

膵上皮内癌、小膵癌のゲノム、エピゲノム解析による発癌、 進展機構の解明

東北大学大学院医学系研究科 病態病理学分野

伊藤 泰斗

I 要 旨

膵癌は最も予後不良な固形癌であるが、高異型度膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN, high-grade) / 上皮内癌 (HGD) および転移のない小径の浸潤性膵管癌 (T1N0M0 PDAC) は比較的予後良好である。しかしながら、早期段階での膵癌切除例は稀であり、それらを対象とした遺伝子解析研究は、小規模に留まっていた¹⁻³⁾。その進展機構を解明することは膵癌患者における分子病理学的なスクリーニング、および、治療戦略に大きく寄与することが期待される。我々は、大規模な早期段階の膵癌を対象としたゲノム、エピゲノム解析を行い、HGD および T1N0M0 PDAC の遺伝子異常の挙動を明らかにした。本結果による膵癌の分子進化メカニズムのモデル化を基盤とした新たな診断、治療戦略の開発が期待される。

II 背景と目的

膵癌は予後不良な癌腫で、その 5 年生存率は 10% に満たない。一方で、癌が膵管内に留まる HGD では 85.8%、T1N0M0 PDAC では 68.7% と比較的良好的な予後が報告されている⁴⁾。しかし、依然として早期段階での膵癌の発見は非常に困難で、本邦においては膵切除例の 0.7% (UICC Stage 0)、3% (UICC Stage I) に留まり⁴⁾、世界的にはその診断例は極めてまれである。

これまで、PDAC に対する遺伝子解析研究

から、PanIN progression model が提唱されていた。これは、PanIN が低異型度から高異型度への段階的な異型性の上昇とともに *KRAS*、*CDKN2A*、*TP53*、*SMAD4* のいわゆる Big 4 遺伝子異常が徐々に加わり、浸潤癌へ進行していく連続的なモデルである⁵⁾。また、膵発癌には、染色体破砕による断続的かつ大規模な遺伝子改変イベント (chromo-thripsis) が関与し、数数学的モデルからは上皮内癌変から転移性膵癌までのいずれの段階でも起こりうるとされている⁶⁾。

これまでに、HGD における Big 4 異常の頻度は、*KRAS* 90 ~ 100%、*TP53* 12 ~ 70%、*CDKN2A* 18 ~ 25%、*SMAD4* 0 ~ 20% と報告されているが¹⁻³⁾、浸潤癌発生リスクとの関連は明らかでない。また、HGD および T1N0M0 PDAC の発見例が稀少であることから、それらを対象とした遺伝子解析研究は少数例での解析に留まっていた。

「早期段階での膵癌診断率をいかに増やすか」が、膵癌の予後改善に不可欠であり、その分子病理学的特徴の解明は喫緊の課題である。その解明は、膵癌患者における臨床、分子病理学的なスクリーニングおよび治療戦略へ寄与することが期待される。

III 方 法

HGD と T1N0M0 PDAC (PDAC) を対象とし、多施設共同研究 (東北大学病院、愛知県がんセンター、旭川医科大学病院、九州大学病

院、JA尾道総合病院、仙台厚生病院、仙台オープン病院、東北医科薬科大学病院、東京女子医科大学病院)により、2010年から2022年に切除された235病変/152症例を集積した。病理学的評価および免疫組織化学法による癌抑制遺伝子(p16、p53、SMAD4、ARID1A、 β -catenin、STK11)の蛋白発現解析から、単独HGD(isolated HGD;iHGD)84病変/72例、浸潤癌併存HGD(HGD concurrent with PDAC;cHGD)72病変/69例、PDAC79病変/77例に群別した。ホルマリン固定パラフィン包埋組織から核酸を抽出し、droplet digital PCR法によるKRAS変異解析(235病変)、エクソーム解析(96病変)、標的遺伝子解析(107病変)、トランスクリプトーム解析(30病変)を施行した。また、GATA6およびCK5免疫組織化学法による膵癌フェノタイプ分類⁷⁾を施行した。

IV 結 果

エクソーム解析の結果、変異総数は平均547.8個(111~3,807個)、非同義変異数は平均48.9個(10~252個)検出された。iHGD、cHGD、PDACの比較で、iHGDは平均変異総数363.7個(111~1,531個)、cHGDは566.7個(172~2,064個)、PDACは913.0個(258~3,807個)であり、PDACの段階から有意に増加していた($P < 0.05$)。しかし、非同義変異数はiHGD平均35.1個(10~88個)、cHGD平均54.9個(16~114個)、PDAC平均70.9個(22~252個)であり、cHGDの段階から有意に増加していた($P < 0.05$)。

遺伝子変異、コピー数異常解析より、KRAS変異(iHGD 97%、cHGD 100%、PDAC 98%)、CDKN2A異常(31%、67%、74%)、TP53異常(39%、75%、79%)、SMAD4異常(29%、57%、74%)であり、CDKN2A、TP53、SMAD4の異常はcHGDの段階で有意に増加していた

($P < 0.01$)が、cHGDとPDACに有意差はなかった。一方で、ARID1A異常(53%、48%、47%)は、iHGDから高頻度に認められた(図1)。

コピー数(CN)多型は、iHGDから1q21-24、31-32、41-43、9p12、17q12のCN上昇、18q23のCN減少が認められた($P < 0.05$)。さらにcHGDではiHGDに比較し、ゲノム全体でのCN変動が増加し、特に7q、21p11、22q12のCN上昇、6q14-16、21、8p23、9p21-24、17p11-13、18q12、21-23、22q11、13のCN減少および8p23.1、17p11-13、18q21.1のアレリックインバランスが集積していた($P < 0.05$)。cHGDとPDACのCN変動パターンは類似していた。

全コホートを対象とした免疫組織化学法による膵癌フェノタイプ分類では、GATA6高発現/CK5低発現であるclassical typeが42.0%、GATA6高発現/CK5高発現のhybrid typeが32.3%、GATA6低発現/CK5高発現のbasal-like typeが24.0%、GATA6低発現/CK5低発現のnull typeが1.7%であった。iHGD、cHGD、PDACの比較で、classical type(iHGD 50%、cHGD 53%、PDAC 23.4%)、hybrid type(39.5%、34.3%、22.0%)、basal-like type(10.5%、11.4%、50.6%)、null type(0.0%、1.4%、3.9%)であり、PDACにおいてbasal-like typeの頻度が有意に増加していた($P < 0.01$) (図2)。

これまでに、26病変に対しトランスクリプトーム解析を施行した。初めに、Moffittフェノタイプ分類⁸⁾の遺伝子群に基づいたGSEA解析を施行した。免疫組織化学法によるフェノタイプ分類でのbasal-like typeは、classical/hybrid typeと比較し、有意にMoffitt分類のbasal-like typeで発現上昇がみられる遺伝子群の発現上昇が認められた($P < 0.01$ 、FDR $Q < 0.01$)。

また、免疫組織化学法により群別したbasal-like typeでは、classical/hybrid typeに比較して、上皮間葉転換、血管新生、KRASシグナ

ル経路の発現上昇が認められた (MsigDB hallmark gene set, $P < 0.01$, FDR $Q < 0.01$)。Hybrid type では、classical type に比較して、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ で誘導される $\text{TNF-}\alpha$ シグナル経路、および、上皮間葉転換に関与する遺伝子群の発現上昇が認められた ($P < 0.01$, FDR $Q < 0.05$)。

さらに、浸潤に寄与する因子を検討するため、早期の膵癌を浸潤進行度別 (iHGD、cHGD、PDAC) に群分し、GSEA 解析を施行した。まず、iHGD と cHGD で比較したとこ

ろ、浸潤準備段階にある cHGD では上皮間葉転換、血管新生、 KRAS シグナル経路の発現上昇が認められた (MsigDB hallmark gene set, $P < 0.01$, FDR $Q < 0.05$)。さらに、PDAC と cHGD で比較したところ、上述の遺伝子群に加え、 $E2F$ 下流の細胞周期関連遺伝子群、G2/M チェックポイントに関与する遺伝子群、 MYC ターゲットとなる遺伝子群、mTOR シグナル経路の活性化が認められた (MsigDB hallmark gene set, $P < 0.01$, FDR $Q < 0.01$)。

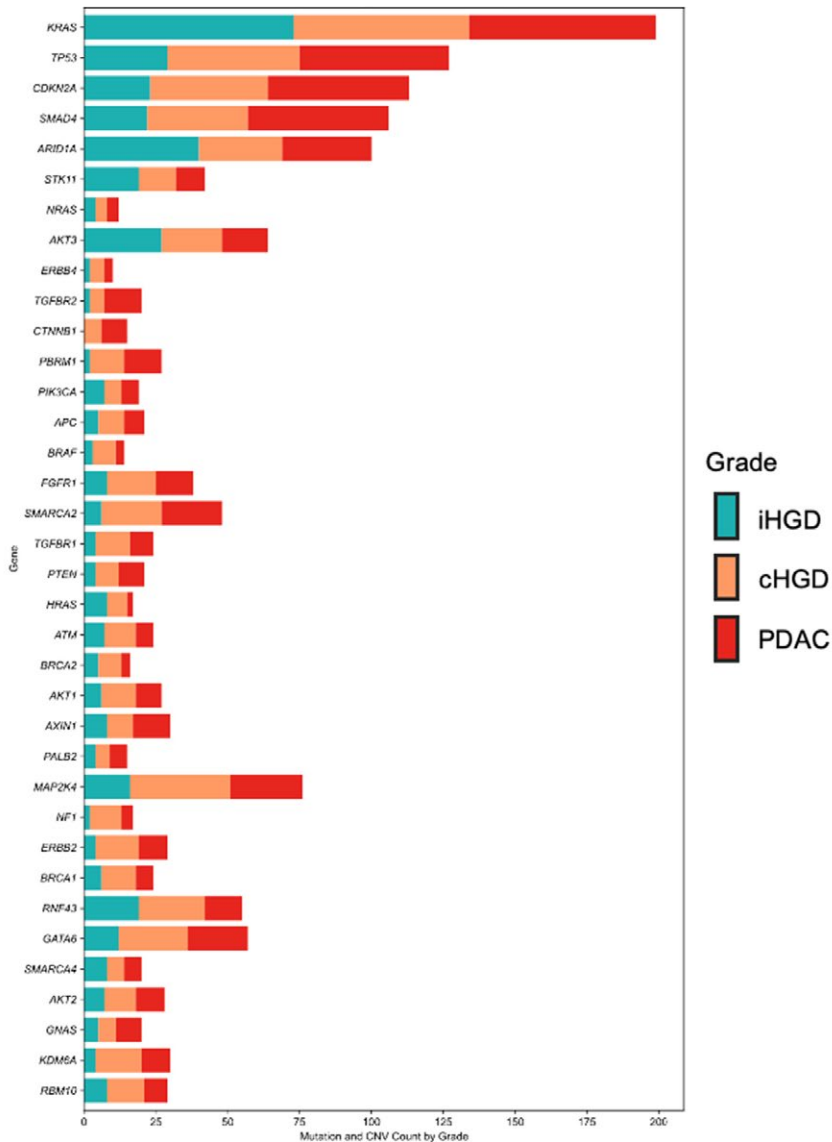


図 1 進行度別に見た早期膵癌の遺伝子異常

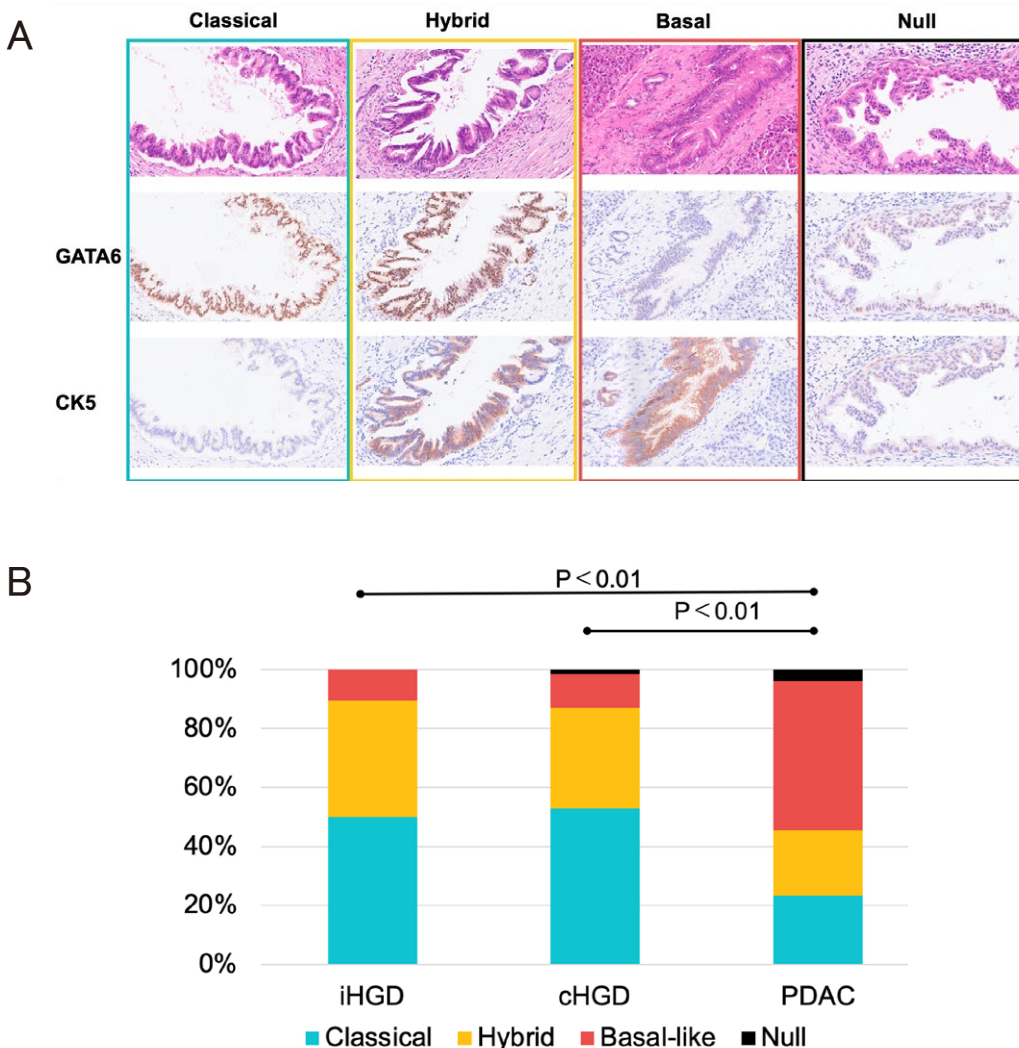


図2 (A) 免疫組織化学法による膵癌フェノタイプ分類、
(B) 早期膵癌における膵癌フェノタイプの分布

V 考 察

次世代シーケンス技術を用いた大規模な早期ステージ膵癌症例の網羅的解析により、膵癌では、iHGD から既に主要な遺伝子異常の蓄積が開始されており、さらに浸潤準備段階にあるcHGDではPDACと同等の遺伝子変動を示すことが明らかとなった。我々は、詳細なコピー数多型解析により、既に iHGD の病変内でコピー

数変動が劇的に起こっていることを解明した。このことから、膵癌スクリーニングにおいて、liquid biopsy の標的として Big 4 の変異情報に加え、コピー数多型解析を応用することで、高異型度 PanIN/ 膵上皮内癌の診断精度の向上や悪性度リスクの層別化が期待される。

また、これまで進行膵癌あるいは転移性膵癌におけるフェノタイプ分類は報告されていたが、HGD および T1N0M0 PDAC でのフェノ

イプの挙動についてはわかっていなかった。我々は、GATA6/CK5 免疫組織化学法によるフェノタイプ分類は Moffitt のフェノタイプ分類で変動する遺伝子群と同様の挙動を示すことを解明すると共に、それが T1N0M0 PDAC および HGD でも適応可能であることが確認された。また、basal-like type は上皮間葉転換や血管新生、KRAS シグナル経路の発現上昇など、癌の進行に寄与する遺伝子群が発現上昇していることが確認された。また、免疫組織化学法によるフェノタイプが cHGD と併存する PDAC の間で変化していたり、浸潤巣内で変化したりしている症例が認められ、このような変化に関連する遺伝子の挙動を解析する予定である。

VI 結 語

HGD では既に主要な遺伝子異常が蓄積し、劇的なゲノム変動が生じることで PDAC が発生する。浸潤準備段階での遺伝子変異蓄積、ゲノム不安定性が生じ、浸潤に至る分子進化モデルが明らかとなった。膵癌の予後改善に向けた、早期診断への新たなアプローチへの応用が期待される。

関連文献

- 1) Murphy SJ, Hart SN, Lima JF, et al. Genetic alterations associated with progression from pancreatic intraepithelial neoplasia to invasive pancreatic tumor. *Gastroenterology*. 2013; 145(5): 1098-109 e1.
- 2) Hosoda W, Chianchiano P, Griffin JF, et al. Genetic analyses of isolated high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (HG-PanIN) reveal paucity of alterations in TP53 and SMAD4. *J Pathol*. 2017; 242(1): 16-23.
- 3) Hata T, Suenaga M, Marchionni L, et al. Genome-Wide Somatic Copy Number Alterations and Mutations in High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Am J Pathol*. 2018; 188(7): 1723-33.
- 4) Kanno A, Masamune A, Hanada K, et al.

- Multicenter study of early pancreatic cancer in Japan. *Pancreatology*. 2018; 18(1): 61-7.
- 5) Hruban RH, Goggins M, Parsons J, et al. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(8): 2969-72.
 - 6) Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, et al. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature*. 2016; 538(7625): 378-82.
 - 7) Kokumai T, Omori Y, Ishida M, et al. GATA6 and CK5 stratify the survival of patients with pancreatic cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol*. 2023; 36(5): 100102.
 - 8) Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*. 2015; 47(10): 1168-78.