名より収集したFFPE組織、ACSのDNAを比較したところ、両者は質的・量的に同等であった。FFPE組織とACSの両者を有する悪性19名の遺伝子変異は76%で一致した。ACSのみを有する悪性15名、良性10名のACSのゲノムプロファイリングは、感度91%、特異度100%、正診率93%であった。治療標的遺伝子変異、薬剤適合遺伝子変異の同定はACSではそれぞれ74%と32%、FFPE組織ではそれぞれ79%と21%と同等であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ACSは腫瘍組織と同様のゲノムプロファイルを有すること、ACSのゲノムプロファイリングにより高精度に良悪性を鑑別しうること、治療標的遺伝子変異の探索が可能であることが示された。ACSを用いてがんゲノムプロファイリングを実施することにより、最難治癌である胆膵癌の予後改善が期待される。胆膵癌で最も高頻度に検出されるKRAS変異については現在のところ有効な治療薬に乏しいが、薬剤開発の進展により恩恵を享受する対象が拡大することが期待される。

研究成果の概要（英文）：There are limitations in obtaining sufficient pancreaticobiliary tumor tissue for genomic profiling. We investigated whether archived cytological specimens (ACS) suit those tests. FFPE tissues and ACS from 44 patients with pancreaticobiliary disease were analyzed. We compared genomic profiles of FFPE and ACS from 19 patients with malignancies. We tested ACS from 25 patients for the ability to discriminate between malignant and benign disorders. We explored whether actionable and drug-matched mutations could be identified from ACS. Oncogenic mutations observed in ACS were 73% consistent with those identified in FFPE specimens. Genomic profiling using ACS discriminated malignant from benign disease with 93% accuracy, 91% sensitivity, and 100% specificity. Drug-matched mutations were identified in 32% of ACS and 21% of FFPE samples. In conclusion, ACS can discriminate malignancy and detect drug-matched mutations in patients with advanced pancreaticobiliary cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：がん遺伝子 悪性新生物 遺伝子変異 ゲノミクス 膵癌 胆道癌

1. 研究開始当初の背景

膵癌の死亡者数は全世界的に増加している。アメリカでは膵癌は癌死の第3位に位置し、2030年には第2位となることが予測され、5年生存率は9%と全癌腫の中で最低である (Siegel RL, CA Cancer J Clin 2019)。胆道癌はアジア諸国で多いが、全世界的に増加傾向にあり、5年生存率は10%程度と報告されている (Rizvi S, Gastroenterology 2013)。

最難治癌である胆膵癌は早期には症状に乏しいため受診に至らず、その結果、80%以上の症例は切除不能である (Gillen S, PLoS Med 2010, Razumilava N, Lancet 2014)。また、切除不能胆膵癌に対する化学療法が開発され標準療法となる一方、全生存期間中央値は未だ1年未満と劇的な予後改善には至っていない (Conroy T, N Engl J Med 2011, Valle J, N Engl J Med 2010)。このため、胆膵癌にはより効果的な治療戦略の構築が急務である。

Next-generation sequencing (NGS)を用いた The Cancer Genome Atlas (TCGA) などの大規模研究によって胆膵癌のゲノム異常が明らかになりつつあり (Waddell N, Nature 2015, Bailey P, Nature 2016) 分子標的治療や免疫治療の応用 (精密医療、Precision Medicine) が期待されている (Shroff RT, Lancet Oncol 2020, Le DT, Science 2017)。

FFPE 由来 DNA を用いた胆膵癌のゲノム解析は、FGFR2 融合遺伝子陽性胆管癌 107 例に対するペミガチニブ (完全奏功 3 例、部分奏功 35 例) の第 2 相試験 (Abou-Alfa GK, Lancet Oncol 2020)、BRCA1/2 変異陽性膵癌に対する PARP 阻害薬の有用性の報告 (Jonsson P, Nature 2019) など、遺伝子変異に対する分子標的薬の有用性の報告が散見される。

2019 年 6 月、がんを高頻度にみられる遺伝子群を網羅的に解析するがん遺伝子パネル検査が保険適用となった。この検査では厚さ 5 μm 、表面積 25 mm^2 以上、有核腫瘍細胞割合 30%以上の未染色スライド 10 枚、HE 染色スライド 1 枚が必要だが、切除不能胆膵癌には FFPE が存在せず検査不可能である。また、胆道癌の多くは腫瘍形成がないため生検できず、EUS-FNA で得られる膵癌組織は微小であるためゲノム情報が得られない。この未充足の医療需要を解決すべく、FFPE の代替候補として腫瘍細胞を含む胆汁細胞診アーカイブスに着目した。細胞診検体と FFPE のゲノム情報が一致するか、という「問い」を明らかにし、ゲノム情報から発がん関連遺伝子変異・薬剤を同定することが胆膵癌の予後改善に必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞診検体のゲノム情報を精密医療に利用することを目的とした。胆道癌や胆管浸潤を伴う膵癌は胆管表面に癌が露出しているため、腫瘍組織から剝脱した腫瘍細胞が胆汁中に含まれており、採取した胆汁をスライドガラス上に塗布して作成した細胞診検体には腫瘍細胞が確認できる。実際、永久保存用封入剤であるマリノールにより封入され劣化しない細胞診検体は長期保管可能であり、スライドガラスから直接剝離しすぐに利用できることを自施設から報告した (Kunimasa K, Cancer Med 2020)。細胞診検体は長期保管されたアーカイブスを利用でき、速やかに核酸が抽出できるという利点は、FFPE ではホルマリンによる核酸の断片化や脱アミノ化のために長期保管検体はゲノム解析困難であること、FFPE 薄切から核酸抽出までに時間を要することと大きく異なる。

3. 研究の方法

最難治癌である胆膵癌の 80%以上を占める切除不能例は FFPE が得られないことから、日常臨床で病理診断に用いられる細胞診アーカイブスを用いる。胆膵癌、胆管炎などの胆膵疾患症例から同意を取得し、細胞診検体から核酸 (DNA/RNA) を抽出する。手術例など FFPE を有する症例は FFPE も同様に核酸を抽出する。細胞診アーカイブス、FFPE の両検体から抽出された核酸を量的・質的に比較検討し、両検体を同等に扱うことができるか検証する。

続いて、TCGA などの報告にて胆膵癌に高頻度に同定されるドライバー遺伝子 (Significantly Mutated Genes) を標的とした胆膵癌パネル (60 遺伝子、280,220bp、In-house にて作成し運用済み) を用い、抽出した核酸に対し multiplex PCR を施行する。PCR 産物に対し、プライマー配列の除去、アダプターライゲーション、精製を行いライブラリを作製する。テンプレート調整後、Ion Chef によりエマルジョン PCR と半導体チップローディングを施行し、Ion Proton を使用して NGS を実施する。

得られたシークエンスデータの処理には Ion Torrent Suite Software (Torrent Suite version 5.0.4) を用いる。体細胞変異は白血球をリファレンスとし同定する。生殖細胞系変異は白血球で同定された変化 (バリエーション) をヒトゲノムのリファレンス配列である hg19 と比較して同定する。アミノ酸変化の機能解析は Polyphen、SIFT を用いて評価する。発がんに関連する変異、ならびに治療標的となる遺伝子変異の同定は OncoKB にてアノテーションする (Hirotzu Y, Sci Rep 2020)。

ゲノム解析後、細胞診検体と FFPE のゲノム情報が一致しているか、発がん関連遺伝子・薬剤が同定できるか検証する。

4 . 研究成果

ACS で同定された発癌関連遺伝子変異は、FFPE 検体で同定されたものと 76% の一致率であった。ACS のみを用いたゲノムプロファイリングは、感度 91%、特異度 100%、正診率 93% であり、悪性疾患と良性疾患の識別能は良好であった。治療標的遺伝子変異ならびに治療薬のある遺伝子変異の同定は、ACS ではそれぞれ 74% と 32%、FFPE 組織ではそれぞれ 79% と 21% であった。

本研究により、ACS は腫瘍組織と同様のゲノムプロファイルを有すること、ACS のゲノムプロファイリングにより高精度に良悪性を鑑別しうること、治療標的遺伝子変異の探索が可能であることが示された。ACS を用いてがんゲノムプロファイリングを実施することにより、最難治癌である胆膵癌の予後改善が期待される。胆膵癌で最も高頻度に検出される KRAS 変異については現在のところ有効な治療薬に乏しいが、薬剤開発の進展により恩恵を享受する対象が拡大することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Ohyama H, Mikata R, Hirotsu Y, Amemiya K, Miura Y, Hirose S, Oyama T, Takano A, Iimuro Y, Kojima Y, Mochizuki H, Ikeda J, Kato N, Omata M | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Genomic profiling amplifies the utility of endoscopic ultrasound-guided fine needle biopsy by identifying clinically applicable druggable mutations in pancreatic cancer | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Diagnostic Pathology | 6. 最初と最後の頁 152016 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anndiagpath.2022.152016 | 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 Ohyama H, Hirotsu Y, Amemiya K, Amano H, Hirose S, Hosoda K, Oyama T, Iimuro Y, Kojima Y, Mikata R, Mochizuki H, Kato N, Omata M | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Detection of actionable mutations in cytological specimens obtained by endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration with rapid onsite evaluation in pancreatic cancer | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Diagnostic Pathology | 6. 最初と最後の頁 152008 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anndiagpath.2022.152008 | 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 Hiroshi Ohyama, Yosuke Hirotsu, Kenji Amemiya, Toshio Oyama, Yuji Iimuro, Yuichiro Kojima, Rintaro Mikata, Hitoshi Mochizuki, Naoya Kato, Masao Omata | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Detection of actionable mutations in archived cytological bile specimens | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences | 6. 最初と最後の頁 837-847 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.994 | 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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 大山広、加藤直也、小俣政男 |
| 2. 発表標題 EUS-FNAにより得られた膵癌FFPE検体を活用した個別化医療の実現 |
| 3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大山広、加藤直也、小俣政男 |
| 2. 発表標題 膵癌EUS-FNA検体を用いたクリニカルシークエンスとリキッドバイオプシーによる治療薬探索 |
| 3. 学会等名 第103回日本消化器内視鏡学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiroshi Ohyama, Naoya Kato, Masao Omata |
| 2. 発表標題 GENOMIC PROFILE OF ENDOSCOPIC ULTRASOUND-GUIDED FINE NEEDLE ASPIRATION IDENTIFIES CLINICALLY APPLICABLE DRUGGABLE MUTATIONS IN PANCREATIC CANCER |
| 3. 学会等名 DDW 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiroshi Ohyama, Naoya Kato, Masao Omata |
| 2. 発表標題 Actionable mutations of malignant biliary tumors can be detected in archived biliary cytology specimens |
| 3. 学会等名 APASL Oncology 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大山広、弘津陽介、雨宮健司、三浦義史、菅元泰、小山敏雄、飯室勇二、小嶋裕一郎、三方林太郎、千葉哲博、望月仁、加藤直也、小俣政男 |
| 2. 発表標題 胆膵悪性腫瘍における胆汁を用いたリキッドバイオプシー；血液との比較 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子腫瘍マーカー研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 大山広、加藤直也、小俣政男 |
| 2. 発表標題 胆道狭窄における胆汁リキッドバイオプシーの可能性 |
| 3. 学会等名 第58回日本胆道学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大山広、弘津陽介、雨宮健司、杉原地平、大内麻愉、菅元泰、永嶋裕樹、飯野陽太郎、高橋幸治、日下部裕子、沖津恒一郎、大野泉、望月仁、加藤直也、小俣政男 |
| 2. 発表標題 治療標的遺伝子変異探索を目指した胆汁リキッドバイオプシー |
| 3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大山広、加藤直也、小俣政男 |
| 2. 発表標題 リキッドバイオプシーとしての胆汁ゲノム解析の可能性 血液との比較 |
| 3. 学会等名 第30回日本消化器関連学会週間 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大山広、加藤直也、小俣政男、弘津陽介、雨宮健司、廣瀬純穂、日下部裕子、安井伸、杉山晴俊、大野泉、三方林太郎、小山敏雄、鷹野敦史、飯室勇二、望月仁 |
| 2. 発表標題 胆汁ゲノムプロファイル解析は手術不能悪性胆道狭窄例において分子標的治療薬探索に有用である |
| 3. 学会等名 第57回日本胆道学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大山広、加藤直也、小俣政男 |
| 2. 発表標題 胆道由来細胞診検体のゲノム解析による早期診断と分子標的治療薬の検出 |
| 3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|