

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860514

研究課題名(和文) 膵癌幹細胞の病理学的性質を規定するマイクロRNA機構の解明

研究課題名(英文) Micro RNA profiles in pancreatic cancer

研究代表者

川久保 和道 (Kawakubo, Kazumichi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80633578

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)：38例の膵腫瘍検体から、DNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いてCTNNB1遺伝子変異解析を行った。7例のSolid-pseudopapillary neoplasmのうち、7例の全例でCTNNB1のエクソン3の1塩基ミスセンス変異を検出し、変異頻度は、5.4-48.8%であった。

5例の膵管内乳頭粘液性腫瘍の患者から、嚢胞液または膵液からDNAを採取、次世代シーケンサーを用いて36のがん関連遺伝子の変異解析をおこなった。GNAS変異を5例中4例、KRAS変異を5例中2例に認めた。変異頻度は、それぞれ2-29.8%、6-21%であった。

研究成果の概要(英文)：DNA was extracted from 38 pancreatic tumors and CTNNB1 gene mutation was analyzed by next generation sequencer. Seven out of 7 solid-pseudopapillary neoplasm showed a single base pair missense mutations in exon 3 of CTNNB1 with variant frequency of 5.4 to 48.8%.

DNA was extracted from cyst fluid or pancreatic juice in 5 patients with intraductal papillary mucinous neoplasms. We analyzed 36 cancer related gene mutations by next generation sequencer. Four GNAS and 2 KRAS mutations were detected with variant frequency of 2-29.8 and 6-21% respectively.

研究分野：遺伝子変異解析

キーワード：遺伝子変異解析 EUS-FNA 膵癌

1. 研究開始当初の背景

本邦では、年間約3万人の膵癌の罹患者があり近年増加傾向である。しかも年間罹患者数と死亡数が等しく難治癌の代表であり、安全で有効な治療法の確立が強く望まれる。申請者はこれまで642人の膵管内乳頭粘液性腫瘍患者の前向き観察研究を行い、同疾患が膵癌の高危険群であることを証明し報告してきた(Kawakubo et al. Gut 2011)。しかし従来の臨床的手法では膵発癌の超高危険群の同定、早期発見が困難であることから、大部分の膵癌は診断時には、切除不能であり、平均生存期間が約6カ月と極めて予後不良である(Nakai, Kawakubo et al. Br J cancer 2010)。切除不能膵癌に対する抗癌剤治療は、全癌細胞に細胞死を誘導する Total-kill Therapy を目指すものであるが、一時的な抗腫瘍効果が認められた場合でも、長期的に癌の抑制を行うことは困難である。

近年、癌の起源細胞として、癌幹細胞の存在が提唱され(Reya et al. Nature 2001)、膵癌のような難治癌に対する治療標的として注目を集めている。癌幹細胞を標的とした抗癌治療では癌組織集団の根源に対する攻撃が可能となり、幹細胞を攻撃することによる癌組織全体が崩壊・消滅し、良好な効果/副作用比が期待できる。膵癌でも、膵癌の起源としての、膵癌幹細胞が知られているが、詳細な病態解明がなされていない(Li et al. Cancer Res 2007)

膵癌の大部分は切除不能のため組織の採取は通常不可能であるが、申請者の研究グループはこれまでに膵腫瘍を有する患者に対し500例以上の超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引法を用いた組織採取を行い、病理組織およびがん遺伝子をはじめとする発現解析を行っており、RRM2 遺伝子がジェムシタピン感受性予測因子、また Notch3、DPD 遺伝子が予後予測因子となることを見いだしている。この手法を用いて超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引細胞法により得られた膵癌組織を用いた包括的遺伝子解析を行うことで、より多数の膵癌の病態研究が可能となる。

2. 研究の目的

膵癌治療の標的として膵癌幹細胞に注目し、超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引法により得られたさまざまな膵腫瘍組織を用いて、以下の研究を遂行する。膵腫瘍組織における遺伝子プロファイルを次世代シーケンサーにより網羅的に解析し、膵癌幹細胞の性質を規定する遺伝子を同定する。本研究の結果から、膵癌幹細胞を標的とした低分子化合物や抗体開発の技術基盤を築く。

3. 研究の方法

(1)超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引法により得られた膵腫瘍検体から DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、遺伝子変異解析を行う。得られた遺伝子変異解析結果と病理組織学的結果の、解析を行う。

膵腫瘍に対し、超音波内視鏡を用いて、超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引法により、検体を採取する。

得られた検体を、RNAlater(Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) に保存する。後日、AllPrep DNA/RNA/Protein mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) を用いて、DNA の抽出を行う。

抽出された DNA を、以下のプライマーを用いて、PCR を行う。

Forward

5´-CTGATTTGATGGAGTTGGACATGG-3´

Reverse

5´-CAGCTACTTGTCTTGAGTGAAGG-3´

2 回目の PCR を以下のプライマーを用いて行う。

Forward

5´

´-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-barcode-CTGATTTGATGGAGTTGGACATGG-3´

Reverse

5´

´-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGCTACTTGTCTTGAGTGAAGG-3´

得られた PCR 産物を QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen)を用いて精製する。

さらに、Ion OneTouch™ System (Life Technologies)を用いて、EmulsionPCR を行う。

Ion 314™ chip (Life Technologies)を用いて、Ion PGM™ (Personal Genome Machine) シーケンサーにて CTNNB1 のエクソン 3 の遺伝子のシーケンスを行う。

得られた遺伝子情報を hg19 に照らし合わせて、Ion Torrent Suite v2.2 software (Life Technologies)を用いて遺伝子変異を検出する。

得られた遺伝子変異結果と、EUS-FNA での組織結果の比較検討を行う。

(2)膵管内乳頭粘液性腫瘍の嚢胞から超音波内視鏡下ガイド下穿刺吸引法により嚢胞液を採取し、次世代シーケンサーを用いて、遺伝子変異解析を行う。

膵管内乳頭粘液性腫瘍に対し、超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引法、または、内視鏡的逆行性膵管造影により、嚢胞液または膵液を採取する。

採取された液体は、液体窒素内で保存し、DNeasy kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) を用いて、DNA の抽出を行う。

Ion AmpliSeq™ Cancer Panel Kit (Life

Technologies Corporation)を用い library を増幅、Template 作成する。

Ion 318™ chip を用い、Ion PGM™ Sequencer にて独自に作成した 36 のがん関連遺伝子のシーケンシングを行う。

得られた遺伝子情報を hg19 に照らし合わせて、Ion Torrent Suite v2.2 software (Life Technologies)を用いて遺伝子変異を検出する。

得られた遺伝子変異結果と、膵管内乳頭粘液性腫瘍の組織型、悪性度との比較検討を行う。

4. 研究成果

(1)38 例の膵腫瘍検体から、DNA を抽出し、CTNNB1 遺伝子変異解析を行った。年齢中央値 63.5 歳 (範囲: 13-81 歳)、男性 14 例女性 24 例。内訳は、7 例が Solid-pseudopapillary neoplasm、16 例が膵管癌、11 例が膵神経内分泌腫瘍、1 例は膵腺房細胞癌、1 例は自己免疫性膵炎、2 例は慢性膵炎。

7 例の Solid-pseudopapillary neoplasm のうち、7 例の全例で CTNNB1 のエクソン 3 の 1 塩基ミスセンス変異を検出した (表 1)。膵管癌、膵腺房細胞癌、自己免疫性膵炎、慢性膵炎では、いずれも遺伝子変異が検出されなかった。11 例の膵神経内分泌腫瘍のうち 1 例で、1 塩基ミスセンス変異を検出した。

表 1: CTNNB1 遺伝子変異

	コドン	ヌクレオチド	アミノ酸置換	変異頻度
1	37	N378 C/A	Ser37Tyr	23.81
2	32	N363 A/G	Asp32Gly	5.39
3	32	N362 G/C	Asp32His	48.77
4	41	N390 C/T	Thr41Ile	31.07
5	37	N378 C/T	Ser37Phe	26.48
6	41	N362 G/A	Asp32Asn	21.50
7	41	N390 C/T	Thr41Ile	29.68

(2) 2013 年 11 月から 2014 年 10 月までの間、5 例の膵管内乳頭粘液性腫瘍の患者から、嚢胞液または膵液の採取を行った。年齢中央値は 64 歳 (範囲: 54-78 歳)、男性 4 例女性 1 例、主膵管型 2 例分枝型 3 例、鉤部 2 例、頭部 3 例。抽出した DNA 量は、360-7960ng。IPMN の悪性度は、IPMN low grade (LG) 2 例、IPMN high grade (HG) 1 例、IPMN with minimal invasion (MI) 1 例、IPMN with invasive

carcinoma (IC) 1 例。GNAS 変異を 5 例中 4 例、KRAS 変異を 5 例中 2 例に認めた。(表 2) その他の遺伝子変異は、今回の検討では検出されなかった。

表 2: 主な遺伝子変異とその頻度

	1	2	3	4	5
悪性度	LG	LG	HG	MI	IC
形態	分枝型	主膵管型	分枝型	主膵管型	分枝型
組織分類	腸型	胃型	腸型	腸型	不明
GNAS	R201C (10)	R201H (29.8)	R201C (2)	R201C (21)	-
KRAS	-	G12D (21)	-	G12D (15) G12V (6)	-

LG; low grade, HG; High grade, MI; minimal invasion, IC; invasive carcinoma

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Kubota Y, Kawakami H, Natsuizaka M, Kawakubo K, et al. (13 人中 1,2,3,4 番目) CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing. J Gastroenterol 50,203-20,2015. 査読有, doi: 10.1007/s00535-014-0954-y.

Kudo T, Kawakami H, Kawakubo K, et al. (12 人中 2,11 番目) Influence of the safety and diagnostic accuracy of preoperative endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for resectable pancreatic cancer on clinical performance. World J Gastroenterol 20,3620-7,2014. 査読有, doi: 10.3748/wjg.v20.i13.3620.

Nakai Y, Isayama H, Kawakubo K, et al. (17 人中 10 番目) Slow Pull Versus Suction in Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration of Pancreatic Solid Masses. Dig Dis Sci 59, 1975-85, 2014. 査読有, doi: 10.1007/s10620-013-3019-9.

Kudo T, Kawakami H, Kawakubo K, et al. (15 人中 2,8 番目) High and low negative pressure suction techniques in EUS-guided

fine-needle tissue acquisition by using 25-gauge needles: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc* 80,1030-7,2014. 査読有, doi: 10.1016/j.gie.2014.04.012.

Kawakubo K, Tada M, Koike K, et al. (19人中1番目) Disease-Specific Mortality Among Patients With Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12,486-91,2014. 査読有,doi: 10.1016/j.cgh.2013.06.032.

〔学会発表〕(計 2件)

久保田良政ら. 次世代シーケンサーとEUS-FNA 検体を用いた膵Solid-pseudopapillary neoplasmにおけるCTNNB1 遺伝子変異解析. 第87回日本消化器内視鏡学会総会, 2014/05/16, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

Kubota Y et al. *CTNNB1* Mutational Analysis of Solid-Pseudopapillary Neoplasms of the Pancreas Using Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration and Next-Generation Deep Sequencing. DDW2014, 2014/05/06, Chicago(USA).

6. 研究組織

(1)研究代表者

川久保 和道 (KAWAKUBO Kazumichi)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 80633578

(3)連携研究者

夏井坂 光輝 (NATSUIZAKA Mitsuteru)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 80642446

久保田 良政 (KUBOTA Yoshimasa)
北海道大学・大学院医学研究科・大学院生
研究者番号: なし

河上 洋 (KAWAKAMI Hiroshi)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 80399823