



Title	膵嚢胞性腫瘍関連膵癌の発生機構の多様性に関する分子病理学的解析 [全文の要約]
Author(s)	大森, 優子
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12988号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70392
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2367
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Yuko_Omori_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文 (要 約)

膵嚢胞性腫瘍関連膵癌の発生機構の
多様性に関する分子病理学的解析

(A revised model of clonal evolution of
intraductal papillary mucinous neoplasm-
related pancreatic carcinogenesis)

2018年3月

北海道大学

大森 優子

【背景と目的】膵癌は最も予後不良な固形癌の一つであり、早期膵癌の発見は未だ困難である。膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN) は、豊富な粘液産生と膵管内乳頭状増殖を特徴とする腫瘍で、膵癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA) の前駆病変の一つとされる。IPMN 関連膵癌は、高異型度 IPMN が浸潤癌へ進展する由来浸潤癌と膵野の field defect を背景とした膵管内上皮性腫瘍 (pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN) を母地に発生する併存癌に大別される。PanIN と IPMN の発生には *KRAS* 変異が、また IPMN 特異的な遺伝子異常として *GNAS* 変異が関与することが報告されている。IPMN の悪性化においては通常型膵管癌と同様に *CDKN2A/p16*, *SMAD4*, *TP53* などの遺伝子の関与が報告されているが、その詳細な発癌機序や進展様式、生物学的表現形の差異は十分に解析されていない。腫瘍発生に関与する *KRAS*, *GNAS* 変異バリエーションからクローナリティー分析が、また、遺伝子異常の蓄積パターンによる悪性化の時間軸の再現が可能と考え、それら分子病理学的アプローチと、組織学的に評価される IPMN と PDA の相互位置関係や、背景膵の微小膵管病変の分布の関連付けによる、IPMN 関連膵癌の発生進展ルートの層別化を試みた。

【対象と方法】IPMN 関連膵癌 30 症例 33 病変の全割標本において、全ての IPMN と PDA、背景膵における顕微鏡的膵管内腫瘍性病変 (microscopic neoplastic lesion, MNL) を詳細にマッピングし、各関心病変から個別に DNA を抽出し、*KRAS*, *CDKN2A/p16*, *SMAD4*, *TP53*, *GNAS* を含む、膵癌と IPMN に関連する代表的な 18 遺伝子を網羅するように設計したカスタム遺伝子パネルによる標的アンプリコンシーケンスを行った (Thermo Fisher Scientific 社製の次世代シーケンサー Ion Torrent PGM システムを使用)。免疫組織化学的に p53 を始めとする 5 つの癌抑制遺伝子の蛋白発現異常を検討した。明らかな IPMN の画像所見を呈し、follow-up の対象となっていた IPMN もしくは PDA に最も近接した IPMN を co-existing IPMN と定義した。

【結果】IPMN 患者における膵癌発生経路は 3 つの molecular subtype に分類された。一つ目は、IPMN がその分子異常を引き継ぎながら多段階的に浸潤癌へ進展する、“sequential subtype” である。Sequential subtype 全例に IPMN から浸潤癌への組織学的移行像が確認され、従来の IPMN 由来浸潤癌群に合致した。低異型度 IPMN から高異型度 IPMN、浸潤癌において、同一の *KRAS*, *GNAS* プロファイルを有し、高異型度 IPMN の段階もしくは浸潤の過程で、*CDKN2A/p16*, *SMAD4*, *TP53* 異常の蓄積が見られた。Sequential subtype PDA の発生に至った co-existing IPMN の分子病理学的特徴は、腸型・胆膵型の頻度と *KRAS* 野生型の頻度、*SMAD4* 変異および p53 過剰発現の頻度が高かった。

また、従来の併存膵癌とされた IPMN と浸潤癌に組織学的移行像を有さない群は、遺伝学的に 2 つの molecular subtype に分類された。IPMN と PDA が異なる *KRAS* 変異を有し、初期クローンの発生段階から別個の腫瘍であると確定できる“*de novo subtype*”と、IPMN と PDA で共通の *KRAS* 変異を有し、位置的に有意に近接して発生する、初期クローンを共有した母地からある段階で 2 つの異なる表現形の腫瘍発生経路に分岐したことが示唆される“branch-off subtype”である。Branch-off subtype 群の 3 例では組織学的に IPMN と PDA の間をつなぐ主膵管内に低異型度腫瘍性上皮が連続していることが確認された。同一の膵管内腫瘍から双方向に分岐したことを支持する組織学的所見と考え、臨床的な隣接併存膵癌の主たる発生経路と考えられた。

Branch-off subtype では癌化に関連する分子経路異常の蓄積は、*de novo subtype* と同等にも関わらず、*de novo subtype* に比較して、病期によらず、有意に無再発生存期間が長かった。また sequential subtype と比較しても長い傾向が見られた。全生存率に差は見られなかった。

背景膵に分布する MNL の検討では、sequential subtype の背景膵には *KRAS* 変異と *GNAS* 変異率が高値であり、co-existing IPMN と同様の *KRAS/GNAS* 変異プロファイルを有する傾向があった。*De novo subtype* および branch-off subtype が発生した背景膵に

は、多数のMNLが認められ、*KRAS*変異に見る初期クローンの多様性が示された。腫瘍内の*KRAS*アレル変異頻度はMNLから低異型度IPMN、さらに高異型度IPMNの3段階で、有意に増加することが示された。

【考察】IPMN患者の膵臓では腫瘍性クローンの同時性・多中心発生が生じており、その一部に*GNAS*および*CDKN2A/p16*、*SMAD4*、*TP53*異常が蓄積されることにより、IPMNの発生・進展、および由来癌もしくは併存癌の発生に至ると考えられる。IPMN患者の悪性化リスクの層別化アルゴリズムの構築には、画像的な評価対象となるco-existing IPMNの組織学的・分子病理学的評価と共に、膵全体の背景因子を併せて評価することが重要である。Sequential subtype PDA発生の高リスク群の同定には、膵液細胞診・組織診における免疫組織化学的な上皮型の判定や*SMAD4*、*p53*蛋白発現の評価、膵液や血液を用いた遺伝子解析（液体生検）の有用性が示唆された。

De novo subtype と branch-off subtype では多様なクローンの腫瘍化が同時性に生じており、併存膵癌が発生しやすいIPMN患者の膵臓の特徴の一つと考えられる。IPMN患者の追跡観察中には、画像的精査とともにEUS-FNAなどによる組織採取がIPMNの異型度評価や癌の確定診断に推奨されるが、採取された細胞・組織からの形態学的評価や遺伝学的検索はある局所の病変の情報を得ているのみであり、膵臓全体における多中心性発生の評価には直結しない。膵液や血液を用いた液体生検における核酸解析は、膵全体からの情報を反映する可能性が高く、低侵襲であることから、併存膵癌発生を予測するのにも有用な手法となり得る。*KRAS*変異および*GNAS*変異の検討には、その変異バリエーションの多様性を含めた質的評価および量的評価が、発癌リスク予測につながると考えられた。

また、IPMN由来癌および併存膵癌はIPMN非関連の通常型膵管癌よりも予後良好と報告され、それは主に早期に発見されるためと考察されてきた。しかし、本研究では病期によらず、3群の中ではbranch-off subtypeの無再発生存期間が長かったことから、本subtypeではエピジェネティックな機構を含めた腫瘍の悪性度を抑制するようなメカニズムの存在が示唆された。但し、本研究では各10例での検討であることから、molecular subtypeと生存予後の関連については、症例を積み重ねての検討が必要と考えられた。

本研究では、病変間の分子プロファイルの相違性と相互位置関係に着目し、molecular subtype分類を提唱した。詳細な腫瘍の位置関係・形態像の分析から特にbranch-off subtypeの独自性に注目される。異なる*KRAS*変異は異なるクローンを表すことに異論ないと考えるが、膵腫瘍における*KRAS*変異の多くはhot spot変異であるコドン12の変異（G12D、G12V、G12R）であることから、同一の変異のみでは同一のクローンとの判断には至らない。変異バリエーションの偶然の一致の可能性をどのように論理的に除外できるかが、本研究が解決しなければならない最大の課題である。*KRAS*変異以外に共通した初期の遺伝子異常を取得するため、全エクソームシーケンスとメチレーション解析を行い、初期クローン共通性の裏付けを行っていく。またbranch-off subtype発生の背景に存在する特異な腫瘍化メカニズムの探索を行いたい。

【結論】IPMN関連膵癌の切除材料における腫瘍形態・位置情報と遺伝子異常を連結し、IPMN関連膵癌のspatio-temporal landscapeを描き、詳細な病理組織学的検討に基づいた分子病理学的アプローチにより、IPMNに関連した癌化経路の多様性と、その特徴を明らかにした。IPMN関連膵癌には、IPMNの遺伝子異常を継承するsequential subtype、独立したクローンから発生する*de novo* subtypeに加え、共通クローンからIPMNと浸潤癌が異なる遺伝子異常を獲得し分岐するbranch-off subtype経路が存在すると考えられる。本molecular subtype分類は、IPMN患者の追跡観察において、膵液や血液（液体生検）を用いた分子病理学的アプローチによる膵癌早期発見・発癌リスク予測のアルゴリズム構築の基盤的知見となる。