

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860527

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた膵疾患診断および治療効果予測の検討

研究課題名(英文) Diagnosing pancreatic diseases and predicting therapeutic efficacy by using next generation sequencing

研究代表者

高野 伸一 (TAKANO, SHINICHI)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：80377506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌や膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)をはじめとする膵腫瘍は、十分な組織検体を術前に得ることが容易でなく、診断・治療ともに困難な疾患である。一方で近年の目覚ましい技術革新により、以前は困難であった遺伝子解析を少量の臨床検体から容易に行うことが可能となりつつある。

本研究では検査時に得られる膵液を用い、最新の次世代シーケンサーで遺伝子変異検索を試みた。その結果、これまで報告されているようにIPMNでGNAS遺伝子変異がみられるが、この変異が膵管拡張を有するIPMNで有意に検出された。この臨床的意義については今後のさらなる解析を要するが、今回の結果は膵疾患の病態解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic neoplasms such as pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasms are still difficult to diagnose and treat because of insufficient availability of obtaining specimens preoperatively. On the other hand, rapid progress of technical improvements has enabled us to examine genetic abnormalities with a small amount of clinical samples easily.

In this study, we analysed mutational status of pancreatic diseases using clinically obtained pancreatic juice and found that GNAS mutation seen in cases with IPMN is associated with dilation of main pancreatic duct. Though the meanings of this findings need more analysis, we believe our study will contribute to clarify causes of pancreatic disease.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵腫瘍 次世代シーケンサー 遺伝子変異 膵液

1. 研究開始当初の背景

- (1) 膵腫瘍の診断においては画像診断の発達とともに、近年では EUS-FNA (超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診) による組織採取が積極的に行われるようになり、膵腫瘍性病変に対する診断能の向上が認められている。また、腫瘍がはっきりせず EUS-FNA で穿刺が不可能な膵管狭窄を呈する症例は、従来通り ERCP 時に膵液細胞診が行われるが、いまだ良悪性診断に難渋する症例が存在し、結果として過大手術や過小評価になる症例が存在する。
- (2) IPMN の良悪性診断は、最近では超音波内視鏡による結節高診断が非常に重要な位置を占めているが、ほぼコンセンサスとなっている結節高 6 mm 以上の症例を切除しても、癌でないことがしばしば経験され、より正確な診断法の開発が望まれる。
- (3) 切除不能膵癌患者においては抗癌剤治療が第一選択となるが、治療をしても予後の延長には限度があり、使用する薬剤を適切に選択する必要がある。長期予後が見込めず、薬物効果が限定的な現状では、抗癌剤治療開始前に治療効果予測ができれば非常に有用である。
- (4) 以上の問題についてこれまで、膵液や EUS-FNA 検体を用いたタンパク質、mRNA での発現レベルや DNA の somatic mutation の検出により、診断能の向上や治療効果予測の検討がなされてきた。遺伝子変異の検出にはこれまで、特定の領域をターゲットとしシークエンスすることが主流であり、多くの DNA 量を用いてごく一部の領域の変異しか検出できず、また高コストかつ結果が得られるまで長い時間を要した。そのため、臨床検体でいくつもの癌関連遺伝子変異を検出することは現実的でなかったが、最近開発された次世代シークエンサーでは、わずかな DNA 量(10ng)で一度に多くの癌関連遺伝子変異の検出をすることが可能となった(例えば 46 遺伝子、739 か所の癌関連遺伝子変異)。
- (5) また、さまざまな細胞成分が含まれる臨床検体において、わずかな組織成分に含まれるであろう遺伝子変異、すなわちわずかな頻度の変異は検出ができないことが、診断能の制約につながっている。この制約により、癌の遺伝子変異検出を臨床検体で行うことは現実的でなかったが、次世代シークエンサーの登場により、多数の遺伝子変異を短時間にかつ低頻度の変異も高感度に検出可能となり、実臨床で遺伝子変異診断を利用することが現実

味を帯びてきた。

2. 研究の目的

本研究では膵疾患精査患者から得られた膵液、EUS-FNA 検体、切除組織を用い、次世代シークエンサーによる癌関連遺伝子変異を検索することで、膵疾患の良悪性診断や化学療法の治療効果予測に有用な遺伝子変異を同定し、それを実臨床に反映させることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 膵疾患精査目的に施行した ERCP 検査時に採取した膵液および切除組織から遺伝子変異を検索した。DNA 抽出後、ターゲットとした癌関連 46 遺伝子を multiplex PCR にて増幅し、次世代シークエンサーにてシークエンスを行った。検討 1: 膵液 152 検体 (正常 9 例、慢性膵炎 22 例、膵癌 39 例、IPMN 82 例) を対象とし、疾患別に遺伝子変異の出現頻度を検討し、IPMN では臨床因子と遺伝子変異の関連について統計学的解析を行った。検討 2: 切除組織 27 例 (膵癌 17 例、IPMN 10 例) を対象とし検討 1 と同様にシークエンスを行った。本研究は遺伝子解析研究に関する本大学倫理委員会の承認および対象者からの同意を得て研究を行った。
- (2) 検体採取
膵液の採取に関して、以前使用可能であったセクレチンの使用が日本国内では不可能となり、十分な量の膵液採取が困難となっている。本教室では実臨床で用いる細胞診検査を、診断能向上のため ERCP 時に経鼻膵管ドレナージチューブを留置し (ENPD) 頻回に施行している。同時にこの ENPD チューブより十分な量の膵液採取が可能であり、本研究遂行において有利な環境となっている。得られた臨床検体は -80 保存し、DNA 抽出後は -20 に保存し、検体中の DNA の Loss を最小限に抑える。
- (3) 次世代シークエンサーによる遺伝子変異検索
膵液 DNA を抽出後に DNA シークエンスのためのライブラリーを作成 (Ion Ampliseq™ Cancer Panel ; Life Technologies Corporation, California)。シークエンス機器は Ion PGM Sequencer (Life Technologies Corp.) を用い、付属の Torrent Suite Software (ver.2.2) で遺伝子変異を検出する。検索する遺伝子変異は 46 遺伝子 739 か所の変異を予定しているが、有意な結果が得られない

場合はさらに広範な癌関連の409遺伝子のシーケンスを行い解析する (Figure 1)。

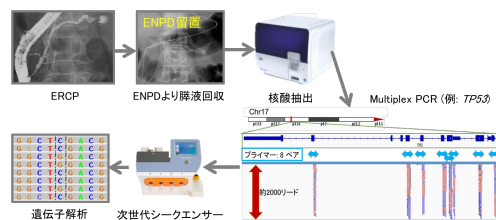


Figure 1

(4) 臨床データとの照合

得られた遺伝子変異と臨床データを照合し、疾患における遺伝子変異を臨床的意義を解明し、将来的には良悪性診断に有用な遺伝子変異の同定および化学療法の治療効果予測に関連する遺伝子変異の同定を目指した。

4. 研究成果

- (1) ENPD からは十分量の膵液を採取することが可能であり、膵液 400ul から約 3ug の DNA を抽出することが可能であった。これは、多領域の遺伝子塩基配列を決定するに十分な量であった。
- (2) 正常膵患者、慢性膵炎患者、IPMN 患者由来の膵液抽出 DNA から、癌関連 46 遺伝子の網羅的遺伝子変異検索を行ったところ、シーケンス深度は平均約 1400 リード得られた。検出された変異遺伝子としては、KRAS、TP53 変異に加え、GNAS 変異を慢性膵炎の 4.5%、膵癌の 7.7%、IPMN の 41.5%に認めた (Figure 2)。

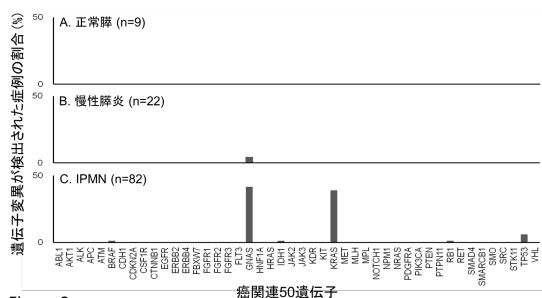


Figure 2

- (3) 慢性膵炎での GNAS 変異検出例は微小膵嚢胞が存在しており、IPMN の初期病変を伴っていた可能性がある。また、IPMN における GNAS 変異の臨床的意義を解明する目的で臨床因子との多変量解析をしたところ、GNAS 変異と主膵管拡張が関連していた ($p < 0.001$, Table 1)。この結果の臨床的意義解明にはさらなる検討を要するが、GNAS 変異を有する IPMN は膵管拡張、すなわち粘液を多く産生するタイプ

である可能性が示唆された。IPMN は膵癌の前癌病変ともいわれるが、病型により悪性化しやすいものとそうでないものが知られている。悪性であるものおよび悪性化する可能性の高い IPMN の病型診断を事前に行うことが重要と考えられるが、本研究で得られた知見は IPMN の病型診断を術前に行う上で有用である可能性がある。

Table 1 GNAS 変異と IPMN 臨床因子の関連

	症例 n	GNAS変異症例		p value
		n	(%)	
年齢	≤ 65	24	10 (41.7)	0.981
	> 65	58	24 (41.4)	
性別	M	47	19 (40.4)	0.825
	F	35	15 (42.9)	
部位	Ph	34	14 (41.2)	0.970
	Pbt	24	10 (41.7)	
良悪性	Benign	45	16 (35.6)	0.231
	Malignant	37	18 (48.6)	
IPMN type	Main duct	33	18 (54.5)	0.048 *
	Branch	49	16 (32.7)	
嚢胞径	≤ 30 mm	26	13 (50.0)	0.166
	> 30 mm	45	15 (33.3)	
結節高	≤ 6 mm	55	23 (41.8)	0.926
	> 6 mm	27	11 (40.7)	
主膵管径	≥ 6 mm	26	16 (61.5)	0.010 *
	< 6 mm	46	14 (30.4)	
嚢胞の数	< 3	58	28 (48.3)	0.052
	≥ 3	24	6 (25.0)	

- (4) 上記研究以外に、膵癌や膵神経内分泌腫瘍における遺伝子解析も施行し解析中である。近年切除不能膵腫瘍に対して従来の殺細胞性抗腫瘍剤以外に、腫瘍細胞増殖に特異的にみられるシグナルを阻害する分子標的薬が多く登場した。膵神経内分泌腫瘍でも mTOR 阻害剤と言われる分子標的薬が使用されているが、この薬剤の治療効果予測と mTOR シグナル関連遺伝子変異の関連を解明すべく、解析を継続している。

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 1 件)

Takano S, Fukasawa M, Maekawa S, Kadokura M, Miura M, Shindo H,

Takahashi E, Sato T, Enomoto N: Deep Sequencing of Cancer-Related Genes Revealed GNAS Mutations to Be Associated with Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms and Its Main Pancreatic Duct Dilatation. PLoS One 2014, 9:e98718. doi: 10.1371. (査読あり)

[学会発表](計 8 件)

高野 伸一, 深澤 光晴, 進藤 浩子, 高橋 英, 横田 雄大, 廣瀬 純男, 門倉 信, 佐藤 公, 榎本 信幸: 遺伝子解析・膵液腫瘍マーカー・細胞診・画像所見を統合した集学的なIPMN良悪性診断. 第22回日本消化器関連学会週間 2014/10/25発表, 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸: 内視鏡と機能・分子診断(消化管・胆膵)膵液の次世代シーケンサー解析によるIPMNの癌関連遺伝子診断. 第87回日本消化器内視鏡学会総会 2014/05/17発表, 福岡国際会議場(福岡)

横田 雄大, 高野 伸一, 深澤 光晴, 高橋 英, 進藤 浩子, 門倉 信, 佐藤 公, 榎本 信幸: 膵神経内分泌腫瘍の遺伝子解析により同定された β -catenin変異. 第87回日本消化器内視鏡学会総会 2014/05/17発表, 福岡国際会議場(福岡)

横田 雄大, 高野 伸一, 深澤 光晴, 高橋 英, 進藤 浩子, 門倉 信, 佐藤 公: 次世代シーケンサーによる膵神経内分泌腫瘍の遺伝子解析. 第45回日本膵臓学会総会 2014/7/11発表, 北九州国際会議場(福岡・小倉)

横田 雄大, 高野 伸一, 榎本 信幸: 消化器における神経内分泌腫瘍 次世代シーケンサーによる膵神経内分泌腫瘍の遺伝子解析. 第22回日本消化器関連学会週間 2014/10/25発表, 神戸国際会議場(兵庫・神戸)

高野 伸一, 深澤 光晴, 佐藤 公: 次世代シーケンサーによる膵液癌関連遺伝子変異の検出. 第44回日本膵臓学会総会 2013/7/25発表, 仙台国際センター(宮城・仙台)

高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸: Endoscopic oncology 膵液の次世代シーケンサー解析および腫瘍マーカー測定

による膵疾患診断. 第21回日本消化器関連学会週間 2013/10/11発表, グランドプリンスホテル新高輪(東京・品川)

横田 雄大, 深澤 光晴, 高橋 英, 進藤 浩子, 門倉 信, 高野 伸一, 佐藤 公, 榎本 信幸: 次世代シーケンサーによる膵神経内分泌腫瘍の癌関連遺伝子変異検索. 第21回日本消化器関連学会週間 2013/10/11発表, グランドプリンスホテル新高輪(東京・品川)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高野 伸一 (TAKANO, Shinichi)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 80377506