

デジタル PCR による遺伝子変異検出を用いた膵癌手術患者の高感度腹腔洗浄液診断法

名古屋大学医学部附属病院

消化器外科二 病院助教 末永雅也

1. 研究の背景・目的

膵癌は最も予後不良な固形癌で、膵癌と診断された患者の5年生存率は5%に満たない。膵癌に対して唯一根治が望める治療は外科的切除であるが、手術の適応となる膵癌患者は全体のわずか20%程度である。また、手術だけでは本疾患の根治や治療成績の向上はもはや不可能であり、集学的治療の確立が不可欠である。

腹膜播種は初回再発形式として30%を占め、腹膜播種に対する診断、治療の開発は膵癌の予後改善に必須である(1)。腹膜播種に至る前段階と考えられる微細な膵癌細胞を検出する方法として術中の腹腔洗浄細胞診があるが、胃癌や卵巣癌と異なり、腹腔洗浄細胞診が明確な予後規定因子となるかは議論があり(2)、それを反映して本法の膵癌取り扱い規約では腹腔洗浄細胞診陽性はStageIVの条件とはならない。さらに我々は、腹腔細胞診陽性は必ずしも手術の非適応因子とは言えないことを報告した(3)。

これらの研究結果は、腹腔洗浄細胞診だけでは①腹膜播種に至るまでの正確な予測因子とならない、②手術や追加の化学療法の実施の必要性の有無を決める層別化因子とならない、ことを示しており、より鋭敏なバイオマーカーの開発が求められる。本研究では高感度に腫瘍由来の遺伝子変異の検出が可能なデジタルPCRを用いて腹腔洗浄液中の遺伝子変異を検出することで(4-6)、新規バイオマーカーの開発を試みた。

2. 研究の対象ならびに方法

デジタルPCRを用いて*KRAS*遺伝子変異を測定することで膵癌由来の遺伝子変異を検出した。検出精度は膵癌細胞株から抽出した変異型と野生型のDNAを用いて検討した。対象は2012年から2014年までに当教室で手術を施行した膵癌患者のうち検体が得られた61例で、術中に採取した腹腔洗浄液からDNAを抽出した。デジタルPCRを用いて*KRAS*遺伝子のhot spot mutationを検出し、腹腔洗浄中の*KRAS*変異結果と臨床病理学的因子とを比較検討した。

3. 研究結果

(1) 細胞株由来の DNA を用いた検討では、デジタル PCR における本研究は概ね 0.02% までの低濃度の遺伝子変異の検出が可能であり、繰り返し施行した野生型 DNA における検討では、5% (1/20 回) で 1 drop の false positive が検出された。以上より、本研究では 1 drop の遺伝子変異検出は false positive と定義した。

(2) 膣癌手術患者 61 例のうち試験開腹となった 7 例中の 5 例 (71%) で *KRAS* 変異陽性であり、うち 4 例は腹腔洗浄細胞診陽性もしくは組織学的に腹膜播種と診断された。根治切除術を施行した 54 例の検討では、26 例 (48%) で *KRAS* 変異を認め、腹腔洗浄細胞診が陽性であった 4 例 (7%) では全例で変異を認めた。ROC 解析で至適 cut-off を定めると、腹腔洗浄液中の *KRAS* 変異の Allele Frequency (AF) 高値群は無再発生存期間 ($P=0.001$)、全生存期間 ($P=0.001$) 共に有意に予後不良であり (図 1)、再発に対する多変量解析では独立した予後不良因子であった (HR 4.00、95%CI 1.5-11.8、 $P=0.006$)。再発形式の検討では、AF 高値群では低値群に比べ腹膜播種再発を高率に認め、1/3 の症例で腹膜播種をきたしていた (33% vs 9%、 $P=0.025$ 、図 2)。

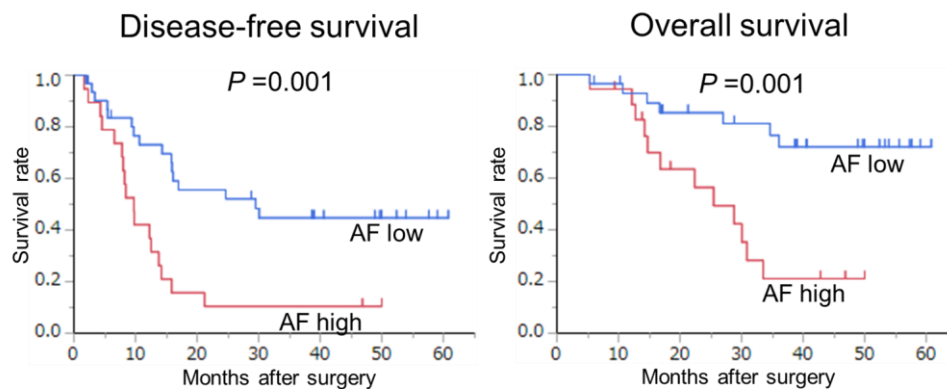


図1. 腹腔洗浄液中*KRAS*変異Allele Frequency (AF) と予後

4. 考察

本研究では、腹腔洗浄細胞診陽性患者はわずか 7% であったのに対し、腹腔洗浄液中 *KRAS* 遺伝子変異陽性患者は 48% と高率であった。再発形式の検討では、観察期間中央値は 25 か月と短いにも関わらず、*KRAS* 遺伝子変異陽性患者の 1/3 で腹膜播種再発をきた

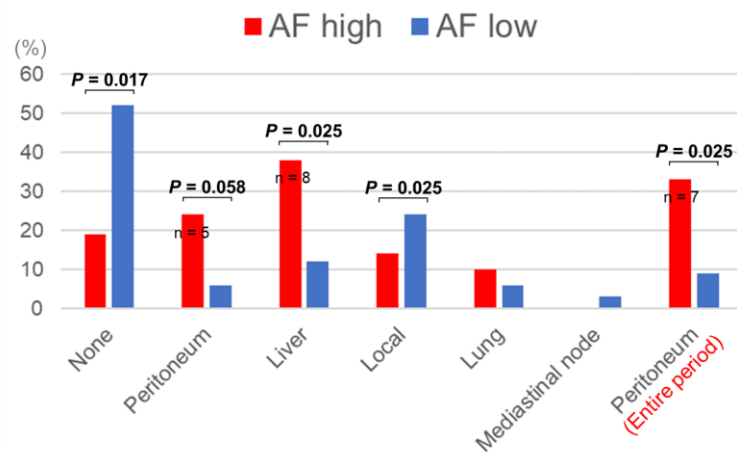


図2. 腹腔洗浄液中*KRAS*遺伝子変異Allele Frequency (AF) と再発形式

していることから、デジタル PCR で同定した腹腔洗浄液中の *KRAS* 遺伝子変異は腫瘍由来であると考えられる。また、*KRAS* 遺伝子変異の AF に対する適切な cut-off を定めると、腹腔洗浄液中 *KRAS* 遺伝子変異は独立した予後予測因子であった。なお、腹腔洗浄細胞診が陽性であった 4 例は予後不良であったが、多変量解析では有意な予後因子とはならなかった。これは、近年の術前画像診断の精度の向上により、術中の腹腔洗浄細胞診で陽性となる患者が少なかったためと考えられる。近年の診断精度の向上や術前、術後の補助療法の発展により、膵癌の根治切除患者における腹腔洗浄細胞診の予後予測マーカーとして意義は変化していくものと考えられる。本研究の腹腔洗浄液中 *KRAS* 遺伝子変異測定は定量性があることから、患者背景に応じて適切な cut-off を設定することで、腹膜播種や予後の予測マーカーとして普遍的に応用可能であり、症例数を増やして検証していく意義があると考えられた。腹腔洗浄液を用いた細胞診以外のバイオマーカーの報告は少数を認めるのみである (7, 8)。腹腔洗浄液は術中に容易かつ非侵襲的に採取可能であることから、腹腔洗浄液を用いたバイオマーカー開発は有望である。

5. 文献

1. Suenaga M, Fujii T, Kanda M, Takami H, Okumura N, Inokawa Y, Kobayashi D, Tanaka C, Yamada S, Sugimoto H, Nomoto S, Fujiwara M, Kodera Y: Pattern of first recurrent lesions in pancreatic cancer: hepatic relapse is associated with dismal prognosis and portal vein invasion. *Hepatogastroenterology*. 61(134):1756-61, 2014
2. Yamada S, Takeda S, Fujii T, Nomoto S, Kanazumi N, Sugimoto H, Kasuya H, Kodera Y, Nagasaka T, Morita S, Nakao A: Clinical implications of peritoneal cytology in potentially resectable pancreatic cancer: positive peritoneal cytology may not confer an adverse prognosis. *Ann Surg*. 246(2):254-8, 2007
3. Yamada S, Fujii T, Kanda M, Sugimoto H, Nomoto S, Takeda S, Nakao A, Kodera Y: Value of peritoneal cytology in potentially resectable pancreatic cancer. *Br J Surg*. 100(13):1791-6, 2013
4. Yu J, Sadakari Y, Shindo K, Suenaga M, Brant A, Almario JAN, Borges M, Barkley T, Fesharakizadeh S, Ford M, Hruban RH, Shin EJ, Lennon AM, Canto MI, Goggins M: Digital next-generation sequencing identifies low-abundance mutations in pancreatic juice samples collected from the duodenum of patients with pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Gut*. 66(9):1677-1687, 2017
5. Suenaga M, Sadakari Y, Almario JA, Borges M, Lennon AM, Shin EJ, Canto MI, Goggins

- M: Using an endoscopic distal cap to collect pancreatic fluid from the ampulla (with video). *Gastrointest Endosc.* 86(6):1152-1156, 2017
6. Suenaga M, Dudley B, Karloski E, Borges M, Irene Canto M, Brand RE, Goggins M. The Effect of Pancreatic Juice Collection Time on the Detection of KRAS Mutations. *Pancreas.* 47(1):35-39, 2018
7. Krimmel JD, Schmitt MW, Harrell MI, Agnew KJ, Kennedy SR, Emond MJ, Loeb LA, Swisher EM, Risques RA: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(21):6005-10, 2016
8. Yokoi A, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ishikawa M, Ikeda SI, Kato T, Kiyono T, Takeshita F, Kajiyama H, Kikkawa F, Ochiya T: Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun.* 8:14470, 2017