

遺伝子変異解析から導いた膵管内乳頭粘液性癌に対
する個別化治療の開発

兵庫医科大学

廣野 誠子

【研究目的】

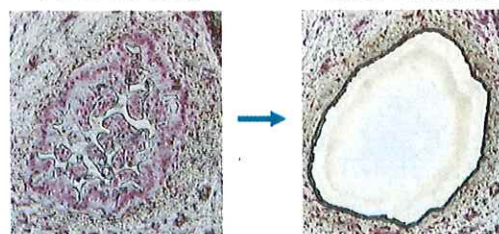
膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN) は、膵管から発生する粘液を産生する腫瘍で、罹患率は増加しており、low-grade dysplasia (LGD), high-grade dysplasia (HGD)を経て浸潤癌 (IPMN 由来浸潤癌) へと至る多段階発癌である。IPMN 由来浸潤癌は、通常型膵癌と比べ分子生物学的・臨床学的に全く異なる特性をもつことが明らかになり (*Gastroenterology* 2022, *Ann Surg* 2024)、根治可能な唯一の治療は外科的切除のみであるが、日本膵臓学会プロジェクト研究で集積した 1,183 例の IPMN 由来浸潤癌切除症例の 41%に術後再発を認めた。すなわち、IPMN 由来浸潤癌は根治術を行っても術後再発を生じ得、その原因として体内の minimal residual disease や cancer stem cell の存在によるものと考えられる。しかしながら、IPMN 由来浸潤癌に対する切除後補助療法の有用性や再発病変に対する治療薬に関するエビデンスはなく予後不良である。本研究では、IPMN 由来浸潤癌の原発巣と再発組織の遺伝子変異解析ならびに血液 circulating cell-free tumor DNA (ctDNA)変異解析のモニタリングにより、IPMN 由来浸潤癌に対する切除後再発の早期診断と新規治療の標的になり得る各再発パターンに特異的な遺伝子変異を同定することを第一の目的とする。さらに、IPMN 由来浸潤癌の原発・再発病変から採取した組織から癌オルガノイドを樹立し、gemcitabine や 5FU に加え、個別の遺伝子プロファイルから同定した治療標的候補分子に対する特異的阻害薬の効果を評価することを第二の目的とする。本研究が遂行できれば、IPMN 由来浸潤癌患者の precision medicine に沿った治療の提供、さらには長期生存に貢献できる可能性がある。

【研究方法と結果】

1) IPMN 由来浸潤癌症例からの血液と原発・再発組織のサンプル収集

IPMN 由来浸潤癌症例を対象とし、手術前、術後 4 週目、手術後 3 ヶ月毎に腫瘍マーカーの測定と造影 CT による評価に加え、再発所見を認めるまで ctDNA 変異解析用の血液を採取する。切除標本における浸潤癌部位をマイクロダイセクションにより採取、術後再発時に再発部位の組織を採取する (図 1)。

図1. マイクロダイセクションによるIPMN由来浸潤癌の浸潤癌細胞収集
マイクロダイセクション前



2025 年 1 月～2026 年 3 月までに IPMN 由来浸潤癌 6 例を切除し、うち 3 例に対して摘出標本から癌部のマイクロダイセクションを施行、DNA を抽出した。

2) 血液サンプルから cell-free DNA (cfDNA)抽出と組織から DNA 抽出

血液サンプルを遠心し、分離した血漿から AVENIO cfDNA Isolation Kit を用いて cfDNA を抽出し、Qubit Assay による cfDNA の定量と Agilent Bioanalyzer による cfDNA の quality の確認を行う。マイクロダイセクションした浸潤癌組織から QIAmp DNA FFPE Tissue Kit を用いて DNA を抽出する。超高感度な ctDNA 定量法として開発された Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq)による ctDNA 変異解析に使用するまで -80°C の超低温フリーザーに保管する。

切除 IPMN 由来浸潤癌 6 例のうち 5 例に対して手術前、術後 4 週目の血液 DNA 抽出、3 例に対して術後 3 ヶ月目、1 例に対して術後 6 ヶ月目の血液 DNA を抽出した。

3) CAPP-Seq による ctDNA 変異頻度の定量化

ctDNA Library Prep Kit を用いて IPMN 由来浸潤癌患者の ctDNA に adaptor を ligation し、PCR にて増幅した後、ctDNA Surveillance Panel を用いて標的領域を hybridization し、DNA 断片を回収する(target enrichment)。回収した DNA 断片の配列を NextSeq Sequencer でシーケンスし、標的領域の ctDNA 変異頻度を定量化する。原発・再発組織の DNA も CAPP-Seq により網羅的 DNA 変異解析を行う。

切除 IPMN 由来浸潤癌 6 例のうち 3 例に対して、手術前、術後 4 週目、術後 3 ヶ月目の血液 DNA を CAPP-Seq により ctDNA の定量化を行った。3 例のうち 1 例で、術前には血液 DNA mutation を認めなかったが、術後 4 週目の血液 DNA において TP53 の mutation を認め、術後 3 ヶ月目に KRAS mutation を認め、本症例はその後 CT にて肝転移再発を認めた。

したがって、IPMN 由来浸潤癌において、術後 ctDNA をモニタリングすることで、術後再発を早期に予測できることがわかった。

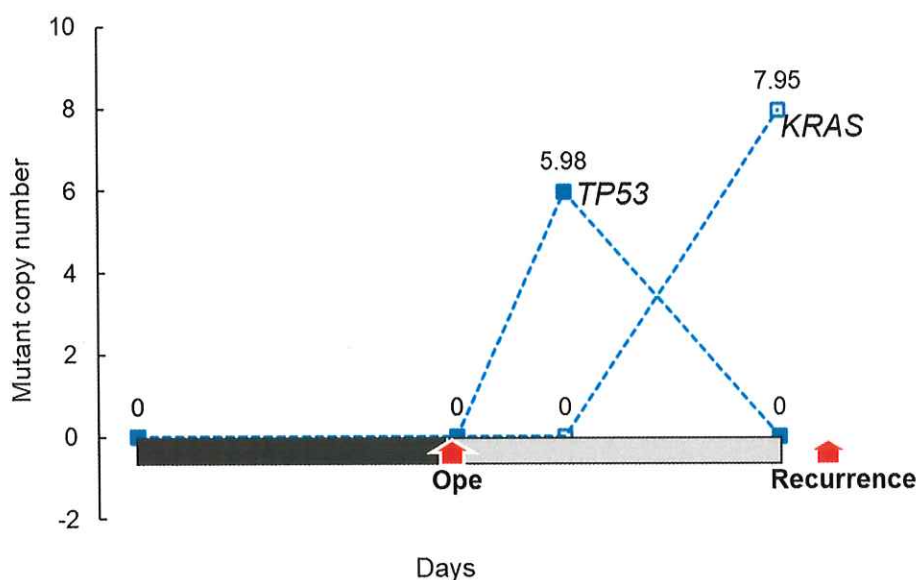


図2. 画像上の再発前にCAPP-SeqによるctDNA変異の同定

4) 組織を用いた患者由来癌オルガノイドの樹立

採取した組織片を細切し、2U/ml dispase II・1mg/ml collagen ase P および Accumax による酵素処理を行い、PBS で洗浄後、無血清培地(L-glutamine solution, penicillin/streptomycin, amphotericin B suspension, 50 ng/ml human EGF, 250 ng/ml R-spondin 1, 100ng/ml Noggin, 10 μ M U27632, 1 μ M Jagged-1)に懸濁、その細胞懸濁液を用いてマトリゲルによるオルガノイド培養を行う。

IPMN 由来浸潤癌 1 例の原発組織を用いてオルガノイドを作成中で、樹立できた時点で網羅的遺伝子解析を速やかに行う予定である。

【考察】

本研究開始から現在まで、IPMN 由来浸潤癌症例 6 例の外科的切除を行った。それら摘出標本からマイクロダイセクションを行った組織の網羅的遺伝子変異解析、ならびに血液 ctDNA のモニタリングを施行中である。切除症例 6 例のうち 1 例に対して、血液 ctDNA 変異解析のモニタリングにより、術後再発を画像ならびに血清 CA19-9 の測定に先行し予測可能であることがわかった。今後は、さらに 4 例の外科切除症例を追加し、切除組織と再発組織の網羅的遺伝子変異解析と血液 ctDNA 解析のモニタリングを行い、IPMN 由来浸潤癌の個別化治療の開発を進める。また、オルガノイドを樹立することで、IPMN 由来浸潤癌に対する術後補助療法ならびに再発治療としての gemcitabine と 5FU の有用性について検討する予定である。