

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293285

研究課題名(和文) IPMN併存膵癌の分子生物学解析に基づく膵癌早期診断法の開発

研究課題名(英文) Early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma based on the molecular assessment of pancreatic ductal adenocarcinoma concomitant with IPMN of the pancreas.

研究代表者

大塚 隆生(OHTSUKA, Takao)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20372766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：IPMN併存膵癌の切除標本を用いて、MUC染色による亜型分類とGNAS変異に注目した分子生物学的解析を行ったところ、併存膵癌はMUC2陰性の胃型、GNAS野生型のIPMNに高頻度に合併していた。また十二指腸液を用いた解析ではIPMNのGNAS変異を90%以上の感度で同定することができた。GNAS野生型のIPMNを膵癌高危険群として重点的な経過観察を行うことで膵癌を早期に診断できる可能性が示唆された。また病変のGNAS/KRAS変異解析はIPMN併存膵癌とIPMN由来浸潤癌の鑑別にも有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The clinicopathologic features of the patients with IPMN with distinct pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) were reviewed. The GNAS status in the IPMN tissue and DF specimens was assessed by sensitive mutation scanning methods. The GNAS mutation rate in IPMN with distinct PDAC was significantly lower than that in IPMN without PDAC. By multivariate analysis, GNAS wild-type and gastric type IPMN were significantly associated with distinct PDAC. The GNAS status in DF was consistent with that in tissue in over 90% of the patients. Taken together, distinct PDACs frequently develops in the pancreas with gastric type IPMN without GNAS mutations. DF DNA test would predict the GNAS status of IPMN, while the detection of the gastric subtype using noninvasive test remains to be determined. Another insight in this study is that it may be possible to distinguish invasive IPMN from concomitant PDAC by assessing molecular biomarkers, especially by KRAS/GNAS mutation status.

研究分野：医歯薬学

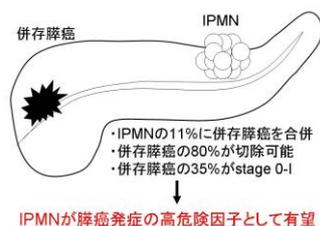
キーワード：IPMN 膵癌 併存膵癌 GNAS 早期診断

1. 研究開始当初の背景

膵癌は本邦の癌死亡原因第4位であるが、その対策は遅れており、5年生存率は5%未満のみである。膵癌の80%以上がstage IVの高度進行癌で診断される現状を鑑みると、膵癌の早期診断法開発が治療成績向上のためには重要であり、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。膵癌の治療法開発に比べ早期診断に関する研究は国内外を通じて非常に少ない。これは膵癌発症の高危険群が判明しておらず、効率のよいスクリーニング法を開発する糸口すら掴めていないからである。疫学的には慢性膵炎、喫煙、膵癌家族歴、糖尿病などが危険因子として知られているが、対象範囲が広く、早期膵癌診断に繋がる因子としては認知されていない。米国では家族性膵癌や遺伝性乳癌遺伝子異常に注目したスクリーニングに取り組んでいるが、十分な成果は得られていない。我々も糖尿病患者に対するERCPを用いたスクリーニングを行ったが、膵癌診断率は比較的高いものの、そのほとんどが高度進行癌であった。

最近新たな膵癌の危険因子として膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN; intraductal papillary mucinous neoplasm)が注目されている。IPMN自身は良性であることが多く、一部癌化するものの悪性度は高くはない。欧米ではIPMN併存膵癌の認知度が低いが、本邦では多くの疫学的調査からIPMNの3-10%に膵癌を合併することが分かっている。国際診療ガイドラインの発刊によりIPMNは広く認識されるようになり、画像診断の進歩もあり診断頻度が増えてきている。IPMNの膵癌合併頻度3-10%は慢性膵炎、喫煙、膵癌家族歴、糖尿病と比べ圧倒的に高く、IPMNが膵癌診断のための高危険群として極めて有望である。IPMNは4つの組織型(胃型、腸型、膵胆型、好酸型)に分類されるが、その際MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, CDX2などのマーカー発現が参考となる。またIPMNは早い段階からGNAS遺伝子変異を高率に認め、これらのマーカーは膵液、十二指腸液で検索することが可能となっている。つまりIPMN患者の中で膵癌高危険群を簡便なマーカー検索で同定できれば、効率的な膵癌早期発見へ向けて大きな進歩となる。

我々は膵癌が良性の分枝型PMNの約~11%に併存することを報告した。またIPMN併存膵癌のうち80%が切除可能で、35%が早期に診断され、早期診断に際してはERCPによる膵液細胞診が有用であることも報告した。良性分枝型IPMNの多くはMUC2陰性・胃型IPMNで、悪性の頻度が高いMUC2陽性・腸型IPMNとは形態を異にする。一方、



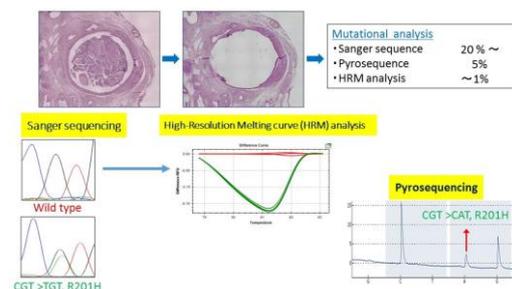
IPMN併存膵癌はMUC2陰性で胃型IPMNと同じ発現形式を呈しており、MUC2陰性という遺伝子異常をベースに同一膵内にIPMNと併存膵癌が発生するという、膵癌の発症過程を考える上で大変興味深い結果が得られた。また少数ながらGNAS遺伝子変異も併せて調べたところ、膵癌併存IPMNにGNAS変異を全く認めなかった。つまり「MUC2陰性胃型・GNAS変異なし」のIPMNが膵癌発症高危険群である可能性が高く、これを同定して重点的にスクリーニングを行うことで膵癌を効率よく早期に発見できる可能性が高いという着想に至った。スクリーニング法としては膵液に注目しており、我々はこれまで膵液内の各種分子生物学的マーカー(蛋白、mRNA, microRNA)が膵癌の診断に有用であることを報告してきており、これにより膵癌高危険群の同定と膵癌の早期診断を効率よく行うことができると考えている。

2. 研究の目的

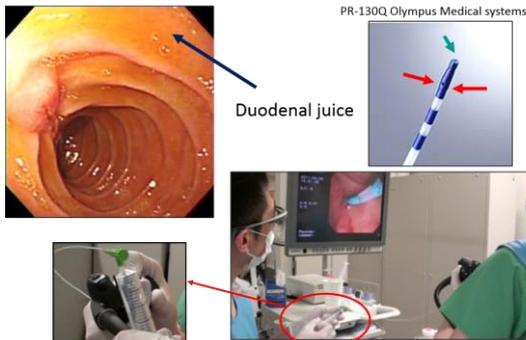
膵癌の併存頻度が高いIPMNに注目し、MUC, GNASを中心とした遺伝子異常から膵癌発症高リスク群を同定し、膵液を用いた簡便なマーカー検索による膵癌早期診断法の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

同一膵内に発症し、切除されたIPMNと併存膵癌のパラフィン包埋(FFPE)切片および凍結切片を用いた解析を行った。MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, CDXの発現解析はFFPEを用いた免疫染色法を用いた。特にMUC2の染色性が重要であり、MUC2陽性が腸型IPMN、MUC2陰性が非腸型(主に胃型)となり、マーカー解析の基本となる。同様の手法で併存膵癌FFPE切片を用いた免疫染色により、マーカー発現パターンを同一膵内のIPMNと対応させて、その相同性を確認した。GNAS変異は主にcodon 201に起こることがわかっており、これをコードする配列を含むexon 8のシークエンスを行うようプライマーを設計した。DNAは安定性の問題から凍結切片から抽出し、Competitive allele specific TaqMan PCR法で配列のシークエンスを行い、変異の有無を確認した。



膵癌や IPMN の術前診断およびマーカー解析に必要なサンプル検体として ERCP 下に採取した膵液や十二指腸液などがあるが、非侵襲的に採取できるという観点から十二指腸液を用いた。画像で IPMN と診断された患者から十二指腸液を採取し、IPMN 併存膵癌の高危険因子同定に必要な GNAS 変異の検索を行った。



4. 研究成果

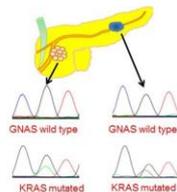
IPMN 併存膵癌 20 例 (26 病変) を含む 179 例の IPMN 切除標本を用いて、MUC 染色による subtype 分類と GNAS 変異に注目した分子生物学的解析を行ったところ、併存膵癌の 90% は MUC2 陰性の胃型 IPMN に合併している。

| Subtype of IPMN | Low-grade dysplasia | Intermediate-grade dysplasia | High-grade dysplasia | Associated invasive carcinoma | Total |
|-------------------|---------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------|
| Gastric | 11 / 77 | 4 / 18 | 2 / 5 | 1 / 10 | 18 / 110 |
| Intestinal | 5 | 1 / 17 | 12 | 15 | 1 / 49 |
| Pancreato-biliary | 0 | 0 | 1 / 8 | 9 | 1 / 17 |
| Oncocytic | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 |

Concomitant PDAC
Frequent in benign, gastric-type IPMNs (18/110, 16.4%)

また 6 例で IPMN (胃型 5 例、腸型 1 例) と併存膵癌の GNAS 変異を調べたところ、併存膵癌 6 病変と胃型 IPMN 5 病変に GNAS 変異は認めず、腸型 IPMN の 1 例のみに GNAS 変異を認めた。また併存膵癌は分枝型 IPMN

| No. | Lesion type | GNAS status | KRAS status |
|-----|------------------------|-------------|-------------|
| 1 | IPMN (Gastric-type) | Wild type | G12D |
| | PDAC | Wild type | G12V |
| 2 | IPMN (Gastric-type) | Wild type | G12V |
| | PDAC | Wild type | G12D |
| 3 | IPMN (Gastric-type) | Wild type | G12D |
| | PDAC | Wild type | G12R |
| 4 | IPMN (Gastric-type) | Wild type | G12D |
| | PDAC | Wild type | G12V |
| 5 | IPMN (Intestinal-type) | R201H | Wild type |
| | PDAC | Wild type | G12D |
| 6 | IPMN (Gastric-type) | Wild type | Wild type |
| | PDAC | Wild type | G12V |



に合併することが圧倒的に多いが、我々は最近 3 例の主膵管型 IPMN 併存膵癌を経験しており、この 3 例の主膵管型 IPMN はいずれも MUC2 陰性・胃型で、GNAS 変異を認めなかった。すなわち MUC2 陰性・胃型で GNAS 変異を認めない IPMN が分枝型、主膵管型を問わず併存膵癌合併の高危険群と考えられた。

十二指腸液での GNAS 変異解析

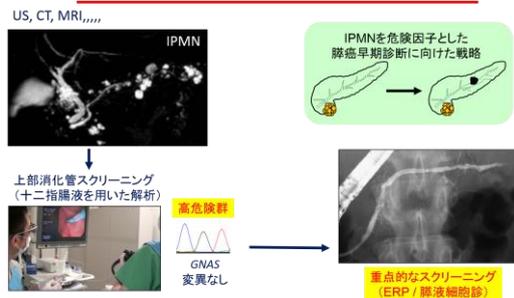
| 年齢 / 性 | IPMN 切除標本 | | | 十二指腸液 |
|------------|-----------|------|----|-------|
| | 型 | 組織異型 | 亜型 | GNAS |
| 1. 70 / F | 分枝 | 低 | 胃 | 野生型 |
| 2. 70 / F | 混合 | 浸潤癌 | 胃 | 野生型 |
| 3. 82 / F | 主膵管 | 低 | 胃 | 野生型 |
| 4. 51 / M | 混合 | 高 | 腸 | 野生型 |
| 5. 78 / F | 混合 | 低 | 胃 | R201H |
| 6. 70 / M | 分枝 | 高 | 胆膵 | R201H |
| 7. 79 / M | 分枝 | 低 | 胃 | R201H |
| 8. 68 / M | 混合 | 低 | 胃 | R201H |
| 9. 52 / M | 分枝 | 中 | 胃 | R201H |
| 10. 56 / M | 分枝 | 中 | 腸 | R201C |

23 例中 21 例 (91%) で GNAS の状態が一致

また IPMN 切除予定の患者 23 名の十二指腸液中の GNAS 変異を調べたところ、21 名 (91%) で十二指腸液と切除 IPMN の GNAS 変異形式が一致し、膵癌発症高リスク IPMN の拾い上げに有用である可能性が示された。

以上の結果から、IPMN を膵癌の高危険群としたスクリーニング法として以下の戦略が成り立つ。今後実臨床で検証していき、膵癌の早期診断に寄与することが明らかとなれば、膵癌患者の予後改善につながることを期待される。

IPMN を危険因子とした膵癌早期診断の戦略



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Miyasaka Y, Ohtsuka T, et al. Predictive factors for the metachronous development of malignant lesions in the remnant pancreas after partial pancreatectomy for IPMN. **Ann Surg**, 263;1180-1187, 2016, in press, 査読有 (doi: 10.1097/SLA.0000000000001368).
2. Tamura, K, Ohtsuka T, et al. Distinction of invasive carcinoma derived from IPMNs from concomitant ductal adenocarcinoma of the pancreas using molecular biomarkers. **Pancreas**, 2016, in press, 査読有 (doi: 10.1097/MPA.0000000000000563).
3. Tamura K, Ohtsuka T, et al. Assessment of clonality of multisegmental main duct IPMNs of the pancreas based on GNAS mutation analysis. **Surgery** 157; 277-84, 2015, 査読有、(doi:10.1016/j.surg.2014.09.013.)
4. Ideno N, Ohtsuka T, et al. Clinical significance of GNAS mutation in IPMN of the pancreas with concomitant pancreatic ductal adenocarcinoma. **Pancreas** 44;

- 311-20, 2015. 査読有,
(doi: 10.1097/MPA.000000000000258.)
5. Kimura H, Ohtsuka T, et al. Predictors and diagnostic strategies for early-stage pancreatic ductal adenocarcinoma. A retrospective Study. **Pancreas** 44; 1148-54, 2015. 査読有
(doi: 10.1097/MPA.0000000000000393)
 6. Date K, Ohtsuka T, et al. GNAS and KRAS mutational analyses of intraductal papillary neoplasms of the pancreas and bile duct developing in the same individual: A case report. **Pancreatology** 15; 713-6, 2015. 査読有,
(doi: 10.1016/j.pan.2015.09.013.)
 7. 伊達健治朗、大塚隆生、ほか. 膵管内乳頭粘液性腫瘍; 危険因子. **日本臨床** 73(増刊号 3); 206-9, 2015. 査読無
 8. 大塚隆生、宮坂義浩、ほか. 膵管内乳頭粘液性腫瘍; 術後経過観察法. **日本臨床** 73(増刊号 3); 256-9, 2015. 査読無
 9. 宮坂義浩、大塚隆生、ほか. 膵管内乳頭粘液性腫瘍; 予後. **日本臨床** 73(増刊号 3); 260-3, 2015. 査読無
 10. 田村公二、大塚隆生、ほか. IPMN/MCN 国際診療ガイドライン 2012 年の概要. **日本臨床** 73(増刊号 3); 400-4, 2015. 査読無
 11. Tamura K, Ohtsuka T, et al. Treatment strategy for main duct IPMNs of the pancreas based on the assessment of the recurrences in the remnant pancreas after resection: a retrospective review. **Ann Surg** 259; 360-8, 2014. 査読有,
(doi: 10.1097/SLA.0b013e3182a690ff)
 12. Mori Y, Ohtsuka T, et al. Intraoperative irrigation cytology of the remnant pancreas to detect remnant distinct pancreatic ductal adenocarcinoma in patients with IPMN undergoing partial pancreatectomy. **Surgery** 155; 67-73, 2014. 査読有,
(doi: 10.1016/j.surg.2013.06.059.)
 13. Aso T, Ohtsuka T, et al. Elevated expression level of microRNA-196a is predictive of intestinal type IPMN of the pancreas. **Pancreas** 43; 361-6, 2014. 査読有,
(doi: 10.1097/MPA.0000000000000042.)
 14. Aso T, Ohtsuka T, et al. "High risk stigmata" of the 2012 International consensus guidelines correlate with the malignant grade of branch duct IPMNs of the pancreas. **Pancreas** 43; 1239-43, 2014. 査読無,
(doi: 10.1097/MPA.0000000000000199.)
 15. Ohtsuka T, et al. Role of pancreatic juice cytology in the preoperative management of IPMN of the pancreas in the era of international consensus guidelines 2012. **World J Surg** 38; 2994-3001, 2014. 査読無
(doi: 10.1007/s00268-014-2684-y.)
 16. 安蘇鉄平、大塚隆生、他. 膵液細胞診および膵液遺伝子検査による膵癌診断. **臨床** 69;12-6, 2014. 査読無
 17. 大内田研宙、大塚隆生、ほか. 膵液中バイオマーカーで膵疾患の診断、早期発見はできるか. **分子消化器病** 11; 42-9, 2014. 査読無
 18. 渡邊雄介、大塚隆生、ほか. 国際診療ガイドライン 2012~改訂のポイント~. **肝胆膵** 69; 1201-6, 2014. 査読無
 19. Mori Y, Ohtsuka T, et al. A minimally invasive and simple screening test for detection of pancreatic ductal adenocarcinoma using biomarkers in duodenal juice. **Pancreas** 42; 187-92, 2013. 査読有,
(doi: 10.1097/MPA.0b013e3182649979.)
 20. Ohtsuka T, et al. Role of ERCP for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma concomitant with IPMN of the pancreas. **J Hepatobiliary Pancreat Sci** 20; 356-61, 2013. 査読有,
(doi: 10.1007/s00534-012-0541-7.)
 21. Ideno N, Ohtsuka T, et al. IPMNs of the pancreas with distinct pancreatic ductal adenocarcinomas are frequently of gastric subtype. **Ann Surg** 258; 141-51, 2013. 査読有,
(doi: 10.1097/SLA.0b013e31828cd008.)
 22. Tamura K, Ohtsuka T, et al. Unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma in the remnant pancreas diagnosed during every-6-month surveillance after resection of branch duct IPMN: A case report. **JOP** 14; 450-3, 2013. 査読有,
(doi: 10.6092/1590-8577/1494.)
- [学会発表] (計 9 件)
1. 大塚隆生、ほか: Surgical treatment strategy for IPMN of the pancreas based on Fukuoka consensus guidelines 2012. 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015/4/17、東京.
 2. 大塚隆生、ほか: 九州大学での膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)の切除方針. 第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2015/6/12、東京.
 3. 大塚隆生、ほか: 膵 IPMN における GNAS 変異の臨床的意義. 第 20 回日本外科病理学会学術集会 2015/11/7、和歌山.
 4. 大塚隆生、ほか: 内視鏡による IPMN 併存膵癌高危険群の同定. 第 87 回日本消化器内視鏡学会総会 2014/5/16 福岡.
 5. Ohtsuka T, et al: Clinical experiences in Japan: Surgical treatment of IPMN. 第 45 回日本膵臓学会大会 2014/7/11 北九州.
 6. 大塚隆生、ほか: 集学的アプローチに基づいた主膵管型膵管内乳頭粘液性腫瘍の至適治療方針. 第 21 回日本消化器関連学会週間(JDDW)、2014/10/25 神戸.
 7. Ohtsuka T, et al. The role of pancreatic juice cytology for the management of IPMNs of the pancreas. International Surgical Week

2013. Aug 29, 2013, Helsinki, Finland.
8. 大塚隆生,ほか:膵液細胞診を用いた IPMN 併存膵癌の早期診断の試み. 第 44 回日本膵臓学会大会 2013/7/25 仙台.
 9. 大塚隆生,ほか:分子生物学的解析による IPMN 併存膵癌ハイリスク群の同定. 第 21 回日本消化器関連学会週間(JDDW) 2013/10/10、東京.

[図書] (計 5 件)

1. Ohtsuka T, et al. Chapter 8-Diagnostic investigation using pancreatic juice. In: Tanaka M (ed): Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. Pp. 103-13, Springer, Tokyo, 2014.
2. Ohtsuka T, Tanaka M. Chapter 15-Postoperative surveillance of main duct IPMN. In: Tanaka M (ed): Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. Pp. 181-8, Springer, Tokyo, 2014.
3. Ohtsuka T, Tanaka M. Chapter 16-Postoperative surveillance of branch duct IPMN. In: Tanaka M (ed): Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. Pp. 189-99, Springer, Tokyo, 2014.
4. Ohtsuka T, Tanaka M: IPMN of the pancreas; characteristics, diagnosis, and management based on the Fukuoka consensus guidelines 2012. **The Pancreapedia** 2014 (DOI: 10.3998/panc.2014.10)
5. Ohtsuka T, Tanaka M: Pancreatic ductal adenocarcinoma concomitant with IPMN of the pancreas; clinical and molecular aspects and challenge to the early diagnosis. **The Pancreapedia** 2014 (DOI: 10.3998/panc.2014.13)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 隆生 (OHTSUKA, Takao)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号 : 20372766

(2) 研究分担者

田中 雅夫 (TANAKA, Masao)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号 : 30163570
(2013 年度)

水元 一博 (MIZUMOTO, Kazuhiro)
九州大学・大学病院・准教授

研究者番号 : 90253418
(2013 年度)

高畑 俊一 (TAKAHATA, Shunichi)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号 : 50437779

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 20452708

坂井 寛 (SAKAI, Hiroshi)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号 : 80611281
(2013 年度)

(3) 連携研究者
なし