

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	Tetsuhiro OKADA (岡田 哲弘)
<p>学位論文題目</p> <p>Digital PCR-based plasma cell-free DNA mutation analysis for early-stage pancreatic tumor diagnosis and surveillance (デジタルPCRを用いた遺伝子変異解析による膵腫瘍の早期診断とサーベイランス)</p> <p>共著者名</p> <p>Yusuke Mizukami, Yusuke Ono, Hiroki Sato, Akihiro Hayashi, Hidemasa Kawabata, Kazuya Koizumi, Sakue Masuda, Shinichi Teshima, Kuniyuki Takahashi, Akio Katanuma, Yuko Omori, Hirotoishi Iwano, Masataka Yamada, Tomoki Yokochi, Shingo Asahara, Kazumichi Kawakubo, Masaki Kuwatani, Naoya Sakamoto, Katsuro Enomoto, Takuma Goto, Junpei Sasajima, Mikihiro Fujiya, Jun Ueda, Seiji Matsumoto, Kenzui Taniue, Ayumu Sugitani, Hidenori Karasaki & Toshikatsu Okumura</p> <p>J Gastroenterol 55: 1183-1193 (2020) doi: 10.1007/s00535-020-01724-5.</p> <p>研究目的</p> <p>膵癌は5年生存率が10%以下と低く、難治癌の代表格である。膵腫瘍の存在診断には各種画像検査により直接所見である腫瘍像、ならびに膵管拡張などの間接所見の描出が重要であり、CTやMRIなどの画像診断技術の進歩により診断能の向上が見られる。一方、有効なスクリーニング手段が確立しておらず、早期発見が困難なのが現状である。また、確定診断には超音波内視鏡下穿刺生検や内視鏡的逆行性膵胆管造影を用いた膵管・胆管生検による病理診断が必要である。しかし、組織採取はいずれも侵襲を伴うものであり、より侵襲が少なく確実性の高い診断技術の開発が望まれている。</p> <p>癌の発生や進展に関わる遺伝子異常には臓器特性があり、これらの異常を的確に捉えることが治療のみならず診断においても有用な可能性がある。膵癌の多くは、KRASの点突然変異を伴い発生し、TP53やSMAD4などの癌抑制遺伝子の不活化を経て、浸潤癌へ進展する。細胞外に放出された癌細胞由来の核酸は末梢血中にも存在するため(遊離核酸; cell-free DNA、以下 cfDNA)、血液を含む体液から癌細胞の遺伝子異常を捕捉する試みが古くから行われてきた。このように体液を用いて間接的に腫瘍組織由来のゲノム異常にアクセスする方法は「リキッドバイオプシー」と総称され、DNA変異以外にも microRNA などの非コード RNA や代謝物の検出技術が、新しい癌のスクリーニング法として期待されている。</p> <p>近年、次世代シーケンサーをはじめとする癌関連遺伝子の検出技術の発展は目覚ましいものがあり、遺伝子変異解析とタンパク発現を組み合わせた CancerSEEK 法などのマルチレイヤーな分子を捉える技術が、膵癌を含む代表的な悪性腫瘍の存在診断に有用と報告されている。一方、次世代シーケンサーは解析費用が高額なためスクリーニング検査には不向きであり、より低コストかつ高感度な解析技術の開発が期待される。また、膵癌リキッドバイオプシーについて、これまで進行癌を対象とした報告が多く、切除可能膵癌での診断能に限界があるとされる(引用文献1)。その原因の一つとして、膵癌は一般に tumor cellularity が低く、血漿 cfDNA から癌由来のゲノム異常を拾い上げるのが比較的難しい癌腫であることが挙げられる。さらに、極めて少ない試料を用いて遺伝子解析を行う際、ターゲット分子を拾い落とす「subsampling error」という問題も存在する。本研究では、これらの諸問題を解決するために我々が独自に開発した改変デジタル PCR 法が(引用文献2)、切除可能な膵癌の診断及び IPMN のリスク評価において有用かを検証することを目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1) 対象患者と血漿サンプルの調製

膵癌及びその前駆病変のひとつである膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm; 以下、IPMN) 患者を対象に、7施設 (旭川医科大学病院、札幌東徳洲会病院、湘南鎌倉総合病院、手稲溪仁会病院、士別市立病院、千葉徳洲会病院、北海道大学病院) で前向きに症例登録を行った (UMIN000012810)。膵癌 96 例、IPMN 112 例及び健常人 76 例より、EDTA 採血管にて 8-16mL の全血を採取し、細胞成分を完全に除去するため 30 分以内に 2 回の遠心分離を行い (1,100xg, 10min; 16,000xg, 10min)、cell-free 血漿を調製した。これを -80°C で凍結保存し、解凍後に QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen 社製) を用いて cfDNA を精製した。

膵癌は UICC 第 8 版に基づいてステージ分類し、IPMN は国際診療ガイドラインに従い低リスク (福岡因子陰性)、Worrisome feature、High-risk stigmata に分類した。

2) cfDNA の定量

Qubit dsDNA HS assay (Thermo Fisher Scientific 社製) による蛍光ベースの検出法を用いて cfDNA 濃度を測定し、血漿 1 mL あたりの核酸量を算出した。また、核及びミトコンドリア由来 DNA

(Hemoglobin β -subunit (HBB) 及び Mitochondrially encoded NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit 1 (MT-ND1)) に対するプライマー・プローブセット (Integrated Device Technology 社製) を設計し、QX200 droplet digital PCR system (Bio-Rad Laboratories 社製) を用いてマーカー遺伝子のコピー数を絶対定量した。

3) ドライバー変異の検出

低濃度な cfDNA における KRAS 及び GNAS 変異を確実に拾い上げるため、同デジタル PCR システムを用いて pre-amplification 法を行い、標準的な増幅・検出法と比較した。pre-amplification は既報に準じて (引用文献 2)、ターゲットとする hot spot 領域を 8 サイクルの droplet PCR により増幅し (1st run dPCR)、クロロホルム処理により droplet の破砕と増幅したテンプレートの精製・濃縮を行い、FAM 標識した変異型及び HEX 標識した野生型プローブを用いて検出 (2nd run dPCR) するという手順で変異体のアレル頻度を算出した。変異 (一塩基置換) 検出の特異性を担保するために、プローブにはアニール特異性の高い架橋型人工核酸 (locked nucleic acid; LNA) を用いた。腫瘍組織における変異の確認のため、生検及び外科切除組織よりゲノム DNA を抽出し、KRAS 及び GNAS をカバーする Targeted amplicon sequencing により体細胞変異を特定し、血漿 cfDNA より得られた解析結果と対比した。

成 績

1) cfDNA の定量

膵癌 96 例、IPMN 112 例のうち、65 例で外科切除が施行された (Stage 0/1/2/3; 7/12/31/15)。Qubit 法による cfDNA 濃度は、膵癌、IPMN 患者のいずれも健常人より高く、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いた比較解析の結果、14.4, 13.9 ng/mL を cut-off とした場合の area under the curve (AUC) 値は 0.77, 0.71 と算出された。HBB 及び MT-ND1 コピー数も、膵癌、IPMN 患者では健常人よりも高かったが、特に HBB は膵癌と健常人 (cut-off 3,116 copy/mL; AUC 0.84)、MT-ND1 は IPMN 患者と健常人 (cut-off 72.325 copy/mL; AUC 0.88) の鑑別に有用であった。

2) 膵癌患者におけるドライバー変異検出

pre-amplification 法の優位性を確認するため、健常者とステージ 4 膵癌患者との cfDNA の変異アレル比 (mutation allele frequency: MAF) の ROC 解析を行った。KRAS G12D/12V/12C/G13C (pool#1) と G12A/12R/12S/G13D (pool#2) のグループに分け解析したところ、MAF 0.05% 以上を変異陽性とした場合、標準的な解析方法と比較し (48.3%, 55.2%)、pre-amplification 法の検出力が高いことが証明でき

た (100%, 87.5%)。

続いて KRAS 変異を有する切除膵癌 56 例において MAF を 0.1% の cut-off とし ROC 解析を行ったところ、標準法に比較し改善が見られた (pool#1, AUC 0.528→0.903; pool#2, AUC 0.430→0.855)。また、早期膵癌例でも KRAS 変異の検出は可能であった (ステージ 0; 75%、ステージ 1; 77.8%)。KRAS の MAF は CA19-9 とは相関がなく、独立したマーカーと考えられた。また、腫瘍組織における KRAS MAF の高い例において血漿 cfDNA における変異検出率が高かったことから、tumor cellularity の高い症例で血漿中への腫瘍由来 DNA の放出が高度となると考えられた ($P < 0.0091$)。さらに、KRAS MAF が 0.45% 以上の術後再発のハザード比は、2.85 (95% CI ; 1.14-7.09) であり、CA19-9 高値 (>55) のハザード比 1.40 (95% CI ; 0.408-2.615) を上回ったことから、術後再発の予測因子となると考えられた。

3) IPMN 切除例と経過観察例におけるドライバー変異検出

外科切除され病理学的に IPMN 関連癌と診断された 21 例について、KRAS に加え GNAS を含めて腫瘍組織と血漿 cfDNA に見られた変異を対比した。主腫瘍 (浸潤癌) での KRAS 変異は 81% (17/21)、GNAS 変異は 48% (10/21) に確認された。これらのうち、pre-amplification 法により血漿 cfDNA で検出されたのは、KRAS 81.3% (13/16)、GNAS 55.5% (5/9) であった。一方で、腫瘍本体に存在しない変異が血漿 cfDNA で検出された例もあった (KRAS; 2/18、GNAS; 7/17)。血漿 cfDNA が浸潤癌以外の膵内に多発した腫瘍由来の変異を捉えている可能性を考慮し副病変も含めて解析をしたところ、副病変のみに認められた KRAS、GNAS 変異は、それぞれ 83.3% (5/6)、100% (2/2) で血漿 cfDNA においても検出された。

続いて 112 例の IPMN 経過観察例の解析を行った。低リスク群 (福岡因子陰性)、Worrisome feature、High-risk stigmata は 66/37/9 だった。血漿 cfDNA における KRAS 変異率は、3 群いずれにおいても健常人に比較し有意に高値を示した ($P < 0.0001$)。一方で低リスク群と Worrisome feature、High-risk stigmata には有意差が見られなかった ($P = 0.772$, $P = 0.2779$)。また、GNAS の変異率においても低リスク群と Worrisome feature、High-risk stigmata との間に有意差は見られなかった ($P = 0.086$, $P = 0.910$)。

考 案

本研究では、血漿 cfDNA の情報を得ることが、治癒切除が可能な膵癌の発見や IPMN のリスク評価に寄与するかを検証するため、膵癌及び IPMN 患者を多施設で前向きに集積した。血漿 cfDNA 濃度は膵癌、IPMN 共に健常人と比較し高値を示すことが確認され、既報の通り腫瘍を有する生体内で遊離核酸へのターナーオーバーが亢進することが確認された。しかし、健常人と前癌状態 (浸潤を伴わない IPMN)、さらに膵癌患者における差は小さく、核 DNA のみならずミトコンドリア由来 DNA の絶対定量により、鋭敏に担癌状態を予測することが可能と期待される。cfDNA は主としてアポトーシス細胞から放出されたヌクレオソームで保護された DNA 断片で構成され、サイズは 150-180bp にピークが見られる。最近、癌患者の血漿中には、90-150bp 程度のより小さな断片長が多く見られること、その一部がミトコンドリア由来であることが報告されており、今後、癌腫や遺伝子変異プロファイルによって特徴的な cfDNA 特性がより明らかになる可能性がある。

血漿 cfDNA のような低濃度な核酸を PCR 増幅する場合、PCR 反応系へのターゲット分子の分配不均衡に伴う「subsampling error」が、定量結果の再現性担保の障害となる。この問題が改変デジタル PCR 法により克服できる可能性を報告した (引用文献 2)。本法を用いることにより、これまで困難とされた切除可能膵癌においても血漿 cfDNA 中の KRAS 変異の検出が可能となったことが明らかとなった。検出された KRAS 変異のアレル頻度は、tumor cellularity に影響を受ける傾向があるが、T 因子や N 因子とは相関が見られなかったことから、画像には反映されない情報を示す可能性がある。また、CA19-9 との相関も見られず、術後再発予測マーカーとしての優位性が示唆された。ルイス抗原陰性の患者 (日本人の約 6-10%) の存在を考えた場合、その臨床的意義は大きい。デジタル PCR は次世代シーケンサーと比較し、低コストかつ比較的簡便に解析が可能であり再現性も高いことから、膵癌診療においてドライバー変異を高感度検出し、膵癌ハイリスク群や画像での疑診例におけるスクリーニング検査などの目的で、診療へ早期に導入されることが期待される。また、術前化学療法の効果判定などにも応用可能であろう。

血漿 cfDNA の KRAS、GNAS 変異検出により、IPMN 患者では画像上指摘可能な指標病変以外にも、副病変も含めたゲノム異常の存在予測が可能であることの意義も大きい。本研究結果では IPMN 国際診療ガイドラインで定められるリスク分類と KRAS 及び GNAS の MAF には関連がなかったため、cfDNA 遺伝子変異の検出はその悪性度評価において画像から得られる情報とは独立した新たな指標となる可能性が示された。現行のガイドラインに従った臨床現場において、低リスクと評価されていた症例でも経過観察中に IPMN 本体が急激に増大する例や、予期せぬ部位に膵癌の併存が発見され、時に治癒切除するタイミングを逸することも経験する。血漿 cfDNA 変異が確認された症例を対象に、このようなゲノム情報をサーベイランスに加えるといった前向きな経過観察のデータを蓄積することにより、その臨床的意義を明らかにする必要がある。IPMN では膵全体に複数の病変が同時・異時多発する特徴を持ち、肉眼的正常膵においても顕微鏡レベルの潜在性病変が多数存在するため、嚢胞性病変以外からの併存膵癌の発生の母地となると考えられている (引用論文 3)。このような現象は、IPMN を伴わない通常型膵癌においてもみられる可能性があるため、膵 (臓器) 全体をカバーした評価系が重要であり、それには本研究で構築した cfDNA 解析が強みとなる。さらには血漿だけではなく、より臓器特異性の高い DNA を取得できる可能性のある膵液や十二指腸液を用いたりキッドバイオプシー解析を積極的に取り入れていくべきである (参考文献 1)。

本研究では試料とした血漿 cfDNA 量が少なく、KRAS 変異は 2 プールのプライマー・プローブを用いて解析を行ったため変異タイプの特定には至っていない。ひとつの反応系に異なる複数の KRAS 変異が存在しながら、その多様性を見落としていた可能性がある。この問題を解決するため、変異タイプの特定を可能にする改良プロトコルを開発している (論文投稿準備中)。解析技術の改良を重ねることで、遺伝子異常を早期癌の診断や発癌リスクが高いサブセットを対象とした効果的なサーベイランスに活用できるようになる可能性がある。

結 論

膵癌術前の血漿 cfDNA 定量とドライバー変異の高感度検出は、癌の存在診断や術後再発の予測に有用である。また、このような遺伝子解析技術は、膵全体に分布する多発病変の存在とその多様性を検出できる可能性があり、IPMN 患者の診療において有益な情報をもたらすと期待できる。膵癌患者の生命予後を抜本的に改善するには、画像や病理から得られる表現型とゲノム異常をより密接に結びつける必要があり、さらに本研究を発展させたい。

引 用 文 献

- (1) Takai E, Totoki Y, Nakamura H, et al. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep* 5:18425 (2015)
- (2) Ono Y, Sugitani A, Karasaki H, et al. An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving subsampling issues. *Mol Oncol* 11:1448-58 (2017)
- (3) Omori Y, Ono Y, Tanino M, et al. Pathways of progression from intraductal papillary mucinous neoplasm to pancreatic ductal adenocarcinoma based on molecular features. *Gastroenterology* 156:647-61 (2019)

参 考 論 文

- (1) 岡田哲弘、水上裕輔、林 明宏、河端秀賢、佐藤裕基、河本 徹、後藤拓磨、谷上賢瑞、小野裕介、唐崎秀則、奥村利勝. 膵癌の初期発生とリキッドバイオプシーによる分子診断. *膵臓* 35:302-312 (2020)
- (2) Okada T, Iwano H, Ono, Karasaki H, Sato T, Yamada M, Omori Y, Sato H, Hayashi A, Kawabata H, Goto T, Sasajima J, Takauji S, Nagashima K, Mizukami Y, Okumura T. Utility of “liquid biopsy” using pancreatic juice for early detection of pancreatic cancer. *Endosc Int Open* 6: E1454-E61 (2018)