

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460458

研究課題名(和文) 膵管内管状乳頭腫瘍における全ゲノムエクソン配列解析

研究課題名(英文) Whole exome sequencing of intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas

研究代表者

山口 浩 (Yamaguchi, Hiroshi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20510697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵管内管状乳頭腫瘍(intraductal tubulopapillary neoplasm, 以下ITPN)は我々が発表した新しい膵癌の概念であり、その発生・進展に関わる遺伝子異常は既知の膵癌や膵管内腫瘍とは異なることが想定される。我々は本腫瘍の凍結サンプルを用い、遺伝子異常の網羅的解析を行った。その結果、PIK3CAの体細胞変異を初めとして、既知の膵癌とは異なる新規の異常が多数同定された。本腫瘍の独立性を支持するとともに、その診断や治療に寄与し得る貴重な知見であると考えられた。今回の結果は、米国のチームが出した結果と統合し国際共同研究として論文発表した。

研究成果の概要(英文)：Intraductal tubulopapillary neoplasm (ITPN) of the pancreas, proposed by us in 2009, is a lately established new disease entity among pancreatic carcinomas. The genetic alterations involved in the carcinogenesis of ITPN has been supposed to be different from other pancreatic neoplasms. However, data on the genetic features of ITPN are fairly limited, partially due to the rarity of the neoplasm. By comprehensive genetic analyses including whole-exome sequencing and targeted cancer gene panel sequencing, we detected several genetic alterations in ITPNs, such as somatic mutations of PIK3CA, which are obviously different from other pancreatic neoplasms. The results support the independence of ITPN as a single disease entity. In addition, the newly uncovered genetic alterations will lead to a novel diagnostic and therapeutic strategies.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 膵管内腫瘍 全エクソン解析 DNA解析 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

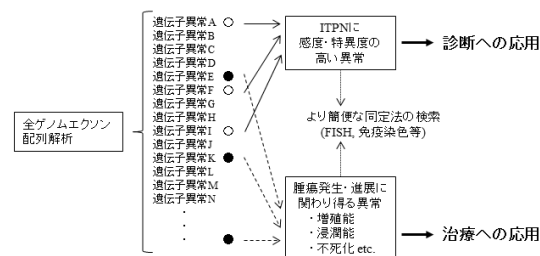
膵癌の前駆病変としては、現行疾患概念下では pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN), mucinous cystic neoplasm (MCN), intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN),そして intraductal tubulopapillary neoplasm (ITPN)の4者が挙げられる。このうちITPNは、申請者らが2009年に発表した膵管内腫瘍の新しい疾患概念である¹。申請者らは本腫瘍の提唱を通して膵管内腫瘍の分類基準そのものの変更の必要性を主張してきたが、2010年に改訂された新WHO分類ではその主張が全面的に取り入れられ、ITPNが正式な独立腫瘍概念として取り上げられるとともに、膵管内腫瘍の分類基準も大幅に改定されるに至った²。

我々は、ITPNが肉眼所見、病理組織学的所見、免疫組織化学的所見及び分子生物学的所見において、従来の膵腫瘍とは明瞭に異なる特徴を有することを明らかにしてきた¹。分子異常に関しては、一部のITPNはPIK3CAの体細胞変異を来していること、また、同変異の有無に関わらずITPNではPI3K/AKTシグナル伝達経路の異常活性化がみられることを示した。また、通常型膵癌やIPMNでは極めて高頻度にみられるKRASの変異や、IPMNの多くで認められるGNASの変異^{3,4}は、ITPNではほとんど見出されないことも報告した^{5,6}。しかしながら、本腫瘍の発生・進展に直接的に関わる遺伝子異常に関しては、いまだ不明な点が多く残されている。

ITPNは頻度の低い腫瘍ではあるが、進行すると浸潤・転移巣を形成し、死の転帰もとり得る悪性腫瘍である。本腫瘍の正確な診断や有効な治療法確立のため、さらなる分子生物学的異常を明らかにしてゆくことが急務である。

2. 研究の目的

ITPNにおいて診断的意義のある特異度の高い分子異常、あるいは腫瘍発生・進展に関わり治療標的となり得る分子異常を明らかにすること



3. 研究の方法

(1) SoLiD system による全ゲノムエクソン配列解析

ITPN手術症例から採取された新鮮凍結標本を用い、顕微鏡ガイド下に腫瘍部及び非腫瘍部のサンプリングを行った。DNAの抽出にはChargeSwitch® gDNA Mini Tissue Kit (Thermo Fishers Scientific Inc.)を用いた。抽出DNAは、AB Library Builder System (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて断片化ライブラリーとし、Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)により定量した。TargetSeq™ Target Enrichment Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)によりエクソン領域をエンリッチした後、大規模並列型シーケンサーSOLiD System (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いてpaired-end sequencingを施行した。データ解析にはLifeScope software (Thermo Fisher Scientific Inc.)を使用した。

(2) Ion Ampliseq system を用いた準網羅的な解析

核酸の分解が強く、上記のSoLiD systemによる全ゲノムエクソン解析が困難であったサンプルに関しては、409のターゲット遺伝子を含んだIon Ampliseq Comprehensive Cancer Panel (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)を用いて純網羅的な遺伝子解析を行った。

(3) Sanger 法による validation

上記の2つの方法で同定された遺伝子異常に関し、3130X Genetic analyzer (Life Technologies)を用いたサンガー法によってシーケンスデータの確認を行った。

4. 研究成果

我々のITPN登録症例のうち、2症例(case 1, case 2)においてSoLiD systemによる全ゲノムエクソン配列解析が可能であった。また、他の2症例(case 3, case 4)に関しては核酸の分解が強く全ゲノムエクソン解析が困難であったため、Ion Ampliseq systemを用いた準網羅的な解析を施行した。これらの4症例は、臨床像や肉眼所見、組織学的所見、免疫組織化学的所見がITPNの定義^{2,7}を完全に満たしていた。

解析結果から、種々のsignaling pathwayに関わる様々なsomatic mutationが同定された。すなわち、Wnt-beta catenin pathway (CTNNB1 in case 1 and APC in case 2), PI3K-AKT pathway (PIK3CA in case 1 and PIK3CB in case 4), GAS6-AXL pathway (AXL in case 4), TP53 pathway (TP53 in case 2), Rho pathway (ARHGAP35 in case 1 and KALRN in case 2), ephrin pathway (EPHB3 in case 1)に関わる遺伝子異常である。

下に、過去の研究で明らかとしてきた遺伝子異常と合わせ、計7例のITPN症例の遺伝子変異を表としてまとめた。通常型膵癌やそ

の前駆病変である PanIN においては, KRAS, p16, TP53, DPC4 の 4 種の遺伝子異常がいわゆる Big 4 として知られている。IPMN における遺伝子異常はこれらとの overlap が多いが, 加えて GNAS の変異が高頻度かつ特異的に起きていることが近年明らかにされている。我々が ITPN で明らかにした遺伝子変異は, この既知の膵腫瘍では認められていなかった新規の異常がほとんどである。この事実からは, ITPN の腫瘍発生や進展には既知の膵腫瘍とは全く異なる signaling pathway が関わっていることを明瞭に示している。ITPN は WHO 分類や本邦の膵癌取り扱い規約において独立した腫瘍概念として扱われるに至っているが, 他の膵腫瘍, 特に IPMN との異同については未だ議論が続いている。新規性の高い遺伝子異常の存在は, ITPN の腫瘍概念としての明瞭な独立性を支持する結果といえる。特異性の高い遺伝子異常の存在は, 病理診断において他の腫瘍から ITPN を鑑別する際に大きな役割を果たすことが期待される。また, 腫瘍発生や腫瘍進展に関わる遺伝子異常であることが明らかにしていくことが今後の検討課題であるが, それにより分子治療の新標的が同定される可能性もあり, 今回の新規遺伝子異常の同定は ITPN の診療に関して意義深い結果であると考えられる。

表. ITPN 症例における遺伝子異常

症例	年齢	性別	遺伝子異常
1	62 歳	女性	PIK3CA CTNNB1 ARHGAP35 EPHB3
2	72 歳	男性	APC TP53 KALRN
3	58 歳	女性	TRIP11
4	68 歳	女性	PIK3CB AXL
5	60	女性	PIK3CA
6	72	男性	PIK3CA
7	78	女性	BRAF
8	71	男性	KRAS

我々の検討と同時期に, 米国の Memorial Sloan Kettering Cancer Center のチームでも ITPN における遺伝子異常の網羅的解析を行っていた。彼我のデータを合わせ, 国際共同研究として論文発表するに至った⁸。

<参考文献>

1. Yamaguchi H, Shimizu M, Ban S et al. Intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas distinct from pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms, *Am J Surg Pathol* 2009, 33:1164-1172
2. Adsay NV, Fukushima N, Furukawa T et al. Intraductal neoplasms of the pancreas. Edited by Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND.

Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2010, 304-313

3. Wu J, Matthaei H, Maitra A et al. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med*. 2011, 20;3(92):92ra66.
4. Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E et al. Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep*. 2011;1:161.
5. Yamaguchi H, Kuboki Y, Hatori T et al. The discrete nature and distinguishing molecular features of pancreatic intraductal tubulopapillary neoplasms and intraductal papillary mucinous neoplasms of the gastric type, pyloric gland variant, *J Pathol* 2013, 231(3):335-41
6. Yamaguchi H, Kuboki Y, Hatori T et al. Somatic mutations in PIK3CA and activation of AKT in intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas, *Am J Surg Pathol* 2011, 35:1812-1817
7. 日本膵臓学会編, 膵癌取り扱い規約, 第 7 版, 金原出版, 東京.
8. Basturk O, Berger M, Yamaguchi H et al. Pancreatic intraductal tubulopapillary neoplasm is genetically distinct from intraductal papillary mucinous neoplasm and ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2017 in press.

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 3 件)

1. Basturk O, Berger M, Yamaguchi H (共著者 28 人中 3 番目) et al. Pancreatic intraductal tubulopapillary neoplasm is genetically distinct from intraductal papillary mucinous neoplasm and ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2017 in press. (査読あり)
2. Nakanuma Y, Uesaka K, Miyayama S, Yamaguchi H (共著者 5 人中 4 人目) et al. Intraductal neoplasms of the bile duct - A new challenge to biliary tract tumor pathology. *Histol Histopathol*. 2017 in press. (査読あり)
3. Furukawa T (共著者 15 人中 1 人目), Yamaguchi H (共著者 15 人中 11 人目) et al. Whole exome sequencing reveals recurrent mutations in BRCA2 and FAT genes in acinar cell carcinomas of the pancreas. *Sci Rep*. 2015 Mar 6;5:8829. (査読あり)

[学会発表](計 6 件)

1. Yamaguchi H, Nagao T. Intraductal tubulopapillary neoplasm, a novel precursor of invasive carcinoma of the pancreas. Joint Conference of IAP, JPS and AOPA. August 5-7, 2016. Sendai International Center, Sendai.
2. 山口浩. Intraductal tubulopapillary neoplasm

の病理学的特徴とその鑑別疾患 .2016年5月12-14日 .日本病理学会総会 , 仙台国際センター , 仙台

3. 山口浩 . 膵 intraductal tubulopapillary neoplasm -WHO分類基準改定に至った新規腫瘍概念- . 日本病理学会秋期特別総会 , 2015年11月5-6日 , 東京大学 , 東京

4. 山口浩 . 膵 Solid-pseudopapillary neoplasm. 2015年4月30日-5月2日 . 日本病理学会総会 , 名古屋国際会議場 , 名古屋

5. Yamaguchi H, Shimizu M, Koyama I et al. Histological invasive patterns of intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas. APA/JPS 45th Anniversary Meeting, November 5-7, 2014, Hapuna Beach Prince Resort, Big Island, Hawaii.

6. 山口浩 , 清水道生 . 膵腫瘍類似病変 –過誤腫・扁平上皮性嚢胞を中心に- . 日本病理学会総会 2014年4月24-26日 , 広島国際会議場 , 広島

〔図書〕(計 2件)

1. Yamaguchi H. Intraductal tubulopapillary neoplasm of the bile duct and pancreas. Biliary diseases with pancreatic counterparts, Nova Science Publishers, Inc., NY, USA, in press.

2. 山口浩 . 膵管内腫瘍(IPMN, ITPN) . 腫瘍病理鑑別診断アトラス 胆道癌・膵癌 , 文光堂 , 2015 , 130-136 .

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

特記事項なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 浩 (YAMAGUCHI, Hiroshi)
東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 20510697

(2)研究分担者

古川 徹 (FURUKAWA, toru)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 30282122

(3)連携研究者

該当者なし

(4)研究協力者

該当者なし