



Title	腭充実性偽乳頭腫瘍における超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体と次世代シーケンサーを用いたCTNNB1遺伝子変異解析に関する研究
Author(s)	久保田, 良政
Description	配架番号 : 2205
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12101号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12101
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61582
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshimasa_Kubota.pdf



学 位 論 文

膵充実性偽乳頭腫瘍における超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体
と次世代シーケンサーを用いた **CTNNB1** 遺伝子変異解析に関
する研究

(CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary
neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided
fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

久 保 田 良 政

学 位 論 文

膵充実性偽乳頭腫瘍における超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体
と次世代シーケンサーを用いた CTNNB1 遺伝子変異解析に関
する研究

(CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary
neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided
fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

久 保 田 良 政

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	14 頁
考察	20 頁
総括	22 頁
謝辞	23 頁
引用文献	24 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した

1. Yoshimasa Kubota, Hiroshi Kawakami, Mitsuteru Natsuizaka, Kazumichi Kawakubo, Katsuji Marukawa, Taiki Kudo, Yoko Abe, Kimitoshi Kubo, Masaki Kuwatani, Yutaka Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Yoshihiro Matsuno, Naoya Sakamoto
CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing.
Journal of Gastroenterology 50, 203-210 (2015)

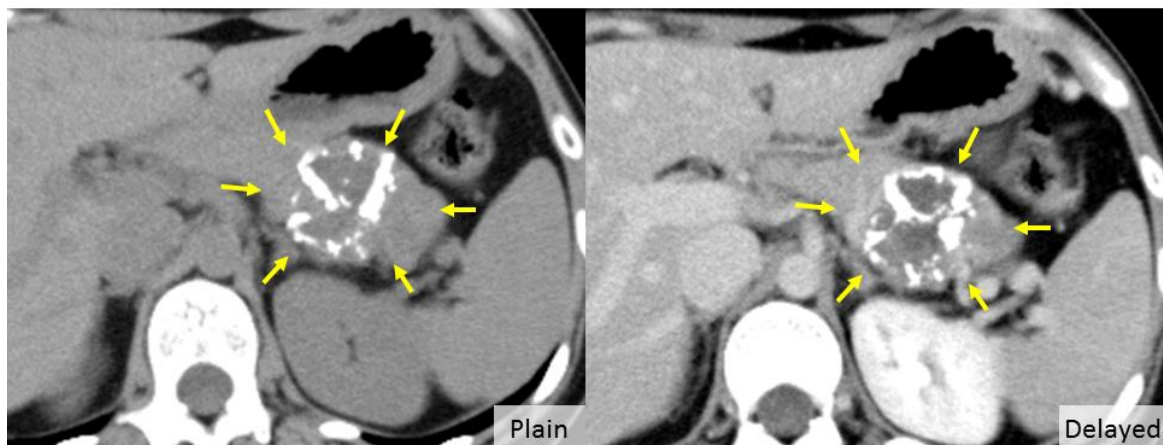
本研究の一部は以下の学会に発表した

1. Yoshimasa Kubota, Hiroshi Kawakami, Mitsuteru Natsuizaka, Kazumichi Kawakubo, Katsuji Marukawa, Taiki Kudo, Yoko Abe, Kimitoshi Kubo, Masaki Kuwatani, Yutaka Hatanaka, Tomoko Mitsuhashi, Yoshihiro Matsuno, Naoya Sakamoto
CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing
Digestive Disease Week 2014
2014/5/3~5/6 Chicago, Illinois, USA
2. Yoshimasa Kubota, Hiroshi Kawakami, Naoya Sakamoto
CTNNB1 mutation analysis in solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas using EUS-FNA and next-generation sequencing
第 87 回日本消化器内視鏡学会総会
2014 年 5 月 15 日~5 月 17 日 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡 (福岡市)

緒 言

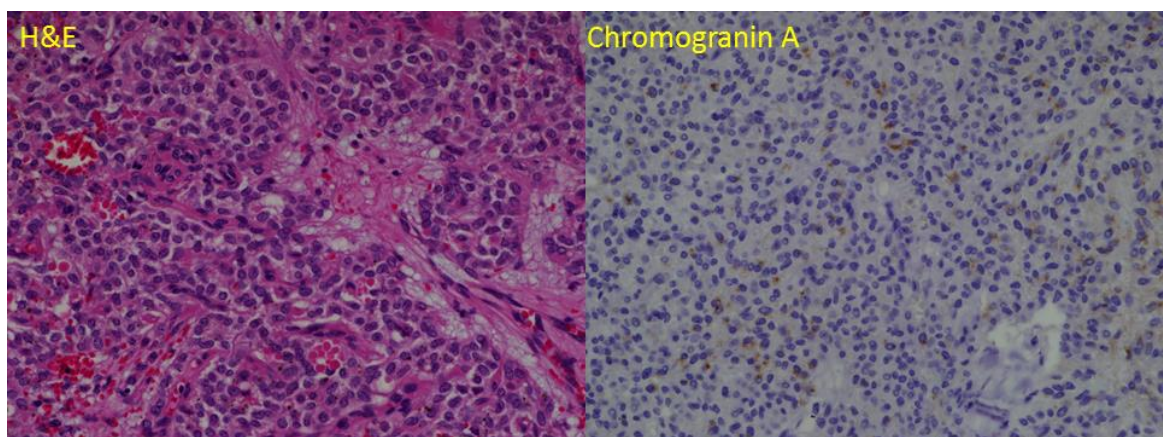
膵充実性偽乳頭腫瘍（SPN; solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas）は Franz により最初に報告された (1)。膵腫瘍のうち 0.2-2.7%を占める稀な腫瘍であり、若年の女性に好発する。WHO2010 分類では、SPN は“低悪性度腫瘍”に位置付けられる (2)。約 15%に転移を認めるが、外科的切除により予後は良好で5年生存率は95%以上である (3,4,5)。典型的には石灰化を有し、充実成分と嚢胞成分からなる腫瘍である。組織学的には結合性の弱い monomorphic な上皮細胞が、充実性および線維血管軸を中心とした偽乳頭状構造を形成する (2)。免疫組織化学的には β -catenin に対する染色性が特徴的であり、正常細胞では細胞膜が染まるのに対し、腫瘍細胞は細胞質や核が濃染される (6)。その他の陽性マーカーとして vimentin、CD10 などが知られている (7)。

<SPN の典型像>

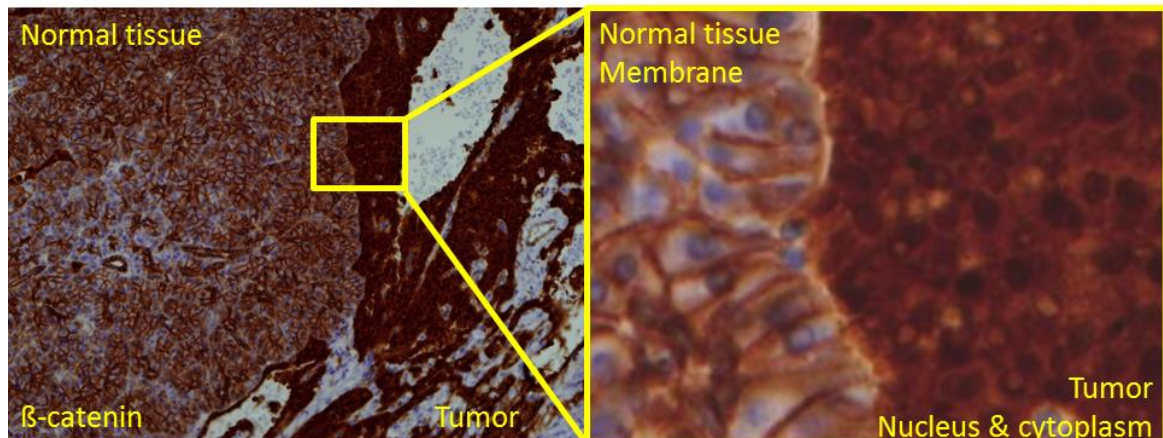


石灰化を有し、充実充実成分と嚢胞成分からなる腫瘍

<SPN の病理像（H&E、免疫組織化学）>



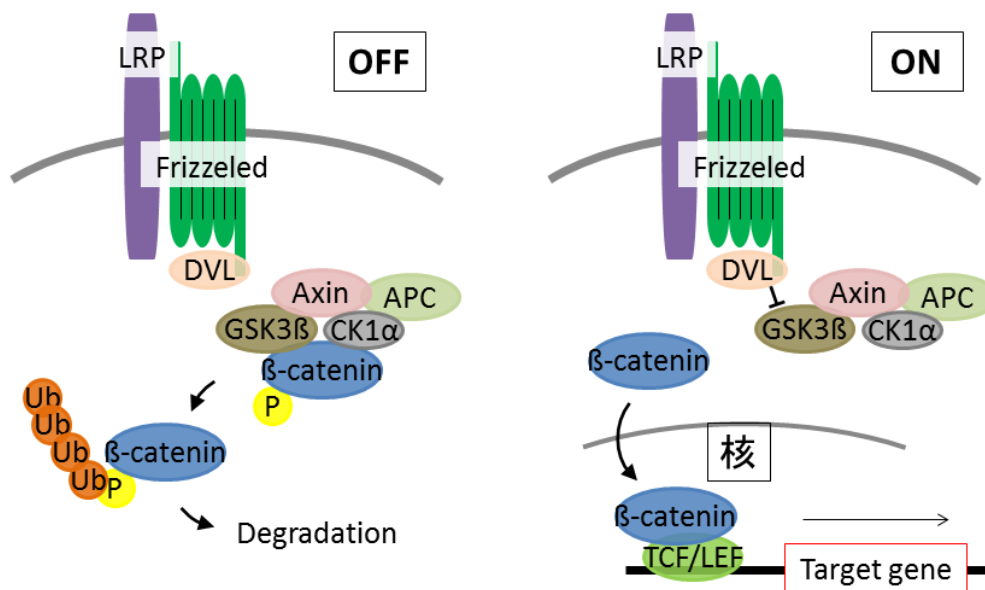
<SPN の病理像 (β-catenin 染色) >



β-catenin は生体内において 2 つの役割を持つ。cadherin を介した細胞接着因子の 1 つとしての働きと、Wnt シグナル伝達経路における転写制御因子としての働きである。β-catenin は Wnt が受容体に作用していない状態では、Axin、GSK-3β、CK I α からの複合体によりリン酸化を受け、さらにユビキチン化を受けて、プロテアソームにより分解される。一方、Wnt が受容体と結合すると、β-catenin のリン酸化は抑制され、安定化した β-catenin は細胞内に蓄積し、核へ移行して TCF/LEF ファミリーの転写因子と複合体を形成し、標的遺伝子の転写活性化を引き起こす (8,9)。

<Wnt シグナル伝達経路における β-catenin の働き：略図>

Wntシグナル伝達経路におけるβ-catenin

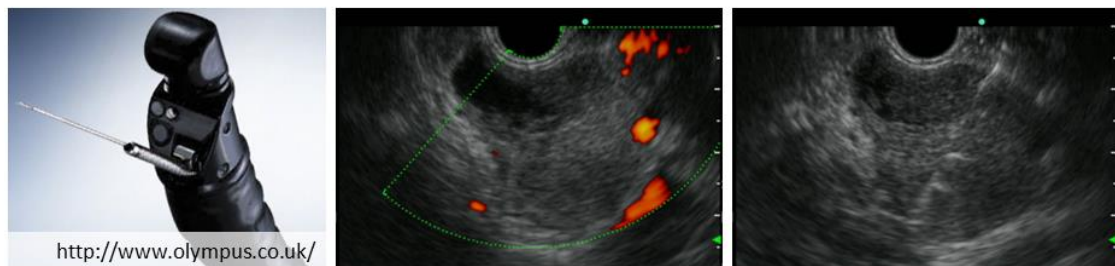


β-catenin 遺伝子である *CTNNB1* の exon3 の変異は結腸 (10)、前立腺 (11)、子宮 (12)、肝臓 (13)、胸腺 (14) といった様々な腫瘍において報告されている。SPN にお

いてはこれまでに手術検体を用いた報告で 83%-100%の頻度で変異を有することが報告されている (15,16,17,18,19,20)。

超音波内視鏡下穿刺吸引生検 (EUS-FNA; endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration) は膵の充実性腫瘍の診断において安全かつ有効な方法である (21)。EUS-FNA による SPN の術前診断の正診率に関しては 75%-100%と報告されている (22,23)。

<EUS-FNA の実際>



Sanger sequencing 以降、過去 10 年くらいの間に開発されてきた新規のシーケンシング技術を総じて次世代シーケンス (NGS; next-generation sequencing) と呼ぶ。NGS の出現により、より短時間・低コスト、かつ少量の検体からのシーケンシング可能となった (24)。これまでに微量検体として、針生検検体を用いた甲状腺 (25)、肺 (26)、膵臓 (26,27)、その他腫瘍 (28)における NGS の有用性に関する報告がある。しかし、これまでに EUS-FNA 検体を用いた NGS の有用性に関する報告は認められなかった。

本研究では、EUS-FNA 検体を用いた NGS による deep sequencing の可能性を調べるために、膵疾患検体における *CTNNB1* の exon3 の変異解析を行った。

略 語 表

ACC : Acinar cell carcinoma
Asn : Asparagine
Asp : Asparatic acid
bp : Base-pair
CgA : Chromogranin A
DNA : Deoxyribonucleic acid
DP : Distal pancreatectomy
DpPHR : Duodenum-preserving pancreas head resection
EUS : Endoscopic ultrasound
EUS-FNA : Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration
G : Gauge
gDNA : Genomic deoxyribonucleic acid
Gly : Glycine
His : Histidine
Ile : Isoleucine
ND : not done
NGS : Next-generation sequencing
PCR : Polymerase chain reaction
PDAC : Pancreatic ductal adenocarcinoma
Phe : Phenylalanine
PNET : Pancreatic neuroendocrine tumor
Ref Cov : Reference coverage
RNA : Ribonucleic acid
rpm : revolutions per minite
Ser : Serine
SPN : Solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas
SpO₂ : Saturation of pulse oximetry oxygen
SSPPD : Subtotal stomach-preserving pancreaticoduodenectomy
TAE : Tris acetate etylenediaminetetraacetic acid
Thr : Threonine
Tyr : Tyrosine
Var Cov : Variant coverage
Var Freq : Variant frequency

実験方法

1. 患者検体

本研究は、北海道大学病院倫理委員会の承認を得て北海道大学病院において 2008 年 12 月から 2013 年 6 月の間に行われた。研究参加への書面による同意が得られた、膵疾患に対して EUS-FNA を施行した 35 症例、35 検体、および外科切除が施行された 3 症例、3 検体を用いて解析を行った。疾患の内訳は SPN が 7 例、膵癌 (PDAC; pancreatic ductal adenocarcinoma) が 16 例、膵神経内分泌腫瘍 (PNET; pancreatic neuroendocrine tumor) が 11 例、膵腺房細胞癌 (ACC; acinar cell carcinoma) が 1 例、膵炎が 3 例であった。

2. EUS-FNA

使用機材および試薬

電子コンベックス走査方式型超音波内視鏡 GF-UCT240-AL5

(Olympus Medical Systems Co., Tokyo, Japan)

22G 穿刺針 Echotip Ultra

(Cook Japan, Tokyo, Japan)

迅速細胞診 DiffQuik stain

(Kokusai Shiyaku, Kobe, Japan)

RNAlater

(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA)

Formaldehyde

(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)

EUS-FNA は熟練した術者により施行された。左側臥位にて midazolam と fentanyl による十分な麻酔・鎮静下に心電図計、パルスオキシメーター、自動血圧計による呼吸循環動態モニタリング下に施行した。また、経鼻カヌラによる予防的な酸素投与を行い、酸素流量は 2L/min を最低量とし、SpO₂により適宜増減した。

EUS により病変を描出し、超音波画像でリアルタイムに病変を観察しながら、経胃もしくは経十二指腸的に穿刺を行った。穿刺の際にはカラードップラーを併用し血管を避けて行った。穿刺後にスタイレットを抜去し、陰圧をかけた 10 mL シリンジを穿刺針に装着し、穿刺針を病変内で 10-20 回前後させた。その後、陰圧を解除し穿刺針を抜去し、スタイレットを内腔に通すことで、検体をスライドガラス上に展開した。スライドガラスに塗布された検体の一部は、空気乾燥、アルコール固定し細胞検査技師により迅速細胞診が行われた。組織検体は 10% formalin にて固定した後に、組織診断に用いられた。組織検体の一部は直接 2.0 mL 破砕用 tube に分注した 1 mL の RNAlater に浸した後に、DNA 抽出に用いた。

3. DNA・RNA 抽出、逆転写

試薬及び材料

AllPrep® DNA/RNA/Protein mini kit	(Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA)
2-mercaptoethanol	(Wako Pure Chemical Industries)
99.5% ethanol	(Wako Pure Chemical Industries)
Formaldehyde saline	(Wako Pure Chemical Industries)
QIAamp® DNA FFPE tissue kit	(Qiagen)
SuperScript® II Reverse Transcriptase	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

RNAlater 内にて保護された検体からの DNA・RNA の抽出は、AllPrep® DNA/RNA/Protein mini kit を用いて以下の方法で行った。破碎用 tube よりピペットを用いて RNAlater を除去した後、Buffer RLT 600 μ L・2-mercaptoethanol 6 μ L・3.0 mm ジルコニアビーズを加えた。ビーズクラッシャー(μ T-01, TITEC, Koshigaya, Japan)を用いて EUS-FNA 検体を破碎した。12,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を QIAshredder (Qiagen)に移し、更に 12,000 rpm で 1 分間遠心した。上清を DNA 用の AllPrep DNA Mini スピンカラムにアプライし、12,000 rpm で 15 秒間遠心し、AllPrep DNA Mini スピンカラムを新しい microtube にセットした。500 μ L の Buffer AW1 を AllPrep DNA Mini スピンカラムに添加し、12,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。500 μ L の Buffer AW2 を AllPrep DNA Mini スピンカラムに添加し 12,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。更に 12,000 rpm で 2 分間遠心し、AllPrep DNA Mini スピンカラムを乾燥させた。AllPrep DNA Mini スピンカラムを新しい microtube にセットした後、70°C に加温しておいた 100 μ L の Buffer EB を直接 AllPrep DNA Mini スピンカラム・メンブレンに添加し、30 秒間安置した後に 12,000 rpm で 2 分間遠心し、DNA を含む溶出液を回収した。QIAshredder の後に AllPrep DNA Mini スピンカラムにアプライし、遠心して得られたろ液に 99.5% ethanol 430 μ L を加えピペッティングにより混和した。サンプルを 2 回に分け 2 ml collection tube 中にセットした RNeasy® MINI スピンカラムにアプライし、12,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。700 μ L の Buffer RW1 を RNeasy® MINI スピンカラムに添加し、12,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。500 μ L の Buffer RPE を RNeasy® MINI スピンカラムに添加し 12,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄し、同作業を計 2 度行なった。更に 12,000 rpm で 2 分間遠心し、RNeasy® MINI スピンカラムを乾燥させた。RNeasy® MINI スピンカラムを新しい microtube にセット後、100 μ L の RNase-Free water を直接 RNeasy® MINI スピンカラム・メンブレンに添加し、12,000rpm で 2 分間遠心し、RNA を含む溶出液を回収した。

3 例の手術により得られた PNET 検体からも DNA の抽出を行った。10% formalin

で固定した後にパラフィン包埋された検体を 10 µm にスライスし、10 スライスを用いた。QIAamp® DNA FFPE tissue kit を用いて DNA 自動精製装置(QIAcube®, Qiagen)で抽出を行った。

回収した DNA・RNA の濃度測定は、分光高度計(Nano Drop 2000, Thermo Scientific)を用いて行った。

逆転写の過程は SuperScript® II Reverse Transcriptase を用いて以下の手法にて行った。RNA を含む溶出液 16 µL、oligo dT 2 µL、dNTP Mix 2 µL を混ぜ合わせ、65°C で 10 分間インキュベートし、氷上で冷却した。5x FS buffer 8 µL、25mM MgCl₂ 8 µL、0.1 M DTT 4 µL、SuperScript® II Reverse Transcriptase 2 µL を加え、42°C で 50 分間、70°C で 15 分間インキュベートし、氷上で冷却した。

4. PCR

試薬及び材料

Advantage® 2 PCR Kit

(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)

各検体約 100 ng の DNA と表 1.に示すプライマーを使用し、CTNNB1 の exon3 全長 228 bp を増幅した。1st PCR には DNA 約 100 ng、50x dNTP 1 µL、10x Buffer 5 µL、10 µM Forward primer 1 µL、10 µM Reverse primer 1 µL、50x Polymerase 1 µL に総量が 50 µL となるように DNase-Free water を加え混ぜ合わせた。94°C 7 分間の後、94 °C 15 秒間・58°C 15 秒間・72°C 30 秒間を 35 サイクル、72°C 5 分間の条件にて、Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて PCR を行った。

2nd PCR には 1st PCR 後の検体 5 µL、DNase-Free water 36 µL、50x dNTP 1 µL、10x Buffer 5 µL、10 µM Forward primer 1 µL、10 µM Reverse primer 1 µL、50x Polymerase 1 µL を加え混ぜ合わせた。なお 2nd PCR では以下 1-4 のいずれかの barcode を付けた primer を用いた。Barcode 1 : CTAAGGTAAC、2 : TAAGGAGAAC、3 : AAGAGGATTC、4 : TACCAAGATC。94°C 7 分間の後、94 °C 15 秒間・58°C 15 秒間・72°C 30 秒間を 35 サイクル、72°C 5 分間の条件にて、Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて PCR を行った。PCR 後は 4°C に維持し、保存が長期となる場合は-20°C で保管した。

表 1. 本研究に用いたプライマー

Primers for the first PCR

Forward

5'-CTGATTTGATGGAGTTGGACATGG-3'

Reverse

5'-CAGCTACTTGTTCTTGAGTGAAGG-3'

Primers for the second PCR (library preparation for NGS)

Primer pair for forward sequencing

Forward

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-barcode-CTGATTTGATGGAGTTGGACATGG-3'

Reverse

5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCAGCTACTTGTTCTTGAGTGAA
GG-3'

Primer pair for reverse sequencing

Forward

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-barcode-CAGCTACTTGTTCTTGAGTGAAGG-3'

Reverse

5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCTGATTTGATGGAGTTGGACAT
GG-3'

NGS, next-generation sequencing.

5. 電気泳動、Gel extraction

試薬及び材料

Agarose	(Wako Pure Chemical Industries)
50x TAE	(Wako Pure Chemical Industries)
Loading Dye	(Promega KK., Tokyo, Japan)
DNA ladder	(Toyobo co., Osaka, Japan)
QIAquick® Gel Extraction kit	(Qiagen)
Sodium acetate	(Wako Pure Chemical Industries)
2-propanol	(Wako Pure Chemical Industries)
Agilent DNA 1000 kit	(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)

2 g のアガロースを 100 mL の 1x TAE に溶解しゲルを作成した。100 bp DNA Ladder 10 µL に Blue/Orange 6x Loading Dye 2 µL を加え、well にアプライした。また PCR 後の検体 20 µL に Blue/Orange 6x Loading Dye 4 µL を加え、well にアプライし 150 V で電気泳動を行った。

228 bp 近傍のバンドを剃刀にて切り出し、QIAquick® Gel Extraction kit を用いて以下の方法で行った。ゲルを microtube に入れ、3 倍量の Buffer QG を加えて 50°C で 10 分インキュベートした。その後、5 µL の 3 M sodium acetate と 1 倍量の 2-propanol を加えピペッティングにより混和した。QIAquick® スピнкаラムにアプライし、12,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。500 µL の Buffer QG をスピнкаラムに添加し、12,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。700 µL の Buffer PE をスピнкаラムに添加し 12,000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を廃棄した。更に 12,000 rpm で 2 分間遠心し、スピнкаラムを乾燥させた。スピнкаラムを新しい microtube にセットした後、50 µL の DNase-Free water を直接スピнкаラム・メンブレンに添加し、12,000 rpm で 2 分間遠心し、DNA を含む溶出液を回収した。

回収した DNA の濃度・サイズ測定は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) と Agilent DNA 1000 kit を用いて行った。

6. Emulsion PCR、次世代シーケンシング

試薬及び材料

Ion OneTouch™ 200 Template kit v2

(Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)

10M Sodiumhydroxide Solution

(Sigma-Aldrich Japan inc., Tokyo, Japan)

Ion PGM™ 200 Sequencing Kit

(Life Technologies Corporation)

2-propanol

(Wako Pure Chemical Industries)

1 回のランでは最大で、異なる barcode を付加した 1-4 検体を、濃度を合わせて混ぜ合わせて使用した。Ion OneTouch™ System (Life Technologies)を用いて Emulsion PCR を行った。Nuclease-free water 280 µL、Ion OneTouch™ 2x Reagent Mix 500 µL、Ion OneTouch™ Enzyme Mix 100 µL、26 pM に調整した DNA 20 µL、Ion OneTouch™ 200 Ion Sphere™ Particles 100 µL をピペッティングにより混和した。全量を Ion OneTouch Plus Reaction Filter Assembly にローディングし、更に Ion OneTouch Reaction Oil 1,500 µL をローディングし、セットした。

Emulsion PCR の終了後、検体をそのまま Ion OneTouch™ System で遠心し、2 本の Recovery tube に各 50 µL の検体を残し、上清を廃棄した。計 100 µL を 1 本の DNA LoBind tube にまとめ、Ion OneTouch™ Wash Solution 1,000 µL を加え、15,300 xg で 3 分間遠心し上清 1,000 µL を廃棄した。検体をボルテックスミキサーにて攪拌しペレットを懸濁した。

検体の enrichment を Ion OneTouch™ ES システムを用いて行った。Melt-Off solution として、Nuclease-free water 865 µL、1M Sodiumhydroxide 125 µL、10% Tween® 20 10 µL を混ぜ合わせ調整した。1.5 mL DNA LoBind tube に MyOne™ Beads Wash Solution 130 µL を取り、よく攪拌した容器から Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads 13 µL を加えピペッティングにより混和した。マグネティックスタンドに 2 分間静置し上清を廃棄した。再度 MyOne™ Beads Wash Solution 130 µL を加えピペッティングにより混和し、Ion OneTouch™ ES 専用 8 連 tube の Well 2 に移した。Emulsion PCR 後の検体 100 µL を Well 1 に移し、OneTouch™ Wash Solution 各 300 µL を Well 3-5 に移した。更に調整した Melt-Off solution 300 µL を Well 7 に移し、検体の enrichment を開始した。

Ion OneTouch™ ES システムのラン終了後、得られたサンプルビーズを 15,300 xg で 2 分間遠心し、10 µL を残し上清を廃棄した。そこに OneTouch™ Wash Solution 200 µL を加えピペッティングにより混和し 15,300 xg で 1.5 分間遠心し、10 µL を残し上

清を廃棄した。OneTouch™ Wash Solution を加え全体を 100 µL とした。

Enrich 済みのサンプルを 50 µL を 0.2 mL PCR tube に移し、Control Ion Sphere™ Particles を 5 µL 加えた。更に Annealing Buffer 100 µL を加え、ピペッティングにより混和し 15,300 xg で 2 分間遠心した。3 µL を残し上清を廃棄した。3 µL の Sequencing Primer を加え、95°C 2 分間、37 °C 2 分間にセットした、Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて annealing を行った。その後、Sequencing Poymelase 1 µL を加え、ピペッティングにより混和し、室温で 5 分間静置した。

Chip check を済ませた Ion 314™ チップ (Life Technologies) に 100% 2-propanol 50 µL をローディングポートよりゆっくりとロードし、さらに Annealing Buffer 50 µL を同様にロードした。ローディングポートが下になるように、chip を 45 度に傾けて Annealing Buffer をピペッティングで除去。Chip を上下逆さまの状態にし、遠心用カスタムアダプター/ローターに載せ、chip tab を内側にして 5 秒間遠心した。室温で 5 分間静置したサンプル 7 µL を水平においた chip のローディングポートよりゆっくりとロードし、chip tab を内側にして 30 秒間遠心した。ローディングポートが下になるように、chip を 45 度に傾けて、5 µL にセットしたピペットでローディングポートよりサンプルを吸引、またゆっくりロードというのを 3 回繰り返した。Annealing Buffer をピペッティングで除去。Chip tab を外側にして 30 秒間遠心し、同様にサンプルの吸引、ロードを 3 回繰り返した。Chip tab を内側にして 30 秒間遠心した。ローディングポートが下になるように、chip を 45 度に傾けて、ローディングポートよりサンプルをゆっくりと吸引除去した。最後に Annealing Buffer 7 µL をロードした。

Ion PGM™ (Life Technologies) のシステムセットアップとイニシャライズを済ませ、ローディングが終わった chip をセットし、ランを開始した。

得られた配列は hg19 を参照配列とし mapping を行った。変異の検出は Ion Torrent Suite v2.2 software (Life Technologies) を用いて行った。

7. Direct sequencing シークエンシング

試薬及び材料

The BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Standard Kit

(Thermo Fisher Scientific Inc.)

Sodium acetate

(Wako Pure Chemical Industries)

99.5% ethanol

(Wako Pure Chemical Industries)

HiDi™ Formamide

(Thermo Fisher Scientific Inc.)

Gel extraction 後の DNA を用いて Direct sequencing を行った。Big Dye® Terminator 2.5 µL、halfBD Dye Terminator 2.5 µL、DNA 4ng に総量が 15 µL となるように DNase-Free water を加え混ぜ合わせた。1st PCR に用いたプライマーを 3.3 µM に調整し、Forward primer 1 µL、または Reverse primer 1 µL を加え混ぜ合わせた。96°C 1 分間の後、96 °C 105 秒間・50°C 5 秒間・60°C 4 分間を 25 サイクル、4°C 7 分間の条件にて、Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)を用いて PCR を行った。

PCR 産物 16 µL に 3 M sodium acetate 2 µL、99.5% ethanol 40 µL を加えボルテックスミキサーにて攪拌した後、室温・遮光で 15 分間安置した。18°C、15,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を廃棄した。99.5% ethanol 100 µL を加え、18°C、13,200 rpm で 10 分間遠心し、上清を廃棄した。室温・遮光で 10 分間空気乾燥させ、HiDi™ Formamide 35 µL を加え 95°C 2 分間、氷上で 2 分間冷却した。ピペッティングにより混和し、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)でシークエンシングを行った。データの解析には Sequence Scanner Software2 version 2.0 (Applied Biosystems)を用いた。変異の検出は CTNNB1 の exon3 の全 228 bp を参照配列とし、BLAST® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用いて行った。

<CTNNB1 の exon3 の塩基配列 (228 bp) >

5'-CTGATTTGATGGAGTTGGACATGGCCATGGAACCAGACAGAAAA
GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGA
ATCCATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAG
GCAATCCTGAGGAAGAGGATGTGGATACCTCCCAAGTCCTGTATG
AGTGGGAACAGGGATTTTCTCAGTCCTTCACTCAAGAACAAGTAGC
TG-3'

結果

1 症例の臨床病理学的所見

症例の臨床病理学的所見について表 2.に示す。

全体では年齢は 13 歳から 81 歳で中央値は 63.5 歳だった。性別は女性が 24 例、男性が 14 例だった。発生部位は膵頭部 17 例、膵体部 5 例、膵尾部 12 例、膵体尾部 3 例、リンパ節再発が 1 例だった。腫瘍径は 8 mm から 95 mm で中央値は 23 mm だった。手術術式は、亜全胃温存膵頭十二指腸切除術 (SSPPD; subtotal stomach-preserving pancreaticoduodenectomy) が 3 例、十二指腸温存膵頭切除術 (DpPHR; duodenum-preserving pancreas head resection) が 2 例、膵体尾部切除術 (DP; distal pancreatectomy) が 7 例、その他が 2 例、未施行が 24 例だった。

疾患別では、SPN は 7 例で、年齢は 13 歳から 36 歳で中央値は 67 歳だった。性別は全例女性だった。発生部位は膵頭部 2 例、膵体部 2 例、膵尾部 2 例、膵体尾部 1 例だった。腫瘍径は 12 mm から 64 mm で中央値は 28 mm だった。画像所見では 6 例で充実成分と嚢胞成分の混在を認め、1 例では充実腫瘍のみで嚢胞成分を認めなかった。手術術式は、DpPHR が 2 例、DP が 3 例、膵部分切除 (膵体部) が 1 例、未施行が 1 例だった。EUS-FNA 検体を用いた免疫組織化学では 2 例が chromogranin A 陽性、5 例が Synaptophysin 陽性、5 例で β -catenin による核の濃染が認められた。2 例については β -catenin 染色を施行していない。

PDAC は 16 例で、年齢は 44 歳から 81 歳で中央値は 27 歳だった。性別は女性 8 例、男性 8 例だった。発生部位は膵頭部 10 例、膵尾部 5 例、膵体尾部 1 例だった。腫瘍径は 9 mm から 70 mm で中央値は 27.5 mm だった。手術術式は、SSPPD が 1 例、DP が 1 例、切除不能が 14 例だった。PDAC 症例では免疫組織化学を施行していない。

PNET は 11 例で、年齢は 45 歳から 79 歳で中央値は 69 歳だった。性別は女性 8 例、男性 3 例だった。発生部位は膵頭部 4 例、膵体部 3 例、膵尾部 3 例、リンパ節再発が 1 例だった。腫瘍径は 8 mm から 52 mm で中央値は 17 mm だった。手術術式は、SSPPD が 2 例、DP が 3 例、リンパ節再発に対するリンパ節、左腎合併切除が 1 例、未施行が 5 例だった。免疫組織化学では全例が chromogranin A、Synaptophysin ともに陽性であった。 β -catenin 染色は 1 例で施行されたが、細胞膜のみ陽性であった。

ACC 1 例は 64 歳の男性、膵体尾部に 95 mm 大の腫瘍を認め、切除不能であった。免疫組織化学では chromogranin A は陽性だが、Synaptophysin は陰性であった。

また 72 歳男性の自己免疫性膵炎例、42 歳女性、64 歳男性の腫瘍形成性膵炎例を認めた。

表 2.1 患者背景

症例	最終診断	性別	年齢	局在	腫瘍径	腫瘍マーカー		画像所見	診断根拠	術式	免疫組織化学		
					(mm)	CEA (ng/mL)	CA19-9 (IU/mL)				CgA	Synaptophysin	β-catenin
1	SPN	F	33	Pt	64	Solid/cystic	2	0	Surgery	DP	(-)	(+)	Nuclear
2	SPN	F	31	Pb	12	Solid/cystic	1	6	Surgery	Partial pancreatectomy	(-)	(-)	Nuclear
3	SPN	F	17	Ph	23	Solid/cystic	1	<1	Surgery	DpPHR	(-)	(+)	ND
4	SPN	F	36	Pbt	28	Solid/cystic	2	12	Surgery	DP	(-)	(+)	Nuclear
5	SPN	F	27	Pt	48	Solid/cystic	1	<1	Surgery	DP	(+)	(+)	Nuclear
6	SPN	F	13	Ph	63	Solid/cystic	1	9	Surgery	DpPHR	(+)	(+)	Nuclear
7	SPN	F	26	Pb	13	Solid	1	8	EUS-FNA	ND	(-)	(-)	ND

SPN, 腓充実性偽乳頭腫瘍; M, 男性; F, 女性; Ph, 腓頭部; Pb, 腓体部; Pt, 腓尾部; EUS-FNA, 超音波内視鏡下穿刺吸引生検; DP, 腓体尾部切除術; DpPHR, 十二指腸温存腓頭切除術; SSPPD, 亜全胃温存腓頭十二指腸切除術; CgA, chromogranin A; ND, not done.

表 2.2 患者背景

症例	最終診断	性別	年齢	局在	腫瘍径	画像所見	腫瘍マーカー		診断根拠	術式	免疫組織化学		
					(mm)		CEA (ng/mL)	CA19-9 (IU/mL)			CgA	Synaptophysin	β-catenin
8	PDAC	F	64	Ph	33	Solid	10	3	Surgery	SSPPD	ND	ND	ND
9	PDAC	F	75	Pt	22	Solid	55	220	Surgery	DP	ND	ND	ND
10	PDAC	F	55	Ph	45	Solid	12	693	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
11	PDAC	M	62	Pt	70	Solid	79	>10,000	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
12	PDAC	F	76	Ph	70	Solid/cystic	4	>10,000	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
13	PDAC	M	64	Ph	17	Solid	22	53	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
14	PDAC	F	81	Ph	9	Solid	2	21	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
15	PDAC	F	78	Pt	66	Solid	12	361	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
16	PDAC	F	67	Ph	10	Solid	7	242	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
17	PDAC	M	63	Ph	27	Solid	7	2320	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
18	PDAC	M	57	Ph	17	Solid	6	30	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
19	PDAC	M	79	Ph	30	Solid	3	871	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
20	PDAC	M	44	Pbt	28	Solid	48	2880	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
21	PDAC	M	78	Pt	27	Solid	3	229	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
22	PDAC	F	67	Ph	25	Solid	15	246	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
23	PDAC	M	80	Pt	47	Solid	440	>10,000	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND

PDAC, 膵癌; M, 男性; F, 女性; Ph, 膵頭部; Pb, 膵体部; Pt, 膵尾部; EUS-FNA, 超音波内視鏡下穿刺吸引生検; DP, 膵体尾部切除術; SSPPD, 亜全胃温存膵頭十二指腸切除術; CgA, chromogranin A; ND, not done.

表 2.3 患者背景

症例	最終診断	性別	年齢	局在	腫瘍径	画像所見	腫瘍マーカー		診断根拠	術式	免疫組織化学		
					(mm)		CEA (ng/mL)	CA19-9 (IU/mL)			CgA	Synaptophysin	β-catenin
24	PNET	F	58	Pt	23	Solid	2	14	Surgery	DP	(+)	(+)	ND
25	PNET	M	51	Ph	52	Solid/cystic	2	31	Surgery	SSPPD	(+)	(+)	ND
26*	PNET	F	76	Lymph node	18	Solid	3	11	Surgery	Left nephrectomy	(+)	(+)	ND
27**	PNET	M	72	Pt	20	Solid	5	14	Surgery	DP	(+)	(+)	ND
28	PNET	F	58	Pb	18	Solid	2	14	Surgery	DP	(+)	(+)	ND
29	PNET	F	78	Ph	16	Solid	2	<1	Surgery	SSPPD	(+)	(+)	ND
30	PNET	M	79	Pb	9	Solid	3	8	EUS-FNA	ND	(+)	(+)	Membrane
31	PNET	F	69	Pt	8	Solid	3	5	EUS-FNA	ND	(+)	(+)	ND
32	PNET	F	77	Ph	17	Solid	2	47	EUS-FNA	ND	(+)	(+)	ND
33	PNET	F	45	Ph	17	Solid/cystic	3	26	EUS-FNA	ND	(+)	(+)	ND
34	PNET	F	62	Ph	10	Solid/cystic	6	40	EUS-FNA	ND	(+)	(+)	ND
35	Acinar cell carcinoma	M	46	Pbt	95	Solid/cystic	4	19	EUS-FNA	ND	(+)	(-)	ND
36	AIP	M	72	Pt	28	Solid	8	22	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
37	Focal pancreatitis	F	42	Pt	20	Solid/cystic	1	6	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND
38	Focal pancreatitis	M	64	Ph	22	Solid	4	<1	EUS-FNA	ND	ND	ND	ND

PNET, 膵神経内分泌腫瘍; AIP, 自己免疫性膵炎; M, 男性; F, 女性; Ph, 膵頭部; Pb, 膵体部; Pt, 膵尾部; EUS-FNA, 超音波内視鏡下穿刺吸引生検; DP, 膵体尾部切除術; SSPPD, 亜全胃温存膵頭十二指腸切除術; CgA, chromogranin A; ND, not done.

2 NGS の結果

SPN 症例は全例で *CTNNB1* の exon3 にそれぞれ 1 つのミスセンス変異を認めた。PDAC、ACC、自己免疫性膵炎や腫瘍形成性膵炎では変異を認めなかった。PNET 症例では 1 例にのみミスセンス変異を認めた。

SPN 症例の *CTNNB1* の exon3 変異について表 3.に示す。変異の認められたコドンは、コドン 32 が 3 例、37 が 2 例、41 が 2 例だった。変異を認めた塩基の coverage は 4,490 から 203,919 で変異頻度は 5.39%から 48.77%だった。

変異の認められた PNET 症例は、症例 24 で、コドン 41 に 34.70%の頻度で変異が認められ、coverage は 14,515 だった。

変異のみられなかった症例では、平均 coverage は 113 から 8,027 で中央値は 7,312 だった。

表 3. Mutations in *CTNNB1*

症例	Template	変異 codon	塩基置換	アミノ酸変異	Var Freq (%)	Coverage	Ref Cov	Var Cov
1	RNA	37	N378 C/A	Ser37Tyr	23.81	19047	14495	4535
2	RNA	32	N363 A/G	Asp32Gly	5.39	16072	15199	866
3	RNA	32	N362 G/C	Asp32His	48.77	25740	13161	12554
4	gDNA	41	N390 C/T	Thr41Ile	31.07	4490	3093	1395
5	gDNA	37	N378 C/T	Ser37Phe	26.48	115799	84609	30665
6	gDNA	32	N362 G/A	Asp32Asn	21.50	203919	43842	160077
7	RNA	41	N390 C/T	Thr41Ile	29.68	35808	25167	10629

Var Freq, variant frequency; Ref Cov, reference coverage; Var Cov, variant coverage;

gDNA, genomic DNA; Ser, serine; Tyr, tyrosine; Asp, asparatic acid; Gly, glycine; His,

histidine; Thr, threonine; Ile, isoleucine; Phe, phenylalanine; Asn, asparagine

3 Direct sequencing の結果

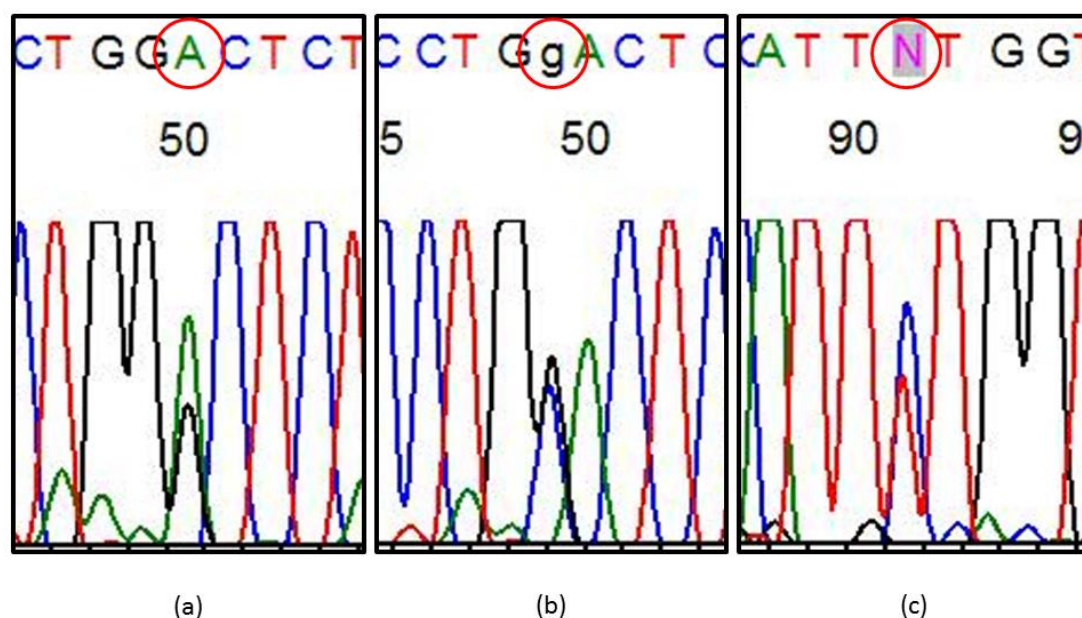
SPN 6 症例の検体を用いて direct sequencing を行った結果を表 4.に示す。1 例（症例 7）では十分量の検体がなく施行不能であった。

BLAST®による解析では、1 例（症例 5）のみで変異の検出が可能であった。

表 4. Direct sequencing の結果

症例	NGS による変異頻度 (%)	結果
1	23.81	検出不能
2	5.39	検出不能
3	48.77	検出不能
4	31.07	検出不能
5	26.48	検出
6	21.50	検出不能
7	29.68	施行不能

図 1. Direct sequencing の結果



Next-generation sequencing (NGS)で変異を認めた症例において direct sequencing を行いBLAST®による解析を行った。(a) 症例 2: NGS では A/G の変異を検出したが、検出不能。(b) 症例 3: NGS では G/C の変異を検出したが、検出不能。(c) 症例 5: NGS では C/T の変異を検出したが、判定不能“N”の結果であり、変異を検出。

考察

本研究では、SPN をはじめとした腭 EUS-FNA 検体と NGS を用いた、deep sequencing による変異解析が十分に可能であることが示された。

SPN はこれまでに手術検体を用いた報告で 83%-100%の頻度で *CTNNB1* の exon3 に変異を有することが報告されている (15,16,17,18,19,20)。これまでに報告された変異はコドン 32、33、34、37、41 の 1 塩基によるミスセンス変異とコドン 28 から 32 にかけての 12 塩基の欠損である。Serine 33 と 37、threonine 41 は GSK-3 β -APC-Axin 複合体によるリン酸化部位として知られている (29,30,31)。Serine 33 と 37 がリン酸化を受けると、 β -TrCP1 の WD40 Domain に認識され、WD40 Domain と Codons 32、33、34、36、37 が結合する。すると β -Catenin のユビキチン化がおこり、分解されることとなる (32)。これらの部位の変異により細胞質において、 β -Catenin の異常な安定化をきたし核内移行が促進される (29)。

本研究では SPN 7 例全例と PNET 1 例の 8 例で *CTNNB1* に変異が認められた。変異のみられたコドンは既報と基本同部位のコドン 32、37、41 であった (15,16,17,18,19,20)。これまでに、FNA 検体を用いた NGS による報告はあるが (27,28,29,30)、調べた限りでは、本研究が EUS-FNA 検体を用いた NGS による世界初の *CTNNB1* 変異解析の報告であった。

変異解析の手法としては direct sequencing、免疫組織化学、fluorescence in-situ hybridization (FISH 法)、PCR など、いくつかの方法がある。Direct sequencing が至適基準とされたが、低頻度の変異を検出できないこと、結果の解釈に経験を要することなどが欠点として挙げられる。変異の検出のためには少なくとも 30%以上の変異頻度を要するという報告がある (33)。本研究では direct sequencing では NGS で検出した 7 つの変異のうち、1 つのみが検出可能であった。また本結果により EUS-FNA 検体を用いた NGS による変異解析の有用性が示唆された。EUS-FNA 検体では血液や穿刺経路の組織の混入を認める (34)。しかし NGS を用いることで、少量の検体や、腫瘍組織の割合が小さくても変異の検出が可能であった。

超高速シーケンサーの出現により、direct sequencing では困難だった、膨大な量の配列情報の解析が、短時間・低コストで可能となった。NGS は単一の技術を示す単語ではなく、direct sequencing 以降に発展した種々の測定原理による sequencing の総称である (24)。本研究に用いた、Ion PGMTM (Life Technologies)の測定原理は半導体チップによる、塩基鎖の伸長反応時に放出される水素イオンの検出である (35)。本研究に用いた Ion 314TMチップ(Life Technologies)には約 1,200,000 のウェルがあり、それぞれにセンサーを備えている。1 ウェルにつき 1 つのビーズがはまり、そのビーズ上で塩基鎖の伸長反応が起こる。伸長反応が起こると pH の変化が起き、それを感じ

知することにより鋳型 DNA の配列が決定される。得られた配列は参照配列上にマッピングされ、マップ上のリード数 (coverage) から変異の有無、変異頻度が同定される。上述のため、direct sequencing における波形からの変異同定と異なり、小さな変異率や他組織の混入によっても変異の検出ができる。

これまでに PNET においては *CTNNB1* 変異の報告がない。Gerdes らによる 78 例の PDAC、33 例の PNET、14 の PDAC 細胞株の解析では *CTNNB1* に変異はみられなかった (36)。同様に Liu らによる 14 例の PNET 症例の解析でも *CTNNB1* に変異はみられなかった (18)。PNET の遺伝子変異に関して、Jiao らは、10 例の PNET 検体を用いて、18,000 におよぶ exon 解析を行い、新規に *DAXX* や *ATRX* の変異を報告した (37)。しかし同研究においても、*CTNNB1* の変異は検出されなかった (37)。他臓器の神経内分泌腫瘍に関しては、胸腺神経内分泌腫瘍における変異の報告 (isoleucine 35 から serine) (38)や回腸神経内分泌腫瘍細胞株における報告がある (39)。本研究において *CTNNB1* に変異が認められた PNET 症例は、典型的な画像所見と EUS-FNA 検体による病理所見、免疫組織化学所見により診断された。臍頭部に 9.6 × 5.4 mm 大の類円形の腫瘍性病変を認め、腹部造影 CT では動脈相で濃染した。免疫組織化学では chromogranin A、Synaptophysin とともに陽性であった。また β -catenin は細胞膜のみが陽性であった。Ki-67 index が 1–2%であり、WHO2010 分類 (2)では NET G1 の診断であった。79 歳という年齢と、上述の診断により手術は施行されておらず、腫瘍の全体像による評価は行われていない。SPN と PNET とは重要な鑑別診断として挙げられ (40,41)、特に β -catenin に対する染色性の違いは重要な鑑別点となる。今後 PNET における *CTNNB1* の変異の頻度や病態における意義の解明も望まれる。

総括

本研究において、以下の知見が得られた。

1. EUS-FNA 検体と NGS を用いた、deep sequencing による変異解析が十分に可能である。

本研究において、微少検体を用いた変異解析が十分に可能であることが示された。今回検討を行った、膵腫瘍はもとより、多くの腫瘍、疾患における遺伝子変異に関する報告が多くなされている。こうした知見の蓄積により、診断困難な疾患を、変異解析を行うことで診断へと近づける可能性がある。また現在、癌化学療法において様々な分子標的薬が臨床応用・製造・開発されている。切除不能症例、術前からの治療において、生検検体などの微少検体を用いた変異解析・Pathway 解析により、個々人への最適な治療の選択（個別化医療）も行われてきている。膵疾患において、特に膵頭部では外科的切除による検体採取や治療は大きな侵襲を伴う。EUS-FNA 等のより低侵襲な処置による診断・治療方針の決定がなされていくためにも、今後のさらなる知見の積み重ねが肝要である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言をいただきました北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

研究に対する心構えや信念、実験方法、データ解釈、論文作成など、様々な面において御指導・御援助頂きました元北海道大学病院消化器内科助教、現夏井坂内科クリニック 夏井坂光輝先生には感謝の念に堪えません。厚く御礼申し上げます。

臨床における技術指導や、EUS-FNA の施行、検体の採取にご尽力頂きました、北海道大学病院消化器内科 河上洋 臨床准教授・講師にはありがたく御礼申し上げます。

同じく臨床における技術指導や、病棟管理にご尽力頂きました、北海道大学病院消化器内科 胆膵グループの諸先生方には、深謝いたします。

2015 年 3 月

久保田 良政

REFERENCES

- 1 Frantz, V. K. Tumors of the Pancreas. Atlas of Tumor Pathology, Section VII, Fascicles 27 and 28, Armed Forces Institute of Pathology. Washington, DC, 1959.
- 2 Bosman, F. T. *et al.* eds WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th Edition, IARC Press, Lyon, 2010.
- 3 Klimstra, D. S., Wenig, B. M. & Heffess, C. S. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a typically cystic carcinoma of low malignant potential. *Semin. Diagn. Pathol.* **17**, 66-80 (2000).
- 4 Papavramidis, T. & Papavramidis, S. Solid pseudopapillary tumors of the pancreas: review of 718 patients reported in English literature. *J. Am. Coll. Surg.* **200**, 965-972 (2005).
- 5 Yu, P. F. *et al.* Solid pseudopapillary tumor of the pancreas: a review of 553 cases in Chinese literature. *World J. Gastroenterol.* **16**, 1209-1214 (2010).
- 6 Tanaka, Y. *et al.* Usefulness of beta-catenin immunostaining for the differential diagnosis of solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas. *Am. J. Surg. Pathol.* **26**, 818-820 (2000).
- 7 Notohara, K. *et al.* Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: immunohistochemical localization of neuroendocrine markers and CD10. *Am. J. Surg. Pathol.* **24**, 1361-1371 (2000).
- 8 Behrens, J. *et al.* Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* **280**, 596-599 (1998).
- 9 Aoki, M. *et al.* Nuclear endpoint of Wnt signaling: neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid-enhancing factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **5**, 139-144 (1999).
- 10 Morin, P. J. *et al.* Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**, 1787-1790 (1997).
- 11 Voeller, H. J., Truica, C. I. & Gelmann, E. P. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer. Res.* **58**, 2520-2523 (1998).
- 12 Palacios, J. & Gamallo, C. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer. Res.* **58**, 1344-1347 (1998).
- 13 Miyoshi, Y. *et al.* Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer. Res.* **58**, 2524-2527 (1998).
- 14 Kim, J. T. *et al.* Deregulation of Wnt/ β -catenin signaling through genetic or

- epigenetic alterations in human neuroendocrine tumors. *Carcinogenesis* **34**, 953-961 (2013).
- 15 Tanaka, Y. *et al.* Frequent beta-catenin mutation and cytoplasmic/nuclear accumulation in pancreatic solid-pseudopapillary neoplasm. *Cancer. Res.* **61**, 8401-8404 (2001).
- 16 Abraham, S. C. *et al.* Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor beta-catenin mutations. *Am. J. Pathol.* **160**, 1361-1369 (2002).
- 17 Takahashi, Y. *et al.* Solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas in men and women: do they differ? *Virchows Arch.* **448**, 561-569 (2006).
- 18 Liu, B. A., Li, Z. M., Su, Z. S. & She, X. L. Pathological differential diagnosis of solid-pseudopapillary neoplasm and endocrine tumors of the pancreas. *World J. Gastroenterol.* **16**, 1025-1030 (2010).
- 19 Wu, J. *et al.* Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**, 21188-21193 (2011).
- 20 Huang, S. C. *et al.* Clinicopathological analysis of β -catenin and Axin-1 in solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas. *Ann. Surg. Oncol.* **19 Suppl 3**, S438-446 (2012).
- 21 Harewood, G. C. & Wiersema, M. J. Endosonography-guided fine needle aspiration biopsy in the evaluation of pancreatic masses. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 1386-1391 (2002).
- 22 Jani, N. *et al.* Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for diagnosis of solid pseudopapillary tumors of the pancreas: a multicenter experience. *Endoscopy* **40**, 200-203 (2008).
- 23 Maimone, A. *et al.* Preoperative diagnosis of a solid pseudopapillary tumour of the pancreas by Endoscopic Ultrasound Fine Needle Biopsy: A retrospective case series. *Dig. Liver Dis.* **45**, 957-960 (2013).
- 24 Muzzey, D., Evans, E. A. & Lieber, C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr. Genet. Med. Rep.* **3**, 158-165 (2015).
- 25 Hadd, A. G. *et al.* Targeted, high-depth, next-generation sequencing of cancer genes in formalin-fixed, paraffin-embedded and fine-needle aspiration tumor specimens. *J. Mol. Diagn.* **15**, 234-247 (2013).
- 26 Young, G. *et al.* Clinical next-generation sequencing successfully applied to fine-needle aspirations of pulmonary and pancreatic neoplasms. *Cancer*

- Cytopathol.* **121**, 688-694 (2013).
- 27 Karnes, H. E., Duncavage, E. J. & Bernadt, C. T. Targeted next-generation sequencing using fine-needle aspirates from adenocarcinomas of the lung. *Cancer Cytopathol.* **122**, 104-113 (2014).
 - 28 Kanagal-Shamanna, R. *et al.* Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics. *Mod. Pathol.* **27**, 314-327 (2014).
 - 29 Liu, C. *et al.* Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**, 837-847 (2002).
 - 30 Hart, M. *et al.* The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.* **9**, 207–210 (1999).
 - 31 Latres, E., Chiaur, D. S. & Pagano, M. The human F box protein β -TrCP associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of β -catenin. *Oncogene* **18**, 849–854 (1999).
 - 32 Wu, G. *et al.* Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol. Cell.* **11**, 1445-1456 (2003).
 - 33 Angulo, B. *et al.* A comparison of EGFR mutation testing methods in lung carcinoma: direct sequencing, real-time PCR and immunohistochemistry. *PLoS One.* **7**, e43842 (2012).
 - 34 Abe, Y. *et al.* The effect of a stylet on histological specimen in endoscopic ultrasound-guided fine needle tissue acquisition using 22-gauge needles: A multicenter prospective randomized controlled trial. *Gastrointest. Endosc.* **82**, 837-844 (2015).
 - 35 Rothberg, J. M. *et al.* An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* **475**, 348-352 (2011).
 - 36 Gerdes, B. *et al.* Analysis of betacatenin gene mutations in pancreatic tumors. *Digestion* **60**, 544–548 (1999).
 - 37 Jiao, Y. *et al.* DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* **331**, 1199–1203 (2011).
 - 38 Kim, J. T. *et al.* Deregulation of Wnt/b-catenin signaling through genetic or epigenetic alterations in human neuroendocrine tumors. *Carcinogenesis* **34**, 953–961 (2013).
 - 39 Rinner, B. *et al.* Molecular evidence for the bi-clonal origin of neuroendocrine

- tumor derived metastases. *BMC. Genom.* **13**, 594–602 (2012).
- 40 Bardales, R. H. *et al.* Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology diagnosis of solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a rare neoplasm of elusive origin but characteristic cytomorphologic features. *Am. J. Clin. Pathol.* **121**, 654-662 (2004).
- 41 Vassos, N. *et al.* Solid-pseudopapillary neoplasm (SPN) of the pancreas: case series and literature review on an enigmatic entity. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 1051-1059 (2013).