

膵管内乳頭粘液性腫瘍における囊胞液の遺伝子網羅的解析による 膵癌早期診断の試み

北海道大学大学院 医学研究科内科学講座 消化器内科学分野
助教 川久保 和道

(共同研究者)

北海道大学大学院 医学研究科内科学講座 消化器内科学分野 教授 坂本 直哉
北海道大学大学院 医学研究科内科学講座 消化器内科学分野 大学院生 久保田 良政

はじめに

本邦では、膵癌の発生者数、罹患者数が近年増加傾向であり、しかも極めて予後不良な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。我々は、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN; intraductal papillary mucinous neoplasm) の前向き観察研究を行い、膵発癌の高危険群であることを報告してきたが、従来の臨床的手法では膵発癌の超高危険群の同定、早期発見は困難である¹。また、IPMNが外科的切除により予後が改善することも報告してきたが、その術前の良悪性の診断は従来の画像診断、細胞検査ではきわめて困難であることが問題である^{2,3}。近年、次世代シーケンサーの登場により、今まで検出することができなかったような遺伝子変異を、微小な検体からでも解析できるようになり、これらの技術を用いた病態の解析が幅広く行われるようになってきている^{4,5}。そこで、我々は、IPMN患者から囊胞液または膵液を採取、DNAを抽出し、Ion AmpliSeq™ Cancer Panel Kit (Life Technologies Corporation) を用いlibraryを増幅、Template作成後、Ion PGM™ Sequencerにて独自に作成した36のがん関連遺伝子変異の解析を行い (図1)、IPMNの悪性度および膵癌の発生に関わる遺伝子変異の同定を目的として、本研究を行った。

EPHB6	PTEN
IGF1R	RNF43
KAT6B	SMAD4
PIK3R1	TBC1D3
THBS1	TP53
WHSC1	TSC2
DEK	VHL
NUP98	LIFR
APC	STK11
ATRX	SYNE1
CDKN2A	TNFAIP3
CTNNB1	WRN
DAXX	MAGI1
GNAS	NF1
KRAS	PML
MEN1	SAMD9
MLL3	TRIM24
PIK3CA	

図1：がん関連36遺伝子

結 果

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、囊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。コントロールとしては、患者さんの末梢血の白血球からDNAを抽出し、それらを用いた。IPMNの悪性度は、IPMN low grade (LG) 2例、IPMN high grade (HG) 2例、IPMN with invasive carcinoma (IC) 1例。観察期間中央値は9カ月。IPMA low gradeの2例は、経過観察中、IPMN high gradeの1例は外科的切除を行い、もう1例は今後外科的切除の予定。IPMN with invasive carcinomaの症例は、化学療法を現在も行っている。

表1：主な遺伝子変異解析結果（頻度）

	1	2	3	4	5
悪性度	IPMN-LG	IPMN-LG	IPMN-HG	IPMN-HG	IPMN-IC
分枝/主膵管型	分枝型	分枝型	主膵管型	主膵管型	分枝型
組織分類	腸 型	胃 型	腸 型	未 定	不 明
遺伝子変異					
GNAS	R201C (10)	R201H (29.8)	R201C (2)	R201C (21)	-
KRAS	-	G12D (21)	-	G12D (15) G12V (6)	
TP53	-	-	-	-	-
CTNNB1	-	-	-	-	-
STK11	-	-	-	-	-
PTEN	-	-	-	-	-
CDKN2A	-	-	-	-	-
SMAD4	--	-	-	-	-
RNF43	-	-	-	-	-

主な、遺伝子変異解析結果を表1に示す。Ion PGM™ Sequencerでの解析は、平均カバレッジは97.7%、平均リード数は102bpと良好であった。GNAS変異を4例、KRAS変異を2例に認めた。その他の遺伝子については今回遺伝子変異を検出することができなかった。

考 察

今回の検討では、既報で言われているようなIPMNに高頻度にみられる遺伝子変異である、GNASおよびKRAS遺伝子の変異を検出できた。また、遺伝子変異の部位に関しても、既報と同等の部位であった⁶。IPMN with invasive carcinomaでは遺伝子変異が検出されなかったが、それ以外の4例のすべてでGNASの変異を認め、IPMNに特異的な遺伝子変異と考えられる。KRAS変異に関しては胃型に多く腸型に認められないと言われているが、今回の研究においても腸型の2例ではKRAS変異を認めなかった⁷。悪性度に関しては、high gradeとlow

gradeの間には、大きな遺伝子変異の差は認めず、悪性度の関わる遺伝子変異の同定には至らなかった。観察期間が短く、また、症例数も少ないため、IPMNの悪性度や、将来の膵発癌に関わる遺伝子変異の同定にはいたっていないが、今後、症例数を積み重ね、観察期間を長くしていくことで、膵発癌の危険因子となる遺伝子変異の同定を行っていく必要がある。

要 約

IPMNの嚢胞液を採取しDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いることで、がん関連遺伝子の変異解析が可能であることが分かった。今後、症例の集積を重ねることで、IPMNの悪性度や膵発癌に関わる、遺伝子変異の同定を行っていく予定である。

文 献

1. Kawakubo K, Tada M, Isayama H, et al. Incidence of extrapancreatic malignancies in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gut* 2011;60:1249-53.
2. Kawakubo K, Tada M, Isayama H, et al. Disease-Specific Mortality Among Patients With Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:486-91.
3. Salvia R, Malleo G, Marchegiani G, et al. Pancreatic resections for cystic neoplasms: from the surgeon's presumption to the pathologist's reality. *Surgery* 2012;152:S135-42.
4. Kubota Y, Kawakami H, Natsuizaka M, et al. CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing. *J Gastroenterol*. in press.
5. Luchini C, Capelli P, Fassan M, et al. Next-generation histopathologic diagnosis: a lesson from a hepatic carcinosarcoma. *J Clin Oncol* 2014;32:e63-6.
6. Amato E, Molin MD, Mafficini A, et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes dissects the molecular profiles of intraductal papillary neoplasms of the pancreas. *Journal of Pathology* 2014;233:217-27.
7. Mohri D, Asaoka Y, Ijichi H, et al. Different subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasm in the pancreas have distinct pathways to pancreatic cancer progression. *J Gastroenterol* 2012;47:203-13.