HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	画像診断の不確実性を補完する末梢血 cell-free DNA による脈管奇形の遺伝子診断に関する研究
Author(s)	三田村, 真太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第17033号
Issue Date	2026-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k17033
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100086
Type	doctoral thesis
File Information	MITAMURA_Shintaro_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　三田村　真太郎

学 位 論 文 題 名

画像診断の不確実性を補完する末梢血 cell-free DNA による脈管奇形の遺伝子診断に関する研究
（A study on genetic diagnosis of vascular malformations using peripheral blood cell-free DNA as an adjunct to imaging-based diagnosis）

【背景と目的】脈管奇形は、胎生期の血管・リンパ管系の形成に関する先天性異常から生じ、皮膚、皮下組織、筋、骨に至るまで多様な部位に病変を形成する。International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) 分類に基づく病型診断（arteriovenous malformation: AVM、capillary malformation: CM、lymphatic malformation: LM、*PIK3CA*-related overgrowth spectrum: PROS、venous malformation: VM など）は治療選択に直結するが、実際の診療では超音波検査（ultrasound, US）、磁気共鳴画像（magnetic resonance, MR）を中心とした画像診断に依存し、出血リスクなどから病理組織学的診断は必ずしも行われない。また、脈管奇形の各病型は互いに重複する表現型をもち、非血管性腫瘍や嚢胞性病変とも混同し得る。時にそれは悪性疾患であり、診断の遅れが治療開始を遅らせ患者の予後に関わりうるが、脈管奇形の診断の困難さがその稀な頻度のため十分に認識されているとは言い難い。加えて、鎮静下 MR や血管造影など侵襲的検査を要することがあり、確実かつ低侵襲な診断補助の整備が望まれる。近年、脈管奇形の分子病態として rat sarcoma (RAS)/mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路や phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mechanistic target of rapamycin (mTOR) 経路に関わる遺伝子の体細胞モザイクが明らかとなり、客観的補助診断として遺伝子診断の重要性が高まっている。一方、体細胞モザイクは末梢血中のバリアントアレル頻度（variant allele frequency, VAF）が極めて低い領域に分布し得るため、高感度検出系の整備が課題である。本研究は、(1) 画像診断における不確実性を体系化し、(2) 末梢血 cell-free deoxyribonucleic acid (cfDNA) を用いたリキッドバイオプシーと ultra-deep targeted next-generation sequencing (NGS) による遺伝子診断の実現性を検討することを目的とした。

【対象と方法】第 1 章では、2008 年 7 月～ 2023 年 9 月に斗南病院形成外科で「脈管奇形の術前診断」で切除された症例を後ろ向きに検索し（536 名 759 病変）、術後に非血管性腫瘍と病理診断された 14 症例を抽出した。診療録を用いて、画像所見、術前診断、最終病理診断、診断変更までの期間などの情報を収集し、臨床診断と病理診断が不一致となった背景と診断再検討を要する臨床状況を整理した。第 2 章では、北海道大学病院および斗南病院で前向きに登録した脈管奇形 40 例（AVM 11 例、PROS 9 例、VM 20 例）を対象とし、末梢血から cfDNA を抽出した。Unique molecular identifier（UMI）によるエラー補正を備えた ultra-deep targeted NGS（*BRAF*、*KRAS*、*MAP2K1*、*PIK3CA*、*TEK* の頻出変異領域をターゲットとするカスタムパネル）

を実施し、Ion Reporter でバリアント同定を行った。陽性・陰性対照を併用し、偽陽性抑制と超低 VAF 領域の検出可能性を検証した。

【結果】第 1 章では、臨床診断と病理診断が不一致であった 14 症例の最終病理診断は神経鞘腫 6 例、表皮嚢腫 2 例、血管平滑筋腫 2 例、軟部血管線維腫 1 例、外傷性神経腫 1 例であり、骨外性粘液性軟骨肉腫（悪性）1 例および孤立性線維性腫瘍（中間悪性）1 例を含んだ。初診時診断から最終診断までの期間は平均 370±539 日（範囲 14–1893 日）で、臨床診断の過誤の長期化が患者負担を増大させ得た。硬化療法などの不適切な治療は治療無効に留まらず、炎症・癒着により後続の切除難易度を上昇させ、周囲組織の拡大切除を余儀なくした。第 2 章では、アンプリコン平均カバレッジ 104,000×（範囲 28,000–153,000×）を達成し、40 例中 23 例（57.5%）で計 44 バリアントを検出した。VAF は中央値 0.11%（範囲 0.05%–1.88%）で、0.1%未満が38.6%（17/44）を占めた。疾患群別の陽性例は、AVM 11 例中 6 例（10 バリアント）、PROS 9 例中 7 例（15 バリアント）、VM 20 例中 10 例（19 バリアント）であった。AVM では *BRAF* p.V600E や *KRAS* p.G12D など既知ホットスポットに加え、*TEK*、*PIK3CA*、*MAP2K1* の併存例を認めた。PROS では *PIK3CA* ホットスポット（p.E542K、p.E545K、p.Q546R）を複数例で同定し、新規バリアント候補（フレームシフトバリアント/終止バリアント）も含まれた。VM では *TEK* バリアントが多く、頻出部位に加えて新規候補を含み、*TEK* 二重バリアントや他遺伝子バリアントの併存を認めた。PROS の一部症例では、病変組織の formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) 検体で既報のバリアントと同一のバリアントが末梢血 cfDNA から検出された。未検出例（17/40）および単一症例で複数バリアントが検出され、臨床解釈の整理が必要であった。

【考察】画像診断は低侵襲で反復可能な一次評価として有用である一方、脈管奇形における診断の困難性により不一致が生じ得るため、非典型所見（充実性成分、圧迫で変形しない、など）や治療反応不良、短期間の増大などを契機に診断を再検討する枠組みが重要である。分子診断の観点では、末梢血 cfDNA を用いた ultra-deep targeted NGS により、超低 VAF 領域の体細胞モザイクに対してもバリアント同定が可能であり、組織採取が困難な症例の補助診断として有用性が高い。一方、AVM では cfDNA が循環血中で希釈され検出量が少ない可能性も報告されており、未検出例の解釈を含めた検査戦略の最適化が課題である。また、既知バリアントに絞る droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) と、スペクトラムの広いバリアント探索に強い targeted NGS は補完関係にあり、目的に応じた使い分けが求められる。

【結論】第 1 章で脈管奇形の画像診断における診断の不確実性および治療方針の不適合リスクと再評価の契機を整理し、第 2 章で末梢血 cfDNA を用いた ultra-deep targeted NGS により超低 VAF バリアントの検出が可能なことを示した。画像診断と分子診断の相補的な運用は、低侵襲かつ高精度な診断の実現につながる可能性がある。