

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20823

研究課題名（和文）膵癌の腹腔洗浄液を用いたリキッドバイオプシーによる腹膜播種への臨床的応用性の検討

研究課題名（英文）Clinical utility of liquid biopsy using peritoneal lavage for peritoneal dissemination of pancreatic cancer

研究代表者

千葉 和治（Chiba, Kazuharu）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：50769627

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では膵臓癌における腹腔内転移の診断や予測を腹腔洗浄液を用いた解析で行うことを目的とし、2018年度より東北大学消化器外科で膵癌と診断され、手術を企図し腹腔内の検索を行った際に採取された腹腔洗浄液を用いてバイオマーカーの検索を行った。

のべ149例の腹腔洗浄液サンプルから腹腔洗浄液中の腫瘍マーカーの解析、膵癌の90%以上に認められるKRAS遺伝子変異をベンチマークとした癌由来DNAの有無及びアレレル頻度をリアルタイムPCR、droplet-digital PCRを用いて解析を行い、対応する血液サンプルと比較することで腹腔内転移では腹腔洗浄液中に有意に腫瘍由来DNAが多くなることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の本邦における5年生存率は10%未満と予後不良な難治性癌であり、原因として診断時の転移頻度の高さや治癒切除後の高い再発率が挙げられる。切除後再発の形式として腹膜播種再発は肝転移再発の次に多く、再発後の予後は極めて不良である。腹膜播種再発は、臓器再発と比べその機序が異なり、その転移形式はまだ明らかではない。腹腔洗浄液は腹膜に直接生理食塩水を振り掛け、腹腔内から回収した液性検体であり、腹腔洗浄液中の癌由来のcfDNAの存在は腹膜播種の潜在性や危険性を示唆するバイオマーカーとして極めて有用である。それら遺伝子の網羅的解析により、腹膜播種の機序及び薬物標的遺伝子の同定に至る可能性がある。

研究成果の概要（英文）： In this study, we aimed to diagnose and predict intra-abdominal metastasis in pancreatic cancer using analysis of peritoneal lavage. Since 2018, we have conducted a biomarker search using peritoneal lavage collected when pancreatic cancer was diagnosed and surgery was planned and searched in the abdominal cavity at Tohoku University Department of Gastroenterology.

Tumor markers in the peritoneal lavage were analyzed from a total of 149 samples, and the presence or absence of cancer-derived DNA and allele frequency were analyzed using real-time PCR and droplet-digital PCR, using KRAS gene mutation as a benchmark which is found in more than 90% of pancreatic cancer cases and the corresponding blood. By comparing with corresponding blood samples, it was found that intra-abdominal metastases have significantly more tumor-derived DNA in the peritoneal lavage fluid.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 リキッドバイオプシー 腹腔洗浄液 腫瘍由来DNA 腹膜転移 腹腔内微小転移 個別化医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌の本邦における5年生存率は10%未満と予後不良な難治性癌である。予後不良の原因として診断時の転移頻度の高さや、治癒切除後の高い再発率が挙げられる。膵癌は、切除に至らない進行症例が多く切除組織の入手が他癌腫に比較し困難であることからリキッドバイオプシーによる解析が注目されており、血液中から循環腫瘍DNA中の遺伝子異常の検索を目的とした報告が2015年より年々増加している¹⁾²⁾³⁾。近年では、対象となる液性検体が血液以外にも広がり、囊胞液⁴⁾⁵⁾や膵液⁶⁾などの他液性検体を用いた報告も散見されてきている。しかし腹腔洗浄液を用いた報告は僅かであり⁷⁾、その中でもKRAS遺伝子変異以外の膵癌由来遺伝子変異を検出した報告は未だ認めていない。膵癌腹膜播種は、他の再発形式と全く違う転移・進展機序を有し、これまで明らかにされておらず、切除後再発の形式として腹膜播種再発は肝転移再発の次に多く、再発後の予後は極めて不良である。腹膜播種再発は、臓器再発と比べその機序が異なり、標準治療である全身化学療法に対する治療耐性が強い。そのため腹膜播種再発に特化した早期診断、治療法の開発が必須である。

2. 研究の目的

本研究では、「膵癌患者の腹腔洗浄液中に存在する腫瘍由来DNAの網羅的遺伝子解析により、微小な腹膜播種の診断や予測を可能にし、さらに腹膜播種の機序解明に基づく新規治療法の開発により個別化医療への道を開く」ことを目的とする。

3. 研究の方法

2018年4月より、東北大学大学院医学系研究科外科学病態講座消化器外科学分野で膵癌と診断され、手術を企図し腹腔内の検索を行った149例から腹腔洗浄液を採取し、腹膜転移陽性(P1)、肝転移陽性(H1)、腹腔洗浄細胞診陽性(CY1)の有無を検索した。再発症例や低品質例を除外した132例(188サンプル)を対象に、腹腔洗浄液中に含まれる腫瘍マーカー(CEA、CA19-9)の計測を行った。そして腫瘍由来DNAであるKRAS遺伝子変異をDroplet-digital PCR(ddPCR)を用いて検出し、変異アレル頻度が1.0%以上のサンプルは次世代シーケンズ(NGS)を用いて膵癌関連遺伝子変異を検索した。また対応ある血液を用い、腹腔洗浄液中腫瘍由来DNAの陽性率およびアレル頻度を、腹腔内転移所見や腫瘍マーカーとの関連性で比較した。さらに、腹腔洗浄液中の腫瘍由来DNAの再発・予後との関連を生存解析を行い解析した。

4. 研究成果

2018年より手術を企図した膵癌症例188例の検体を採取し解析を行なった。結果としては、画像上転移を認めない症例の28%に肝転移や腹膜播種、腹腔洗浄細胞診陽性の所見を認め、そのうち腹膜播種は6%に認められた。また188例全例にddPCRを行い、25例(13%)にKRAS遺伝子変異を認めた。NGSはddPCRで測定されたKRAS遺伝子変異陽性陰性のドロプレットより求められる変異アレル頻度が1%以上の14例に対して施行し、14例全例よりKRAS遺伝子変異を検出し、そのうち8例ではTP53やCDKN2A、SMAD4、GNAS遺伝子変異の検出を認めた。14例中腹膜播種陽性例は7例で、1例のみ血液と同じ膵癌由来遺伝子変異(KRAS、TP53遺伝子変異)が同定されたが、6例は腹腔洗浄液中でのみ膵癌由来遺伝子変異が同定された。

また、データ欠損のない186例を対象とした腹腔洗浄液と血液中の腫瘍マーカー(CEA、CA19-9)の値を比較検討すると、血液よりも腹腔洗浄液の腫瘍マーカーが腹膜播種や腹腔洗浄細胞診の陽性所見と強い関連を認めた(図1)。同様に、腹腔洗浄液と血液中のKRAS遺伝子変異の陽性率を比較すると、血液よりも腹腔洗浄液中のKRAS遺伝子変異陽性率が腹膜播種陽性例で有意に高率を示した(血液22.2% vs 腹腔洗浄液88.9%、 $p < 0.001$)

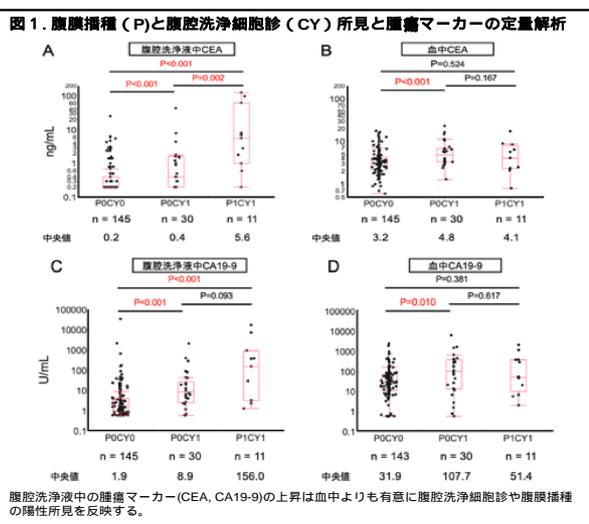
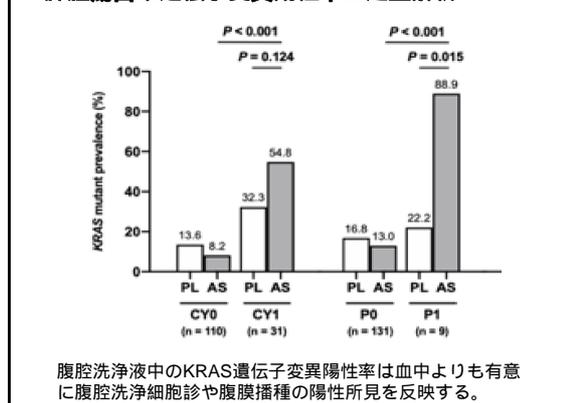


図2. 腹膜播種(P)と腹腔洗浄細胞診(CY)所見と膵腫瘍由来遺伝子変異陽性率の定量解析



腹腔洗浄液中のKRAS遺伝子変異陽性率は血中よりも有意に腹腔洗浄細胞診や腹膜播種の陽性所見を反映する。

(図2) また、KRAS 遺伝子変異アレル頻度においても、腹腔洗浄液中の腹腔洗浄細胞診陽性所見や腹膜播種陽性所見に伴い血液よりも腹腔洗浄液で高値を示した(図3)。

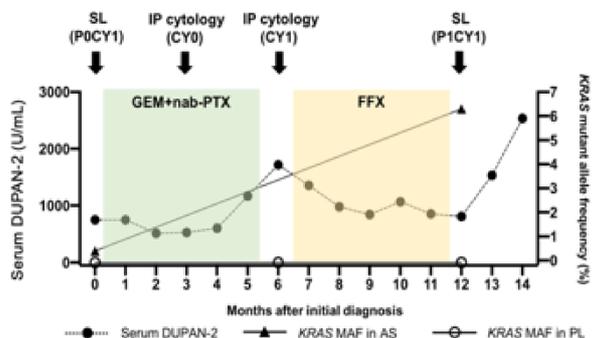
複数回腹腔洗浄液の採取を行なった症例の腹腔洗浄細胞診と腹膜播種の所見と、腹腔洗浄液や血液中の腫瘍マーカー、腫瘍由来遺伝子変異アレル頻度の解析では、腹腔洗浄細胞診陽性所見のみから腹膜播種陽性に病勢が進行するに従い、腹腔洗浄液中の腫瘍由来遺伝子変異アレル頻度だけが高値となる結果を認めた。術前に全身化学療法などの治療を行っていない55例を対象とした予後因子解析では、観察中央期間が479日と短期間の観察となったが、膵癌由来遺伝子変異が独立した予後不良因子であった(HR 3.607、95%CI 1.165-11.164、P=0.029)。

以上の結果から、腹腔洗浄液中には膵癌由来である遺伝子変異の情報を含んでおり、一部の腹膜転移サンプルでは腹腔洗浄液中にのみ膵癌関連遺伝子変異が検出され、腹膜転移に関する診断や予測への可能性を秘めたりキッドバイオプシーとしての有用性が示された。

(引用文献)

- 1) Takai E, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2015;5:18425.
- 2) Takai E, et al. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy target for detection of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22 (38):8480-8.
- 3) Cohen HD, et al. Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proceeding of the National Academy of Science.* 2017;114(38): 10202.
- 4) Hata T, et al. Cyst Fluid Telomerase Activity Predicts the Histologic Grade of Cystic Neoplasms of the Pancreas. *Clin Cancer Res.* 2016;22(20):5141-51.
- 5) Hata T, et al. Predicting the Grade of Dysplasia of Pancreatic Cystic Neoplasms Using Cyst Fluid DNA Methylation Markers. *Clin Cancer Res.* 2017;23(14):3935-44.
- 6) Kanda M, et al. Mutant TP53 in duodenal samples of pancreatic juice from patients with pancreatic cancer or high-grade dysplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(6):719-30e5.
- 7) Suenaga M, et al. Peritoneal Lavage Tumor DNA as a Novel Biomarker for Predicting Peritoneal Recurrence in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2021;28:2277-86.

図3.連続して評価を行なった症例の経過と血中腫瘍マーカー、遺伝子変異アレル頻度の推移



腹腔洗浄液における膵癌由来遺伝子変異アレル頻度はP0CY0(細胞診、腹膜播種共に陰性)からCY1(細胞診のみ陽性)、P1CY1(細胞診、腹膜播種ともに陽性)となる課程で高値に推移している。
(DUPAN-2; 膵癌腫瘍マーカー、SL: staging laparoscopy 審査腹腔鏡、IP cytology: intraperitoneal cytology 腹腔洗浄細胞診、Gem+nab-PTX及びFFX;ジェムザール+アブラキサン及びFOLFIRINOX とともに膵癌標準的薬療法のレジメン)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Chiba Kazuharu, Hata Tatsuo, Mizuma Masamichi, Masuda Kunihiro, Aoki Shuichi, Takadate Tatsuyuki, Kawaguchi Kei, Nakagawa Kei, Morikawa Takanori, Motoi Fuyuhiko, Furukawa Toru, Unno Michiaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Impact of Tumor-Derived DNA Testing in Peritoneal Lavage of Pancreatic Cancer Patients with and Without Occult Intra-Abdominal Metastases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 2685 ~ 2697
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-021-10997-w	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0件

〔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
---------	---------