

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26293285  
研究課題名(和文) 次世代シーケンサーによる膵癌早期診断マーカー同定と低侵襲十二指腸液検査法への応用

研究課題名(英文) Identification of novel diagnostic markers for early detection of pancreatic cancer; application for a low-invasive fluid test

研究代表者  
小寺 泰弘 (KODERA, Yasuhiro)  
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10345879  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌を浸潤癌に至る前に早期診断するための新規遺伝子学的診断法の開発を目的とした。正常膵管組織、PanIN 2-3、浸潤性膵管癌の組織を採取し、癌関連の578遺伝子のエクソン領域の塩基配列データを取得した。正常膵管組織では認めず、PanIN 2-3の75%以上で出現する変異として、NOTCH2、AFF3、EXT1、IL21R、CDH6の5遺伝子変異を同定した。IPMN嚢胞内容液中DNAを対象にこれら5遺伝子変異をCast PCR法もしくはdigital HRM法で調べたところ、低～中等度異型のIPMNからはいずれの変異も検出されず、高異型度IPMNの67%で1つ以上の変異を認めた。

研究成果の概要(英文)：Previous studies indicated that pancreatic and duodenal juice samples are an excellent source of mutant DNA from the pancreas and have the potential to help in the risk stratification and surveillance of patients undergoing pancreatic screening. To identify novel genetic alterations specific to high grade precursors, we conducted an exome sequencing analysis. Mutations at NOTCH2, AFF3, EXT1, IL21R and CDH6 were frequently found in the high grade pancreatic intraepithelial neoplasias and ductal adenocarcinoma, but not normal ducts, indicating that these are promising markers for early detection of pancreatic cancer. We employed two highly-sensitive methods, Cast PCR and digital HRM, to detect less abundance of mutation and successfully detect 0.1% of mutant alleles. One or more of NOTCH2, AFF3, EXT1, IL21R and CDH6 mutations were found in the cystic fluids from high grade intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs), whereas no mutations were seen in those from low grade IPMNs.

研究分野：消化器外科学

キーワード：低侵襲スクリーニング法 膵腫瘍 次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後不良な固形癌であり、現代医療が克服すべき重大なテーマのひとつである。2/3もの症例が遠隔転移や高度局所進行のため、診断時に既に手術適応を失っている。ゆえに膵癌の予後を劇的に改善するためには早期診断こそが最も重要である。現行の膵腫瘍診断は超音波内視鏡検査やCT検査などの画像検査が主力であるが、解像度や検出能に限界があり、画像上浸潤癌が疑われた時点ですでに膵外浸潤を起こしている場合も多い。ゆえに膵癌早期診断の目指すべきゴールは、前癌病変が浸潤癌に進展する前に検出することにつく。膵癌の主な前癌病変は、膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) と膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) であるが、PanIN はミクロレベルの病変で、最大限に進行して上皮内癌に至った PanIN-3 でも画像診断は不可能である。IPMN は嚢胞性病変としての検出は可能だが、良性から浸潤癌まで幅広い臨床像を呈し、画像診断のみで悪性度を診断するには至らない。膵液は、こうした画像上診断困難な段階での腫瘍由来の細胞を直接検出する唯一の臨床検体である。また、膵全体の病変の有無や癌発生リスクを同時に評価できるという点でも、膵液検査は膵スクリーニング法として期待が大きい。そこで、以前より膵液中の遺伝子学的検索の結果が数多く報告されてきたが、いまだ臨床での実用化に至っていないのが実情である。臨床応用に向けては3つの大きな克服すべき課題がある。

- (1) 特異性の高いマーカーの検出；代表的な膵癌関連遺伝子である KRAS, p16, TP53, SMAD4 は、いずれも早期診断のマーカーとしては特異度や感度が不十分である。そのため、鋭敏に高異型度前癌病変を検出する新規分子マーカーの同定が必要である。近年、GNAS のように膵癌前癌病変に特異的な遺伝子変異も発見されており (Wu J, et al. Science Translational Medicine 2011)、さらなる膵癌段階的発癌を司る遺伝子変異が存在する可能性は十分にある。
- (2) 高感度な検出；早期診断のためには腫瘍量が少ない段階での検出が必要であるが、正常膵管上皮や胆汁に混入する胆管上皮も含まれるため膵液中に出てくる腫瘍由来の細胞比率は非常に低く、高感度な測定方法が必須である。
- (3) 採取時の侵襲性；膵液検体の採取には、膵管内へのカニューレションが必要であり、手技が煩雑である上に検査時間も長く、コスト面、また出血、急性膵炎、胆道感染などの関連合併症のリスクがある点が、スクリーニング検査としては大きな問題となる。十二指腸液は膵管へのカニューレションが不要であるため短時間かつ関連合併症のリスクなく採取可能であり、臨床応用を見据えた場合に非常に有望な検体であるが、胆道や十二指腸壁の細胞の混入が

あり、膵腫瘍由来の細胞比率はさらに低下するため、この克服が鍵となる。

近年、高スループットな次世代シーケンサーが利用可能となり、ゲノム研究の分野において重要な役割を担っている。全ゲノム解析などの膨大な配列データを得ることができるという点が特に脚光を浴びているが、申請者らは半導体式次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンスによって、従来のシーケンサーでは不可能であったマルチプレックス解析が高速・高精度に行えるという点に着目した。これにより、網羅的な変異解析をきわめて効率的に行うことが可能となった。

申請者らは、PanIN においては発生初期段階ですでに何らかの体細胞変異が存在することを見出した (Kanda M, et al. Gastroenterology 2012)。これは、浸潤癌に至る段階的癌化には体細胞変異が重要な役割を担うことを示しており、各癌化過程における網羅的な癌関連遺伝子の変異解析を行うことで新規癌化マーカーおよび変異パターンを発見できると着想した。また、TP53 変異 (Kanda M, et al. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2013) および IPMN の特異的分子マーカーである GNAS 遺伝子変異を十二指腸液検体から検出することに成功した (Kanda M, et al. Gut 2013)。特筆すべきは、膵嚢胞性病変が画像的に検出される前の段階、あるいは顕微鏡性病変である PanIN-3 症例から十二指腸液中に遺伝子変異が検出されたことである。この事実は、十二指腸液中の遺伝子検索により膵癌早期診断法が既存の画像診断の限界を凌駕し飛躍的に発展する可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

前述の背景、申請者らのこれまでの研究成果をもとに、膵癌の予後向上の鍵となる早期診断のための新規手法を開発し、その臨床応用に向けての基盤を作るための研究を行った。本研究の目的は、

- (1) 次世代シーケンサーを用いて、正常膵管、膵癌前癌病変、浸潤性膵管癌での体細胞変異を網羅的に検索し、段階的癌化の過程で出現する遺伝子変異パターンを明らかにする。
- (2) 前癌病変が浸潤癌へと移行する段階に特徴的に出現する体細胞変異に着目し、新規の膵癌発癌を予測するマーカーおよび変異パターンを同定する。
- (3) ターゲット変異が臨床検体から検出可能であるかを高感度変異検索技術である Cast-PCR 法および digital high resolution melt curve analysis (HRM) を用いて調べる。
- (4) 嚢胞液などの臨床検体から検出されたターゲット変異が原発腫瘍部でも一致し

て検出されるかを調べる。

これらの過程により、新たな膵癌の早期診断遺伝子マーカーを提案するとともに、それを臨床検体から検出する手法を示すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、膵癌早期診断に寄与する新規分子マーカーの同定と、ターゲット変異の臨床検体からの検出法の開発を目的として以下の実験を行った。

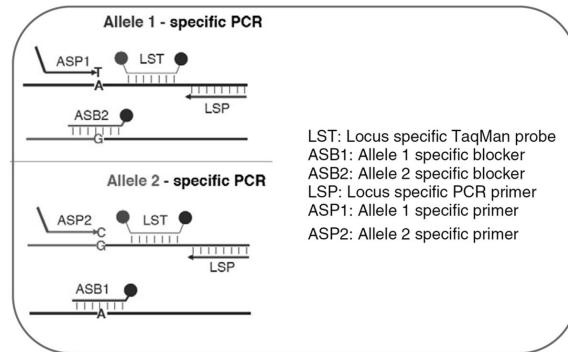
#### <膵癌早期診断に寄与する新規遺伝子変異の同定>

- (1) 膵癌前癌病変の検体収集：正常膵管組織から浸潤癌へと段階的に癌化していく各過程の遺伝子変異を比較解析するため、同一症例から正常膵管上皮、intermediate to high grade dysplasia (carcinoma in situ)、浸潤癌を凍結保存切片より採取した。
- (2) 核酸の抽出：正確な遺伝子変異検索のためには、高品質な DNA の抽出が不可欠である。凍結切片からの組織採取後、速やかに核酸保護バッファー液中で-80 下に保存し、72 時間以内に DNA 抽出に移行した。DNA の抽出は QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) を用いて行い、最大収量を得るべく最終溶解過程を 3 回反復した。
- (3) 次世代シーケンサーを用いた、ターゲットリシーケンスによる網羅的変異検出：癌関連の 578 遺伝子のエクソン領域を網羅的にカバーする SeqCap EZ Choice Library (Roche Applied Science) の Comprehensive Cancer Design を用いてライブラリ調整を行い、Illumina HiSeq (Illumina) による Paired-End 法 (100 塩基) で塩基配列データを取得した。
- (4) データの解析と膵癌早期診断マーカーの選定：シーケンスデータの信頼性、蛋白コーディング、アミノ酸変化、正常膵管では認めない、高度異型前癌病変および浸潤性膵管癌で認める、の条件でフィルタリングを行い、遺伝子マーカーを選定した。

#### <臨床検体からの変異検出>

- (5) 臨床検体の採取と核酸抽出：倫理委員会の指針に則った文書による同意を得た上で、IPMN 新鮮手術切除検体から研究用に嚢胞穿刺液を採取した。穿刺液は速やかに核酸保護緩衝液を加えて、-80 下で保存した。核酸抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) により行った。
- (6) 高感度遺伝子変異解析法—Cast PCR 法と digital HRM 法：臨床検体においては病変由来の細胞濃度が非常に低いと想定されるため、変異検出のためにはきわめて高感度な遺伝子変異解析手法が必須である。Cast PCR 法は wild type allele および変

異 allele のそれぞれに特異的に結合する Allele specific blocker を用いて、わずかにでも混入する変異 Allele を検出する技術であり、real-time PCR 技術を応用して Ct 値より遺伝子変異の存在を定性的・定量的の両方で判定する方法である。Cast-PCR は Triplicate で行い再現性を確保した(下図)。

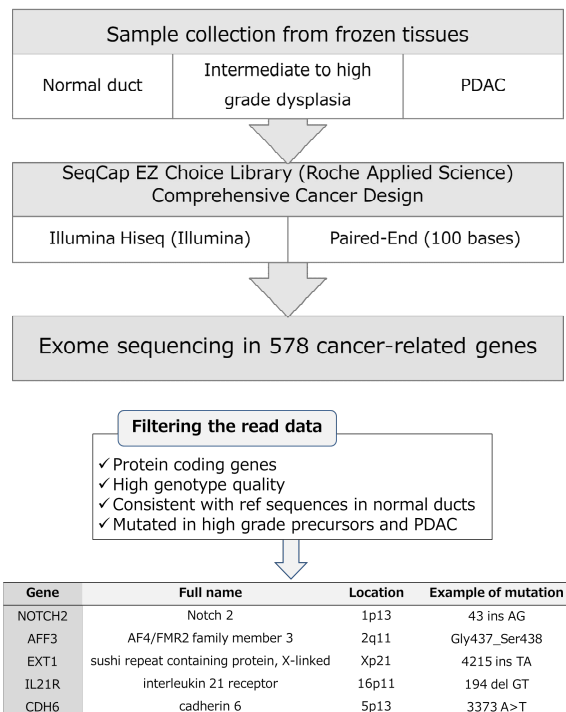


2 つ目の遺伝子変異検出法は、digital HRM 法である。こちら 0.1% の微量な変異 allele を検出可能であるとされ、申請者らは同手法により十二指腸液からの GNAS および TP53 変異を検出することに成功している (Kanda M, et al. Clinical Gastroenterology and Hepatology 2013, Kanda et al. Gut 2012)。

- (7) 臨床検体からの変異検出：ターゲット変異の有無を、Cast PCR 法および digital HRM 法を用いて調べる。IPMN 嚢胞穿刺液および、腫瘍部組織から得た DNA を対象に変異検索を行った。

### 4. 研究成果

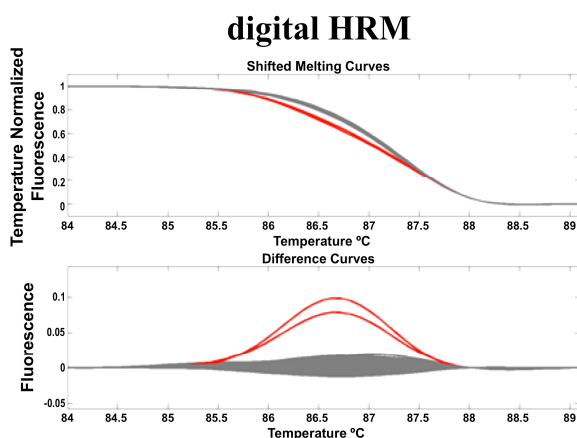
#### <ターゲット変異の同定>



同一症例から正常膵管上皮、intermediate to high grade dysplasia (carcinoma in situ)、浸潤癌を凍結保存切片より採取し、品質基準を満たした DNA を用いて exome sequencing を行った。シーケンスデータの高信頼性、蛋白コーディング、アミノ酸変化、正常膵管では認めない、高度異型前癌病変および浸潤性膵管癌で認める、の全ての条件を満たすものとして、NOTCH2、AFF3、EXT1、IL21R、CDH6 の 5 遺伝子のエクソン内変異が同定された。

### <臨床検体からの変異検出>

まず、変異検出手法の正確性と妥当性を確認するため、既知の遺伝子変異 (KRAS コドン 12) を有する膵癌細胞株 AsPC-1 から抽出した DNA を wild type DNA によって段階希釈し、0.1%~100%までの希釈系列を作成した。これに対して Cast PCR 法と digital HRM 法の両方を行って検出感度を調べたところ、いずれの手法においても 0.1%の濃度の変異が検出された。



IPMN 嚢胞穿刺液および腫瘍組織から DNA を抽出し、NOTCH2、AFF3、EXT1、IL21R、CDH6 変異を Cast PCR 法もしくは digital HRM 法で調べたところ、低~中等度異型の IPMN からはいずれの変異も検出されなかった。一方で、高異型度 IPMN の 67%で、NOTCH2、AFF3、EXT1、IL21R、CDH6 の 1 つ以上の変異を認めた。さらに、穿刺液中変異陽性例において、IPMN 腫瘍組織の DNA から同様の変異パターンが検出された。

本研究で得られた成果は以下である。

- (1) 膵癌早期診断に有用な新規遺伝子変異マーカーを同定したこと
- (2) 高感度遺伝子変異解析手法によって、0.1%の変異 allele 存在率まで検出可能であったこと
- (3) 変異の濃度が低い臨床検体 (IPMN 嚢胞内容液中) から、これら変異が検出可能であったことである。今後、前向き研究によって収集する多検体での検証を行っていき、実用化へと進めていきたい。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

神田光郎. 膵腫瘍の遺伝子学的鑑別診断法の展開. 肝胆膵. 74(2):175-181, 2017. 査読有. (DOI なし)

〔学会発表〕(計 1 件)

Mitsuro Kanda, Tsutomu Fujii, Suguru Yamada, Michael Goggins, Yasuhiro Kodera. Mutational status in precursor lesions of pancreatic cancer ; highlighting its diagnostic value. The Joint Conference of the 47th annual meeting of JPS, the 20th meeting of IAP, and the 6th meeting of AOPA. 2016 年 8 月 5 日. Sendai International Center (宮城県・仙台市青葉区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 : 発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

小寺 泰弘 (KODERA, Yasuhiro)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 1 0 3 4 5 8 7 9

### (2) 研究分担者

神田 光郎 (KANDA, Mitsuro)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 0 0 6 4 4 6 6 8

山田 豪 (YAMADA, Suguru)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号 : 3 0 4 6 7 2 8 7

藤井 努 (FUJII, Tsutomu)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：60566967