

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08431

研究課題名（和文）膵癌EUS-FNA検体を用いた変異シグネチャー解析による個別化モデルの確立

研究課題名（英文）Development of individualized models based on mutational signature analysis using EUS-FNA specimens in pancreatic cancer

研究代表者

須藤 研太郎（Sudo, Kentaro）

千葉県がんセンター（研究所）・消化器内科・主任医長

研究者番号：60400884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：切除不能膵癌を対象として、超音波内視鏡下穿刺吸引法（EUS-FNA）による膵癌生検検体を用い、全エクソンシーケンスおよび変異シグネチャー解析を行った。KRASを含む膵癌関連遺伝子の検出頻度は既報と遜色なく、EUS-FNA検体を用いた解析は十分評価可能と考えられた。16例の予備的検討ではプラチナ含有レジメン（mFOLFIRINOX）の有効性と相同組み換え修復欠損（HRD）と関係するシグネチャー3（COSMIC V2）の関連性は明確とは言えない結果であったが、今後アーカイブデータも加え検討を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能膵癌において、治療前に効果を推定できるような腫瘍のゲノム情報を得ることは臨床的に重要な課題である。本研究ではEUS-FNAによる膵癌生検検体を用い、全エクソンシーケンス、変異シグネチャー解析、さらに臨床データと統合した検討を行った。これまでこうした報告は少なく、本研究の学術的意義は大きい。また、本研究を通じ、腫瘍ゲノム情報と関連する臨床データを集積しているが、膵癌治療の個別化モデルの確立に向け貴重な基盤データとなりうる。

研究成果の概要（英文）：We performed whole-exome sequencing and mutational signature analysis using EUS-FNA specimens in patients with unresectable pancreatic cancer. The detection frequency of pancreatic cancer-related genes including KRAS was comparable to that of previous reports, suggesting the feasibility of the analytical approach. Preliminary analysis using the data of 16 patients did not confirm the association between the efficacy of platinum-containing regimen (mFOLFIRINOX) and the presence of signature 3 (COSMIC V2), which is reportedly related to homologous recombination repair deficiency (HRD). We will conduct further study with the addition of archival data.

研究分野：膵癌の診断・治療・ゲノム解析

キーワード：膵癌 全エクソンシーケンス mutational signature EUS-FNA 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は代表的な難治癌であり、切除不能例の予後はきわめて不良である。全身化学療法として FOLFIRINOX 療法ならびにゲムシタピン+ナブパクリタキセル療法の有効性が報告されるが、両者の使い分けについて明確な基準はない。

膵癌の中には相同組換え修復欠損 (HRD) を有するサブグループがあり、こうした腫瘍では FOLFIRINOX などのプラチナ含有レジメンや PARP 阻害剤の有効性が期待できる。HRD には生殖細胞系列 *BRCA1/2* 遺伝子のみならず、種々の遺伝子変異、エピジェネティクスが関連し、遺伝子パネル検査での同定には限界がある。

近年、全ゲノムシーケンスおよび全エクソンシーケンス (WES) のデータを利用した変異シグネチャー (mutational signature) 解析が報告され、HRD を有する腫瘍は特有の塩基変異パターン (シグネチャー3、BRCA シグネチャー) を示すことが報告される。化学療法施行前にこうした腫瘍ゲノム情報が得られれば、治療選択においてきわめて有用である。

超音波内視鏡下穿刺吸引法 (EUS-FNA) は膵癌の生検病理診断において主要な役割を有し、一般的に行われる手法である。一方、EUS-FNA 検体を用いた全エクソンシーケンスなどの腫瘍ゲノム解析は報告が少ない。膵癌ゲノム情報に基づく precision medicine の確立のためにも、EUS-FNA などの生検検体による解析法の確立、データ集積が今後の課題である。

2. 研究の目的

本研究では EUS-FNA によって得られた凍結膵癌組織を用いた全エクソンシーケンスおよび変異シグネチャー解析を行い、HRD 関連遺伝子変異および BRCA シグネチャーの有無とプラチナ含有レジメンである FOLFIRINOX 療法の効果を検討し、膵癌化学療法における個別化モデルを構築する。

3. 研究の方法

(1) EUS-FNA による凍結膵癌組織の採取

切除不能膵癌患者より同意取得後、病理診断のための EUS-FNA に際し、ゲノム解析用の凍結検体を採取、バイオバンクへ凍結保存する。また、血液検体の保存も行う。

(2) ダイレクトシーケンス法による *KRAS* 変異解析

凍結膵癌組織より DNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法にて *KRAS* 変異解析を行う。膵癌の 90% 以上で *KRAS* 変異がみられるため、変異を検出できない場合、腫瘍細胞割合が低い可能性があり、病理標本による腫瘍細胞割合の確認を行う。なお、ダイレクトシーケンス法の波形から簡易的に腫瘍細胞割合の高い検体を推定しうる (Soh J et al. PLoS One 2009; 4: e7464)。

(3) 全エクソンシーケンスおよび変異シグネチャー解析

前項 (2) の結果を踏まえ検体を選別し、膵癌体細胞変異検出のため、50ng の DNA を用い全エクソンシーケンスを行う。なお、末梢血細胞由来の DNA を正常コントロールとして用いる。全エクソンシーケンスは必ず DNA 研究所に委託して行い、得られたデータをもとに変異シグネチャー解析を行う。なお、FNA 検体のうち採取量が多い検体を用い、初代培養を行い、BRCA シグネチャーを有する腫瘍でのプラチナ製剤に対する感受性の検証を試みる。

(4) 腫瘍ゲノム情報と治療効果との関連を検討し、個別化モデルを構築する。

全エクソンシーケンスにより得られた情報および変異シグネチャー解析の結果をもとに、プラチナ含有レジメンである FOLFIRINOX 療法の有効性との関連を精査、個別化モデルを構築する。

4. 研究成果

(1) 膵癌 EUS-FNA 検体を用いた全エクソンシーケンス

16 例の切除不能膵癌患者の検体を用い、全エクソンシーケンスを行い多数の体細胞変異が検出された (図 1: 非同義変異、欠失・挿入・フレームシフトの頻度を示す)。 *KRAS*、 *TP53*、 *CDKN2A*、 *SMAD4* などの膵癌関連遺伝子、HRD 関連遺伝子に加え、多くのがん関連遺伝子 (がん関連遺伝子の定義は OncoKB (<https://www.oncoKB.org/cancerGenes>) を参照) にバリエーションが観察された。 *KRAS*、 *TP53*、 *CDKN2A* などの膵癌関連遺伝子の検出頻度は既報と遜色なく、EUS-FNA 検体からの全エクソンシーケンスは十分評価可能であることが示唆された。なお、 *KRAS* 変異は 14 例 (87.5%) に認められたが、ダイレクトシーケンス法の結果と比較して同一パターンのバリエーションが検出されていた。1 例、全エクソンシーケンスで偽陰性となった検体があったが、アレール頻度が少なく、検出できなかった可能性が考えられた。HRD 関連遺伝子としては FANCB のミスセンス変異が 1 検体で認められたが、ClinVar などのデータベースには登録がなく、病的意義は不明であった。なお、1 例の EUS-FNA 検体を用い、初代培養を行いスフェロイド形成、凍結保存を行った。しかし、

図1 膵癌EUS-FNA検体による全エクソンシーケンス

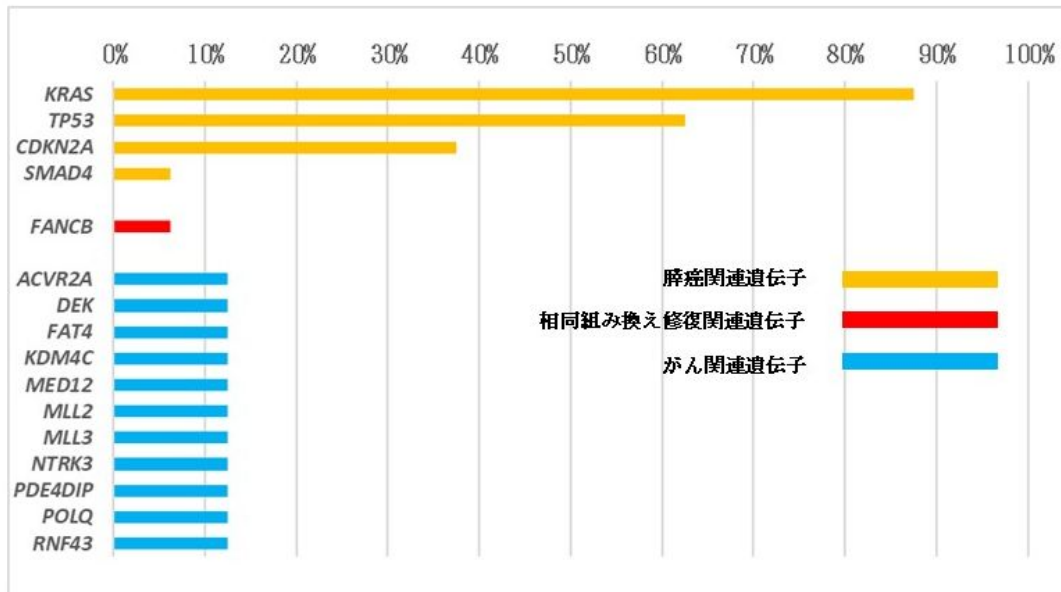
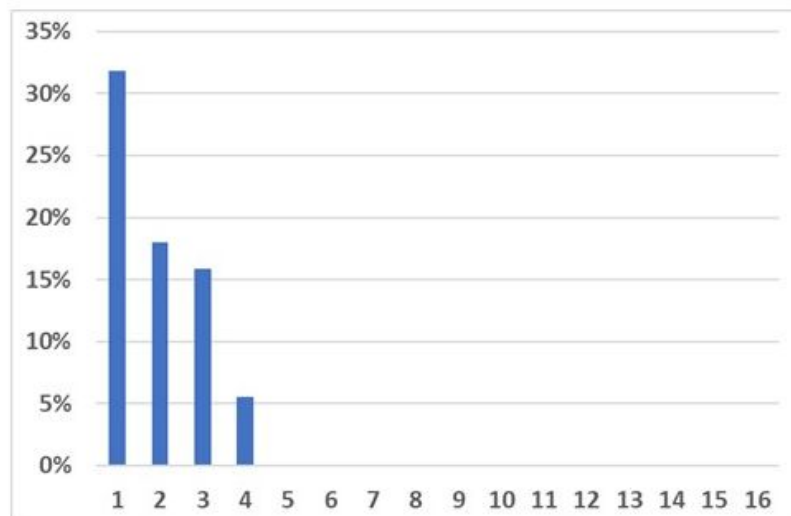


図2 体細胞変異におけるシグネチャー3の占める割合



研究全体の進捗が遅れていたことや EUS-FNA 検体は微小であるため、初代培養を継続的に
行うことは断念し、全エクソンシーケンスを優先して行う方針とした。

(2) 変異シグネチャー解析

全エクソンシーケンスのデータをもとに変異シグネチャー解析を行い、COSMIC mutational signature V2 (https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/signatures_v2/) に準拠した膵癌関連シグネチャーの割合を推定した。解析には R パッケージの musicatk を使用した (Campbell JD, 2023 musicatk: Mutational Signature Comprehensive Analysis Toolkit. R package version 1.10.0.) (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/musicatk.html>)。図2に各検体におけるシグネチャー3の割合を示す。4つの検体でシグネチャー3が陽性、他の12検体では陰性であった。なお、全エクソンシーケンスで FANCB のミスセンス変異を認めた検体ではシグネチャー3陽性であり、関連性も示唆された。その他の検体ではシグネチャー3の有無にかかわらず、HRD 関連の体細胞変異は検出されなかった。

(3) プラチナ含有レジメン (FOLFIRINOX) との有効性の比較

mFOLFIRINOX の抗腫瘍効果 (RECIST 判定) とシグネチャー3の有無について、16例を対象として予備的検討を行ったが、両者に明確な関連はみられなかった。mFOLFIRINOX 開始後の全生存期間はシグネチャー3を有する腫瘍で良好な傾向がみられたが (生存期間中央値 15.9 ヶ月 vs 11.4 ヶ月, $P = 0.0887$)、対象例数が少なく、治療ライン数などのバイアスもあり、今後さらなる検討が必要である。

(4) 考察

・本研究では切除不能膵癌を対象として、EUS-FNA 検体を用いた全エクソンシーケンスを施行したが、*KRAS* 変異のプロファイルおよび他の膵癌関連遺伝子の検出頻度は既報と遜色なく、解析精度は担保されているものと考えられた。さらに変異シグネチャー解析も可能であり、治療前の EUS-FNA 検体を用いたゲノム解析は膵癌個別化モデルの確立にあたり、貴重なツールと考えられた。これまで、膵癌 EUS-FNA 検体による全エクソンシーケンス、変異シグネチャー解析、さらに臨床データと統合した報告は少なく、本研究の意義は大きい。

・一方、予備的検討では HRD と関連したシグネチャー3 とプラチナ含有レジメン有効性との関連は明確ではなかった。これは対象例数が少ないことが一因であり、今後アーカイブのデータを加え解析を行う予定である。さらに今回、変異シグネチャー解析は COSMIC v2 のデータに準拠して行ったが、現在 v3.3 (<https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/>) までアップデートされており、解析のストラテジーについても検討の余地がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 須藤 研太郎、辻本 彰子、喜多 絵美里	4. 巻 63
2. 論文標題 EUS-FNA検体を用いた膵癌ゲノムプロファイリング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本消化器内視鏡学会雑誌	6. 最初と最後の頁 2441～2452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11280/gee.63.2441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 須藤 研太郎、横井 左奈、辻本 彰子、喜多 絵美里、中村 和貴、石井 浩	4. 巻 42
2. 論文標題 膵癌の分子サブタイプとEUS-FNA検体を用いた解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 731～737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 須藤 研太郎、横井 左奈、喜多 絵美里、辻本 彰子、橋本 佳恵、中村 和貴、兼松 宗太郎、石井 浩、山口 武人	4. 巻 41
2. 論文標題 EUS-FNA検体を用いた膵癌治療のゲノムバイオマーカー探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 279～285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
研究 分 担 者	横井 左奈 (Yokoi Sana) (30372452)	千葉県がんセンター(研究所)・遺伝子診断部・部長 (82504)	

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
---------	---------