

全膵のゲノム異常解析による膵癌術後再発の監視

旭川医科大学外科学講座肝胆膵・移植外科学分野

高橋 裕之

I 要 旨

近年、膵癌術後の残膵再発の報告が増加し、新たな再発形式として着目されている。我々は、膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 関連膵癌切除材料の詳細な病理解析と多領域シーケンスにより、肉眼的正常膵に多発する前駆病変 (背景膵病変) における変異蓄積の多様性と発癌及び再発様式に関連性があることを発見した。しかし、通常型膵癌と IPMN 関連膵癌との境界は曖昧であり、両者における膵管内病変の分布パターンや予後との関連性は不明である。

本研究では、膵癌切除材料に分布する背景膵病変と残膵から採取した膵液における遺伝子変異情報を得て IPMN 関連癌を含む膵癌の再発の特徴を明らかにする。膵内には、主腫瘍以外にも「予備軍」が非連続的に分布し、その多様性に基づく膵癌術後サーベイランスの新戦略を提

案する。

II 目 的

これまで応募者らが進めてきた研究対象を IPMN から古典的膵癌へ拡大することで、残膵再発を来しやすい膵癌の特徴を明らかにする (図 1)。具体的に以下の 3 点を重点的に調べ、最終的に新しい術後サーベイランスの在り方を提案する。

- ① 背景膵病変と残膵から採取する膵液における KRAS 及び GNAS 変異の存在率と変異種の多様性
- ② ①における、癌抑制遺伝子変異とタンパク発現異常の検出
- ③ 残膵膵液中に検出される遺伝子異常と、切除断端の病理所見及び再発形式との関連

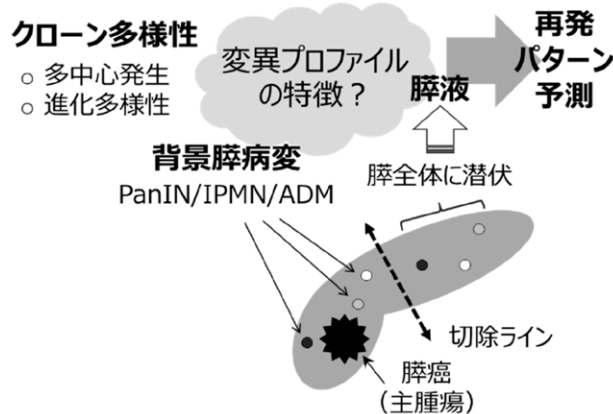


図 1 本研究のコンセプト

III 方法

病理学的解析：Stage 0-II 膵癌（IPMN 関連膵癌を含む）の切除材料の全割標本を用いて、以下に示す方法で解析する。

- H-E 像を基に異型度の異なる膵管内病変を全てマッピング（図 2）し、Baltimore コンセンサス分類に基づいて形態学的に評価（Basturk, Am J Surg Pathol 2015）
- 異型膵管上皮マーカー（Claudin-18）、TP53 や SMAD4 等の癌抑制遺伝子のタンパク発現、粘液形質を免疫組織学的に定量
- バーチャルスライド画像と術前の MRCP 像のマージ

遺伝子解析：組織材料より、主病変と背景膵病変 10-50 箇所程度を主膵管と分枝膵管病変に分けて未染スライドよりサンプリングし（図 2 及び次ページ図 3）、核酸抽出を行う。表 1 に示す遺伝子について Targeted sequencing により変異情報を得る。また新鮮膵液を 1mL 程度より核酸抽出のうえ、組織検体と同様に変異検出を行う。なお膵液の解析には、デジタル PCR による KRAS 及び GNAS 変異のプリテストを行い、その他の変異については低頻度変異の検出が可能な分子バーコード仕様のパネルを使用する（十二指腸液を使用したデータを用いて検証済み、論文投稿中）。

2023-2024 年度に 60 症例程度を登録のうえ病理・遺伝子解析結果を統合し、主腫瘍と背景膵病変とのクローン類縁性、さらに多中心性発生したと考えられる Polyclonal な病変の膵内分布を追跡する。術後の残膵画像評価は造影 CT と MRCP を組み合わせて行い、膵体尾部切除例において画像所見に変化がみられる場合には膵液（または十二指腸液）を再サンプリングのうえ、遺伝子解析を追加する。

術後再発に関する予後データを回収し、切除断端の病理学的な情報を加え、組織・膵液の遺伝子解析結果が術後の再発形式に及ぼす影響を数理学的に分析し、予後予測モデルを構築する。

- 10 例分の通常型膵癌切除例の病理マッピング情報を取得済みであり（倫理委員会承認）、病変単位での Needle dissection 法の手技は確立している（図 3 上段）。
- 背景膵病変の異型度、主病変や主膵管からの距離はバーチャルスライド画像を用いた機械学習によりデータ化する（inception v3）。
- デジタル PCR による微量 DNA 検体での KRAS 及び GNAS 変異解析をバリデーションする系を保有している（マルチプレックスアッセイ：図 3 下段）。

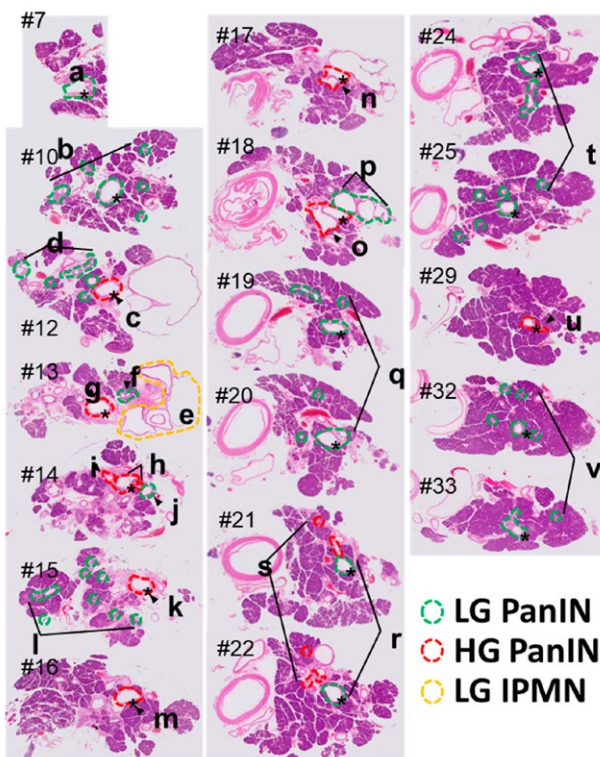
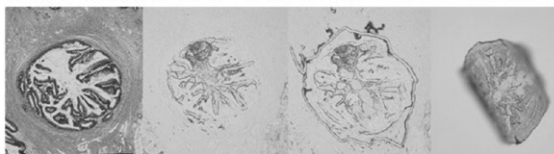


図 2 全膵の詳細な観察による病変分布と変異情報の取得

- 代表的な 13 個の膵癌関連遺伝子変異を搭載した targeted sequencing パネルを保有、稼働している。クローン類縁性評価のため複数の traceable gene の全エクソン配列を網羅したパネルであり、全ゲノム解析に比較しコストパフォーマンスが高い。
- 遺伝子変異の組み合わせから膵癌術後の早期再発を予測するアルゴリズムを構築済みであり (Ono M, Ann Surg Oncol 2022)、本モデルを局所再発、膵内転移のリスク推定に応用するための技術的基盤を有する。

実体顕微鏡を用いたneedle dissection



Scale; 1 mm

マルチプレックス・デジタルPCRによる変異検出 KRAS codon 12/GNAS codon 201

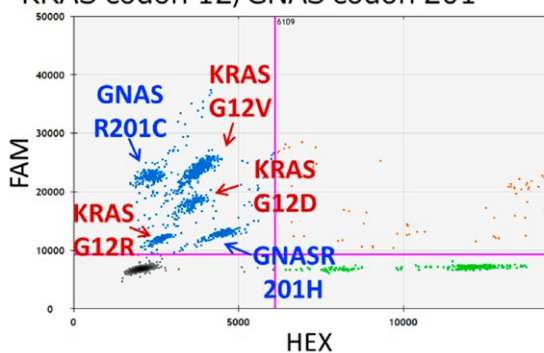


図 3 微小病変からのサンプリングとデジタルPCRによる変異検出

表 1 Target sequencing用パネル

Hotspot	Whole exon	Copy number
KRAS	TP53	GATA6
GNAS	CDKN2A	MYC
BRAF	SMAD4	AP3B1*
PIK3CA	STK11	EIF2C1*
CTNNB1	RNF43	RPP30*
KLF4		RPPH1*
		TERT*

*はコピー数解析用の内部標準

IV 結 果

1. 膵液採取方法

当科においては、膵頭十二指腸切除の際、術中に膵液をエコーガイド下に採取、術後膵液漏リスクを評価している。その際に採取した膵液を分注し、遺伝子変異検索に用いることとした。

膵液採取はエコーガイド下に行うため、膵管拡張のない症例においては採取が極めて困難であり、かつ採取量が1mlに満たない場合が多い。症例にとっては術後膵液漏リスクの評価の方が合併症コントロールのためには重要と考えられるため、まずパイロットスタディとして、必要最小膵液量の検討を行った。

結果としては、0.1mlの膵液においても解析に十分な核酸が得られることが判明したため、膵液採取の方法としては術中採取膵液の分注とすることとした。

2. 検討症例

研究機関において現在までに研究同意書が得られ、膵液ならびに検体採取が可能であった症例は3例であり、その内訳は膵癌1例、IPMN2例であった。

3例全例において、採取膵液から抽出した核酸量でdPCRは施行可能であった。

3例中2例においてKRAS G12/G13変異陽性、1例においてはdPCR上はpositive droplet1個のため陰性と判定したが、このような症例については今後パネル検査での精密な判定を計画している。

症例ごとに術前画像を基に腫瘍本体・(症例によっては)腫瘍浸潤部・背景膵のサンプリングを計画実行しており、これらについては所属する研究室で独自に設計し運用中のパネルを用いて現在遺伝子解析および免疫染色をおこない評価中である。

対象症例については、術前採血を保管し術後

定期的に外来で採血を施行、術後followの画像検査とともに血液中の遺伝子変異検索により再発監視が可能か検討する予定であり、現在は検体収集および経過観察中である。

現在のところ3例全例において残膵再発は認められていない。

本研究内容については、2023年度科学研究費助成事業に採択(23K08164)されており、更に症例を収集し、検討を重ねていく予定である。

V 考 査

膵癌の外科切除材料の肉眼的には正常に見える膵にも微小な異型膵管病変があることは古くから知られている。前癌病変としてのPanINの概念が整理されてきたが、これ以外にも10mmに満たない小型のIPMN(いわゆるincipient IPMN)、acinar-to-ductal metaplasia(ADM)やatypical flat lesion(AFL)、その他病理学的に分類困難な多彩な微小病変が認められる。膵切除断端におけるhigh-grade dysplasiaの膵癌及びIPMNの局所再発因子としての意義については数多くの議論が重ねられてきたが、当研究室ではIPMN切除後の残膵再発の検討から異型上皮細胞が膵管内を非連続的に拡散する現象を確認し¹⁾、このような現象が通常型膵癌においても存在しうることから、主腫瘍とのクローン類縁性のある病変、さらに多中心性発生した初期クローンが膵内に多数分布することを前提に、術後管理を行うべきであると考えに至った。

これら、目に見えない背景膵病変を「可視化」するには、切除された膵の肉眼的正常部と残膵から採取した膵液をセットでゲノム解析する必要がある。その情報を基に遠隔転移のみならず、高解像なMRI等の画像による術後サーベイランスを確立することが、長期予後を期待できる膵癌患者への精密医療の第一歩となると

考え、本研究を立案した。膵癌原発巣周辺の正常膵にみられる異型膵管を詳細に解析し、低異型 PanIN の時点で、その多くが KRAS 変異をはじめとするドライバー遺伝子を有していることが 10 年前に報告されている (Kanda, Gastroenterology 2012)。この論文をヒントに、30 例の IPMN 関連膵癌の同一膵内における 167 カ所の異型膵管病変を系統的なサンプリングと多領域シーケンスにより、膵発癌経路のパターン化を試みた我々の研究は、背景膵病変の詳細なゲノム解析における先駆的な事例であった²⁾。類似研究として、8 例の浸潤性膵管癌と関連する 12 個の PanIN の全ゲノム解析を行った米国からの報告 (Makohon-Moore, Nature 2018) があり、膵癌の進展を明らかにする上で、背景膵病変の詳細な解析というアプローチの正当性を裏づけるものである。従って、膵癌の進展過程を理解するうえで、IPMN と通常型膵癌を別個のものとする考え方を修正すべき時期に来ていると考えられる。

すなわち、膵癌術後の患者生命予後改善のブレイクスルーには、治癒切除をなした患者の厳重な監視が必要である。膵癌術後の残膵再発症例では、適切な時期に追加切除を行うことで予後改善をなしている現状から、潜伏状態にある「再発の芽」の可視化を画像診断のみに頼るのではなく、分子診断を併用する時代に入っている。

我々の切除標本の膵全割標本を用いた、きめ細かなアプローチは、欧米における high-volume center においても避けられることが多く、独自性の高い情報発信となっており、また術後膵瘻の予測評価のため残膵膵液中のアミラーゼ測定による Soft pancreas の評価をルーチンで行っており³⁾、ゲノム医療時代を迎え本法の活用法の拡大を狙っている。現在までの症例集積および採取膵液の解析は 3 例までとなっているが、少量膵液においても遺伝子解析可能な核酸収集は可能であることを確認しており、

3 例中 2 例において採取膵液 dPCR 上 KRAS G12/G13 変異が確認できている。

以上の考案の下、本研究を実施しており、今後症例集積および定期血液検査と画像診断による術後 follow の中で、新たな膵癌スクリーニング法を提案したいと考えている。

VI 結 語

術中に採取した少量膵液を用いた遺伝子解析による KRAS 変異の同定は可能である。腫瘍本体の遺伝子解析結果や術前 / 術後の血液を用いた遺伝子解析結果を統合することで、新たな膵癌スクリーニング法の開発につながることを期待される。

参考文献

- 1) Nagai K, Mizukami Y, Omori Y, et al. Metachronous intraductal papillary mucinous neoplasms disseminate via the pancreatic duct following resection. *Mod Pathol* 2020; 33: 971-980.
- 2) 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* 2019.
- 3) 今井浩二、唐崎秀則、山本寛大ら. 膵頭十二指腸切除後膵瘻重症化予測因子の探索 (術中採取膵液アミラーゼ値は膵瘻リスクを予測できるか). *北海道外科雑誌* 2021; 66: 9-13.