



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
Author(s)	大森, 優子
Description	配架番号 : 2367
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12988号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12988
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75034
Type	doctoral thesis
File Information	Yuko_Omori.pdf



学 位 論 文

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

学 位 論 文

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

目 次

発表論文目録・学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	11 頁
実験方法	13 頁
実験結果	35 頁
考察	116 頁
総括および結論	122 頁
謝辞	123 頁
引用文献	124 頁

論文発表目録・学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. 大森 優子、小野 裕介、谷野 美智枝、唐崎 秀則、高橋 邦幸、篠原 敏也、田中 伸哉、真口 宏介、水上 裕輔.
遺伝子異常からみた IPMN 関連膵癌の特徴について. 肝胆膵. 74(4): 541-549 (2017).
2. Yuko Omori, Yusuke Ono, Mishie Tanino, Hidenori Karasaki, Hiroshi Yamaguchi, Toru Furukawa, Atsuko Sumi, Jin Katayama, Miho Muraki, Kenzui Taniue, Kuniyuki Takahashi, Yoshiyasu Ambo, Toshiya Shinohara, Hiroshi Nishihara, Junpei Sasajima, Hiroyuki Maguchi, Yusuke Mizukami, and Shinya Tanaka.
A revised model of clonal evolution of intraductal papillary mucinous neoplasm-related pancreatic carcinogenesis. In revise.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 大森 優子、谷野 美智枝、小野 裕介、篠原 敏也、西原 広史、唐崎 秀則、真口 宏介、水上 裕輔、田中 伸哉.
Analysis of immunophenotype and genomic profiles of RNF43, β -catenin, SMAD4, and p53 in the IPMN-related pancreatic cancer.
第 105 回 日本病理学会総会、2016 年 5 月 12 日-14 日、仙台.
2. Yuko Omori, Yusuke Ono, Hidenori Karasaki, Yusuke Mizukami, Hiroyuki Maguchi.
Precise pathological tracing of invasive IPMN lesions and related adenocarcinoma; Defining the molecular underpinnings of distinct routes to invasive carcinomas of the pancreas.
20th meeting of the International Association of Pancreatology, the 47th annual meeting of the Japan Pancreas Society, 6th meeting of the Asian Oceanic Pancreatc Associaton, 2016 年 8 月 4 日-7 日、仙台.

3. Yuko Omori, Yusuke Ono, Mishie Tanino, Hidenori Karasaki, Toshiya Shinohara, Shinya Tanaka, Hiroyuki Maguchi, Yusuke Mizukami.
Concomitant pancreatic cancers arising adjacent to index intraductal papillary mucinous neoplasms share identical *KRAS* mutations and are associated with a favorable prognosis.
25th United European Gastroenterology Week, 2017 年 10 月 28–11 月 1 日, Barcelona, Spain. Poster Champ Award 受賞.

【緒言】

膵癌の疫学

悪性新生物は日本の死因第一位であり、がんの死亡数・罹患数ともに増加し続けている¹。膵癌による死亡数は2013年に初めて3万人を超え、2014年では31,716人であった。これは1位肺癌(73,396人)、2位大腸癌(48,485人)、3位胃癌(47,903人)に次いで4位である。がんによる死亡数は年々増加しているが、年齢調整死亡率の年次推移をみると、がんによる死亡率はむしろ減少傾向にある。これは胃癌、肝臓癌での顕著な減少をはじめとし、多くの癌腫でみられる傾向であるが、膵癌では増加傾向が続いている。また罹患数が死亡数とほぼ等しく、膵癌罹患患者の生存率が極めて低いことと関連する。膵癌の危険因子として、家族歴(膵癌、遺伝性膵癌症候群)、合併疾患(糖尿病、慢性膵炎、遺伝性膵炎、肥満)、嗜好(喫煙)が挙げられる。国際的に膵癌罹患率が最も高いのは男女ともに米国のアフリカ系アメリカ人であるが、日本も欧州諸国と同様に膵癌罹患率の高い国の1つであると報告されている²。

我が国での膵癌の5年相対生存率(2004~2007年診断例; n=4,081)は9.2%で、Union for International Cancer Control (UICC) Stage別にみると、Stage I : II : III : IV = 40.5 : 18.2 : 6.3 : 1.6%であった。手術施行症例(n=1,429、35.0%)での5年相対生存率は22.4%で、Stage I : II : III : IV = 45.1 : 21.1 : 13.2 : 8.8%であった³。膵癌の生存率は他の癌腫と比較しても極端に低値であり、膵癌の予後は極めて不良である。膵癌の生存率向上のためには、手術、集学的治療を含めた治療成績の向上とともに、分子病理学的解析に基づいた膵癌発症機序の解明および、その機序に基づいた膵癌早期発見のアルゴリズム構築が急務である。

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の疫学と分類

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm : IPMN) は、1982年に大橋らにより予後のよい膵癌として初めて報告された。膵管内に発生し、乳頭状増生する上皮性腫瘍で、多量の粘液を産生し、主膵管および分枝膵管の拡張や十二指腸乳頭の開大と粘液の排出を特徴とする。中高年男性に好発し、有症状例は37%で、最多は腹痛(21%)、次いで腰背部痛(6%)である。62%が無症状であり、健康診断や人間ドック、他疾患の精査中に発見される場合が多い。また33%に膵疾患や膵の異常所見の合併を認め、最多は糖尿病(19%)、次いで急性膵炎が多い(7%)^{4, 5}。

IPMN は、臨床病理学的に、腫瘍の局在による分類（主膵管型、分枝型、混合型）と、異型度による分類（低異型度、高異型度、浸潤癌）、腫瘍性上皮の細胞形態および粘液形質による分類（胃型、腸型、胆膵型、好酸性細胞型）がなされる^{28, 29, 44}。上皮形態の分類では、胃型が最も多く、次いで腸型が多い。胃型は低異型度が多く、予後良好とされるが、時に管状腺癌の形態の浸潤癌へ進展する^{6, 7, 53}。腸型は粘液癌の形態の浸潤癌へ進展する^{6, 53}。胆膵型の頻度は少ないが、ほぼ全例高異型度であり、管状腺癌の形態の浸潤癌へ進展し、予後不良である^{6, 7, 53}。

IPMN 由来浸潤癌と併存膵癌

IPMN 関連膵癌は、高異型度 IPMN が浸潤癌へ進展する IPMN 由来浸潤癌と、背景膵に広く分布する PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) の多発病変 (field defect) を母地に発生する IPMN 併存膵癌に大別される^{10, 19}。両者の発生において、様々な遺伝子の関与が報告されているが、詳細な発癌機序、進展様式、生物学的表現形の違いは十分には解明されていない (図 1)。

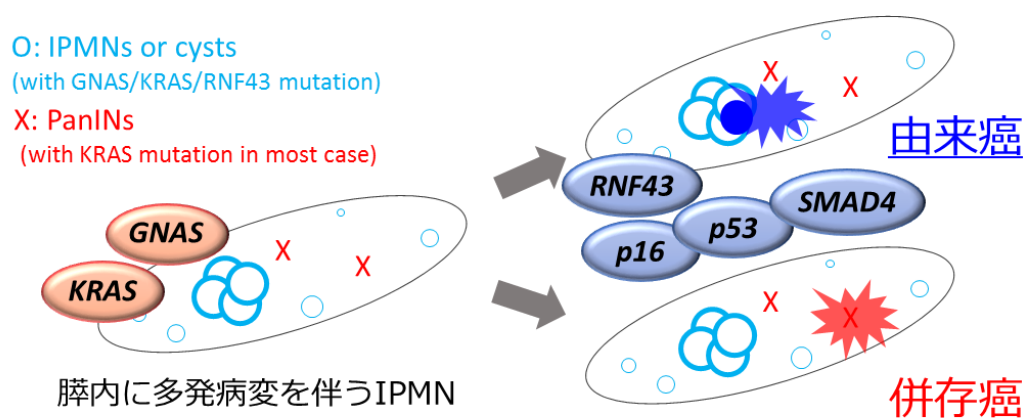


図 1：これまでに報告されている IPMN 関連膵癌の代表的な発生経路に関連する遺伝子

IPMN は種々の程度の構造異型および細胞異型を示す腫瘍細胞が膵管内に増殖し、粘液産生を伴い、一部の症例では浸潤癌が発生する。低異型度 IPMN (IPMN with low-grade dysplasia) は従来の腺腫、高異型度 IPMN (IPMN with high-grade dysplasia) は上皮内癌 (非浸潤性腺癌) に相当し、その進展は adenoma-carcinoma sequence を辿ると考えられている。Furukawa らは、IPMN において低異型度上皮と高異型度上皮の分布を 3

次元的に解析し、低異型度上皮は非連続性に多発して認められるが、高異型度上皮は多くの場合、一部の低異型度上皮に連続した領域を占めることを報告した³⁰。すなわち、低異型度腫瘍として発生した IPMN が、高異型度腫瘍へと段階的に進展することが示された。

前浸潤癌病変（膵管内病変）である IPMN が、基底膜を越え間質に浸潤したものは、IPMN 由来浸潤癌（IPMN with an associated invasive carcinoma、以下、由来癌）と称される。一方で、IPMN とは独立して（別部位に）、浸潤性膵管癌が発生する IPMN 併存膵癌（以下、併存癌）があり、IPMN 患者の生命予後に大きな影響を与える。

日本膵臓学会による基準では^{19, 31}、由来癌は「IPMN が画像所見、肉眼所見、組織学的所見で明らかで、浸潤性膵管癌との間に組織学的移行像があるもの」と定義され、その場合 IPMN は高異型度であることが前提となる。これに対し、併存癌は「IPMN と浸潤性膵管癌との間が組織学的に離れているもの」とされるが、IPMN と離れて膵癌が発生する症例と隣接して発生する症例がある。両者の確定困難例は「IPMN と浸潤性膵管癌が近接しているが、両者間に組織学的移行像が見出せないもの」と定義される。その原因として、①連続切片の作製がなされていない、②膵癌の広範囲もしくは塊状発育のため組織学的移行像が消失した、③別個に発生したが、IPMN と浸潤癌が衝突した、などの可能性が挙げられ、隣接して発生した併存癌は、しばしば画像・組織学的に由来癌との鑑別に難渋する。IPMN が低異型度であった場合は、腺腫が直接浸潤癌化するとは考えがたく、隣接した併存癌との診断が可能であるが、IPMN が高異型度であった場合には由来癌との鑑別は困難となる。

国際診療ガイドライン 2012 年版（Fukuoka Criteria、図 2）において IPMN の診療アルゴリズムが提唱された⁸。切除を考慮すべき指標として①膵頭部腫瘍による閉塞性黄疸、②嚢胞内に造影される充実成分、③主膵管径 ≥ 10 mm のいずれかの存在を“high-risk stigmata”として、また、それらがなかった場合でも、臨床所見が膵炎、画像所見から嚢胞径が ≥ 3 cm、嚢胞壁肥厚もしくは造影効果、主膵管径 5～9 mm、造影されない壁在結節、尾側膵の萎縮を伴う急な膵管径の変化、リンパ節腫大がある場合は“worrisome feature”として EUS による精査が推奨される。このアルゴリズムは国際診療ガイドライン初版のいわゆる Sendai Criteria⁹ と比較してその優位性が認められ、一般に普及しているが、これは IPMN 由来癌および高異型度病変を主に推定するものである。

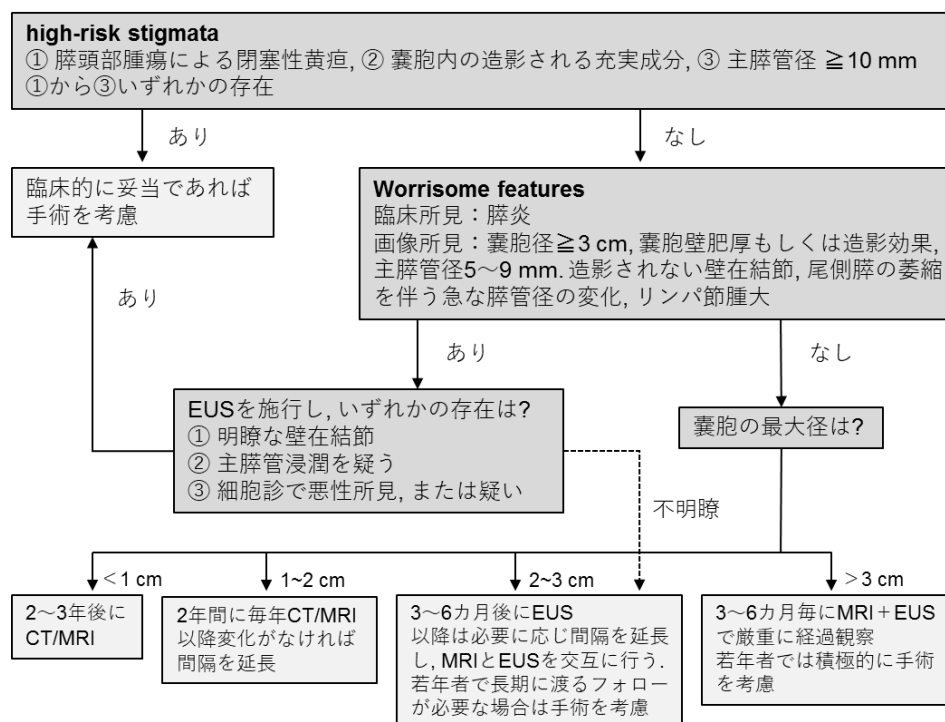


図 2：IPMN の診療アルゴリズム（国際ガイドライン 2012⁸より）

一方、IPMN 患者に発生する併存膵癌の頻度は 1.9～11.2%（表 1）、年率は 0.41%と報告されている。IPMN は早期膵癌発見の契機になる可能性があり、IPMN 例における膵全体の発癌リスクの認知および、CT、MRI、EUS を駆使した画像診断精査の重要性は自明である。しかし、併存癌は低異型度の胃型 IPMN に合併する例が多く、由来癌と異なり、IPMN 自体に“high-risk stigmata”や“worrisome features”が出現しないことが多いため²⁶、慎重な経過観察の中でも、進行膵癌の状態で見られることが少なくないのが現状である。また、2015 年には米国から“変化のない IPMN の経過観察は 5 年で打ち切るべき”とする医療経済を重視した AGA（American Gastroenterological Association）ガイドラインが発表されたが、IPMN の自然史を考慮したものか否か、議論の的となっている²⁷。画像診断法、観察期間や間隔を議論することに加え、膵液細胞診や、膵液、血清中の核酸やバイオマーカーを用いた新規の診断方法などを用いて、より有効かつ経済的な IPMN 患者の発癌リスク評価法を見出す必要がある。

表 1：IPMN 併存癌の発生頻度

著者	年	総数	併存癌例数	%	観察期間
Yamaguchi ¹⁰	2002	76	7	9.2%	-
Tada ¹¹	2006	80	2	2.5%	平均3.8年
Uehara ¹²	2008	60	5	8.0%	平均7.3年
Ohno ¹³	2009	73	3	4.1%	-
Ingakul ¹⁴	2010	236	22	9.3%	-
Kanno ¹⁵	2010	159	7	4.4%	-
Tanno ¹⁶	2010	168	9	5.4%	-
Ikeuchi ¹⁷	2010	145	5	3.5%	平均4.7年
Sawai ¹⁸	2010	103	2	1.9%	平均4.9年
Maguchi ⁵	2011	349	7	2.0%	中央値3.7年
Yamaguchi ¹⁹	2011	765	31	4.1%	-
Ohtsuka ²¹⁾	2012	172	17	9.9%	平均5.3年
Khannoussi ²¹	2012	53	2	3.8%	中央値7.3年
Ohno ²²	2012	142	2	1.4%	平均3.5年
Sahora ²³	2013	563	21	3.7%	-
He ²⁴	2013	130	5	3.8%	中央値3.2年
Ohtsuka ²⁵	2013	179	20	11.2%	-

IPMN 関連膵癌の予後

IPMN 由来癌、併存癌はいずれも IPMN 非関連の通常型膵癌よりも予後が良いとされるが、これは経過観察中に比較的ステージが早い段階で発見されることが主な要因と考えられ¹⁹⁾、生物学的に通常型膵癌に比して悪性度が低いかな否かは不明である。

IPMN 発生における *KRAS*、*GNAS* 変異の関与

IPMN の発生初期に関わるドライバー遺伝子として *KRAS* と *GNAS* が挙げられる^{32, 33, 54, 58}。*KRAS* は GTP 結合蛋白である RAS 蛋白をコードし、シグナル伝達経路のメディエーターとして細胞増殖を始めとした多くの細胞内情報伝達分子の上流に位置する。*KRAS* は通常型膵癌である浸潤性膵管癌の 95% 以上に活性化型変異が認められ、細胞増殖シグナル伝達経路の恒常的活性化をもたらす。その変異パターンはアミノ酸 12 番目のグリシンが変化する G12V、G12D、G12R が 80% 以上を占め、頻度の少ないものにアミノ酸 12 の他の変異 (G12C、A、S) や、アミノ酸 13、61、141 の変異がある (図 3)。前駆病変である膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) や IPMN に

においても *KRAS* 変異は高頻度に認められることから、通常型膵癌および IPMN の初期発生にはほぼ必須の遺伝子異常とみなされている^{32, 35} (図 4)。

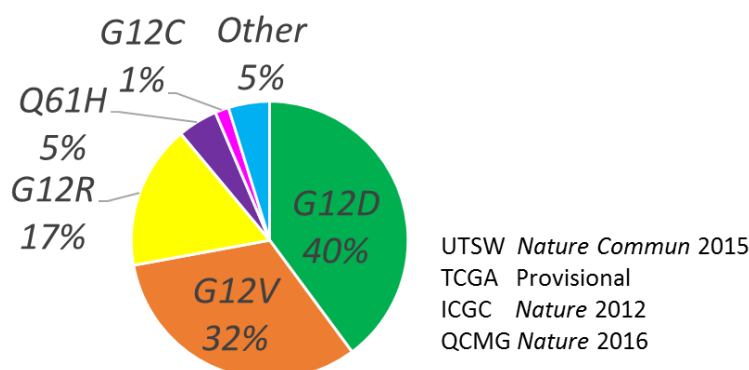


図 3：膵癌における *KRAS* のアミノ酸変異のバリエーションの内訳

GNAS は GTP 結合蛋白である G 蛋白刺激性 α サブユニット (G_{α}) をコードし、G 蛋白共役受容体シグナル伝達経路のメディエーターとして機能する。*GNAS* 変異は IPMN の 40-70% で認められ、アミノ酸 201 の R201H、R201C が多く、 G_{α} の活性化状態を遷延させる機能亢進性変異である。この経路は、cAMP の上昇を介して cAMP 依存性 A キナーゼ (protein kinase A; PKA) を活性化する。IPMN の発生、進展において実際にどのような役割を担うのかは完全には明らかにされていないが³²、変異 *GNAS* と変異 *KRAS* を膵特異的に発現するコンディショナルトランスジェニックマウスは IPMN 類似の腫瘍が発生することが報告されており³⁶、*GNAS* 変異が IPMN の特徴的な表現型を司る原因であることが示唆されている (図 4)。通常型膵癌では *GNAS* 変異は認められておらず、浸潤癌に *GNAS* 変異が確認されれば、IPMN 由来癌と判断する根拠とされる。

IPMN 進展における腫瘍関連分子の遺伝子変異と蛋白発現

膵癌に高頻度で見られる遺伝子異常として *TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A/p16* の 3 つの遺伝子が挙げられ、*KRAS* と併せ “Big 4” と称され、IPMN の癌化過程に関与することが報告されている^{37, 50, 55} (図 4)。*TP53* は DNA 傷害の修復、アポトーシスを惹起し、細胞増殖サイクルの抑制を制御するが、通常型膵癌では 70%、由来癌では 45% に *TP53* の機能喪失性変異を認め、変異 *TP53* は MDM2 による分解調節に抵抗性となって核内蓄積を招くことから、免疫組織化学染色では核内に陽性を呈する^{38, 43}。*SMAD4* は TGF- β

経路のメディエーターで、膵癌では 50-70% で、由来癌では 39% に機能喪失性変異を認め、免疫組織化学染色では発現が消失する^{38, 43}。*CDKN2A/p16* は細胞周期抑制機能を持ち、膵癌の 30% で機能喪失性変異を認め、変異のない例でもエピジェネティックな異常により膵癌の多くで不活性化し、免疫組織化学染色では発現が消失する^{39, 43}。また、WNT シグナル伝達経路のメディエーターとして機能する β -catenin は *CTNNB1* にコードされ、正常細胞では細胞膜に局在するが、WNT 経路が異常になると核内移行により核に発現するようになる。

Kuboki らは、p53 の核陽性像、SMAD4 の発現消失はいずれも浸潤癌に、亜型別には膵胆道型 IPMN および管状腺癌により高頻度に認められること、 β -catenin の核内発現は低異型度 IPMN に比して、高異型度 IPMN、および浸潤癌に、亜型別には腸型 IPMN および粘液癌に高頻度に認められることを報告した³⁴。このことから、p53 と SMAD4 の異常は非浸潤癌（高異型度 IPMN）から浸潤癌への進行に、 β -catenin の異常は低異型度から高異型度 IPMN の進行に関与していることが推察される。

さらに WNT シグナル経路関連因子として、E3 ユビキチンリガーゼをコードし、プロテアーゼによる蛋白分解に関与する RNF43 は、frizzled receptor を標的とし、WNT シグナルを遮断する働きがある³²。*RNF43* 変異（機能喪失性変異）を持つ膵癌細胞では WNT 信号依存性の増殖シグナルが亢進することから、*RNF43* は腫瘍抑制遺伝子として機能することが示唆される⁴⁰。この遺伝子変異は IPMN の 14% に認められ、*GNAS* 変異と同時に認められることが多い⁴¹。

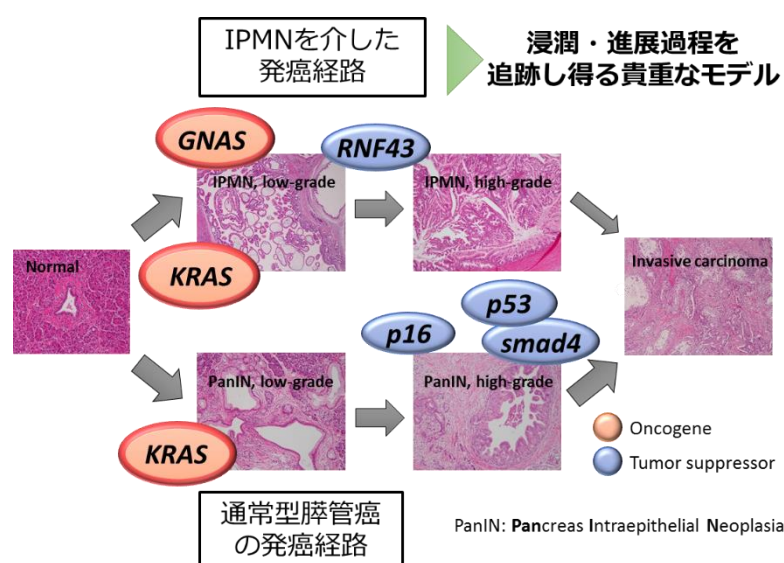


図 4：報告されている IPMN と通常型膵管癌の発癌経路における代表的な遺伝子

次世代シーケンサーを用いた IPMN 関連膵癌の分子病理学的解析

現在、次世代シーケンサー（next generation sequencer : NGS）は研究面で広く用いられ、多くの疾患において責任遺伝子の同定が進んでいる。これまでのシーケンサーとは異なる原理で、ゲノム DNA を 100-200 bp のリードに分割して、非常に高速に配列を解析するもので、ヒトゲノム約 30×10^8 bp を読み進めるのに約 1 回で行うことができるものもある。全ゲノムシーケンスや全エクソームシーケンスは検査にかかる費用や時間の面から臨床応用は限定的であったが、近年、標的アンプリコンシーケンスやキャプチャーシーケンスで標的遺伝子を効率よく低コストで検索することができるようになった。しかしながら、NGS を用いた IPMN 関連膵癌の発癌機構に関する研究成果の報告は少ないのが現状である。

本研究の目的と概要

本研究では、詳細な病理学的解析と NGS を用いた遺伝子変異解析を行い、分子病理学的なアプローチにより、同一膵内における IPMN 関連膵癌の発育進展経路の追跡を行うことで発癌機構の解析を試みた。IPMN は多中心発生並びに field defect を特徴とする膵癌前駆病変であるが、これまで、IPMN 関連膵癌の遺伝子異常を検索した報告は散見されるものの^{34, 39, 47, 48, 49}、同一膵内に分布する低異型度 IPMN や高異型度 IPMN と併せた多段階的な解析や、背景膵に多発する多彩な膵管内病変を詳細に解析した報告はない。膵切除検体に捉えられた「スナップショット（膵切除時点での多彩な病変の分布と異型度）」から、地理的、経時的な癌進展の成り立ちを紐解くためには、形態と連続性を丁寧に見直し、それぞれの病変における遺伝子異常を幅広く解析する必要がある。

そこで、IPMN 関連膵癌手術検体の全割標本において、IPMN と浸潤癌、さらに背景膵における微小な膵管内腫瘍性病変を病理学的に詳細にマッピングし、各病変から個別に DNA を抽出し、代表的な膵癌・IPMN 関連の 18 遺伝子を網羅するように設計したカスタムパネルを用いて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 PGM システムを使用）。さらに 免疫組織化学染色にて、p53 を始めとする 5 個の癌抑制遺伝子の蛋白質発現異常を検討した。同一膵内の各病変から取得された分子プロファイルから、ドライバー遺伝子 (*KRAS*, *GNAS*) 変異をマーカーとしてクローナリティーを評価し、異型度の進展や浸潤癌の発生に伴い蓄積される遺伝子異常、および臨床病理像の対比による新規の分子病理学的分類を試みた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
BRAF	B-Raf
BD	branch duct
ca.	carcinoma
CDKN2A/p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/p16
CDX2	caudal type homeobox 2
CI	confidence interval
CIS	carcinoma in situ
CT	computed tomography
CTNNB1	catenin beta-1
ddPCR	digital droplet polymerase chain reaction
DFS	disease free survival
DNA	deoxyribonucleic acid
EUS	endoscopic ultrasound
EUS-FNA	endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
fs	frameshift
GNAS	G-protein α subunit
H&E	hematoxylin and eosin
HG	high-grade dysplasia
HR	hazard ratio
IDH1	isocitrate dehydrogenase-1
INV	invasive cancer
IPMN	intraductal papillary mucinous neoplasm
KDM6A	lysine demethylase 6A
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LCM	laser capture microdissection
LG	low-grade dysplasia
MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
MDM2	mouse double minute 2 homolog

MNL	microscopic neoplastic lesion
MPD	main pancreatic duct
MRI	magnetic resonance imaging
MRCP	magnetic resonance cholangiopancreatography
MUC1	mucin 1
MUC2	mucin 2
MUC5AC	mucin 5AC
MUC6	mucin 6
N.D.	not determined
NGS	next generation sequencer
NM	needle microdissection
OS	overall survival
PanIN	pancreatic intraductal neoplasia
Pb	pancreatic body
PB	pancreatobiliary
PCR	polymerase chain reaction
PDA	pancreatic ductal carcinoma
Ph	pancreatic head
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α
Pt	pancreatic tale
RBM10	RNA binding motif protein 10
RNF43	ring finger protein 43
S.F.	stainig failure
SF3B1	splicing factor 3B subunit 1
SMAD4	sma and mad homolog 4
STK11	serine/threonine kinase 11
TGF	transforming growth factor
TGFBR1	transforming growth factor receptor 1
TGFBR2	transforming growth factor receptor 2
TP53	tumor protein 53
UICC	Union for International Cancer Control
VUS	variant unknown significance
WHO	world health organization
WT	wild type

【実験方法】

1) 対象症例

手稲溪仁会病院および札幌東徳洲会病院において、2011 年から 2016 年 6 月までに膵切除が施行された膵癌患者 284 症例中、IPMN と浸潤癌が共に切除膵に含まれたのは 39 症例であった。浸潤部が微小で十分な遺伝子解析が行えないと判断した IPMN 由来浸潤癌 7 例と併存膵癌 2 例を除外し、30 症例を解析対象とした。30 症例中 3 症例は術後に浸潤癌として再発し、再発病変も本検討に加えた。本研究は手稲溪仁会病院倫理委員会による承認（承認番号：RIN2014-49、多 2017-162）、徳洲会グループの人体研究に関する倫理委員会による承認（承認番号：TGE00369-012）、および個別同意取得のもとに行われた。

2) 臨床所見の検討

解析対象である 30 症例について、性別、年齢、膵癌発見の契機、IPMN に対する経過観察の有無、膵癌家族歴、多臓器癌合併の有無、CT、MRCP、EUS 画像所見、予後データなどを集積した。

3) 病理組織学的検討

膵切除検体は 10%緩衝ホルマリン液で固定後、5 mm 幅で全割し、全てパラフィン包埋してホルマリン固定パラフィン包埋（formaldehyde-fixed paraffin-embedded, FFPE）組織を作製した。作製した FFPE ブロックは症例あたり 17 から 72 個（平均 33.8 個±標準偏差 12.4 個）であった。また非腫瘍部として、脾臓もしくは十二指腸の FFPE 組織を作製した。FFPE 組織から 4 μ m 厚切片を作製し、hematoxylin & eosin（H&E）染色を施行した。IPMN と浸潤癌に加え、肉眼的に病変のない背景膵実質に存在する PanIN や incipient IPMN を含む顕微鏡的な膵管内腫瘍性病変の分布を示す詳細なマッピング図を作製した（図 5、図 6）。

H&E 標本を 3 人の一般病理医および 2 人の膵腫瘍病理専門医で検討し、WHO 分類第 4 版（2010 年発行）²⁸ および Baltimore 分類⁴² に基づき、IPMN の異型度（低異型度、高異型度）および上皮型（胃型、腸型、胆膵型、好酸性細胞型）を決定した。上皮型決定に際し、MUC1、MUC2、MUC5AC、MUC6 および CDX2 免疫組織化学染色所見を参考にした。IPMN と浸潤癌の組織学的移行像（図 5）の有無と両者の位置関係、IPMN の異型度や浸潤癌の組織型を検討し、IPMN 由来癌と併存癌を形態学的に分類した^{19, 31, 42}。

臨床画像的に明らかな IPMN の所見を呈し、フォローアップ対象となっていた IPMN もしくは、浸潤癌巣に最も近い IPMN を“co-existing IPMN”と定義した。また背景膵実質に存在する径 5 mm 以下の顕微鏡的な膵管内腫瘍性病変を microscopic neoplastic lesion (MNL) と定義した。浸潤癌および IPMN から 10 mm 以上離れた顕微鏡的病変を対象とすることにより、浸潤癌の膵管内進展 (intraductal cancer spread) と IPMN の辺縁像の可能性を除外した。低異型度 IPMN、高異型度 IPMN、浸潤癌、MNL を関心領域に設定し、遺伝子解析および蛋白発現解析を行った。MNL は 1 腺管 (膵管)、もしくは複数の腺管 (膵管) からなる病変の pool sample を用いて解析した。解析対象となった低異型度 IPMN、高異型度 IPMN、浸潤癌、MNL の総数は 169 サンプルで、1 症例あたり 3 から 14 サンプル (平均 5.6 サンプル) であった。マッピング図を基に、IPMN と浸潤癌間の距離を計測した (図 6)。上記の基準を満たす MNL の個数を標本上で計数した。膵臓自体の大きさや膵管内病変による膵萎縮の程度、IPMN もしくは浸潤癌の進展による MNL 計数困難な領域は症例毎に異なるため、MNL 数を組織学的評価可能であった標本枚数で除し標準化を試みた。

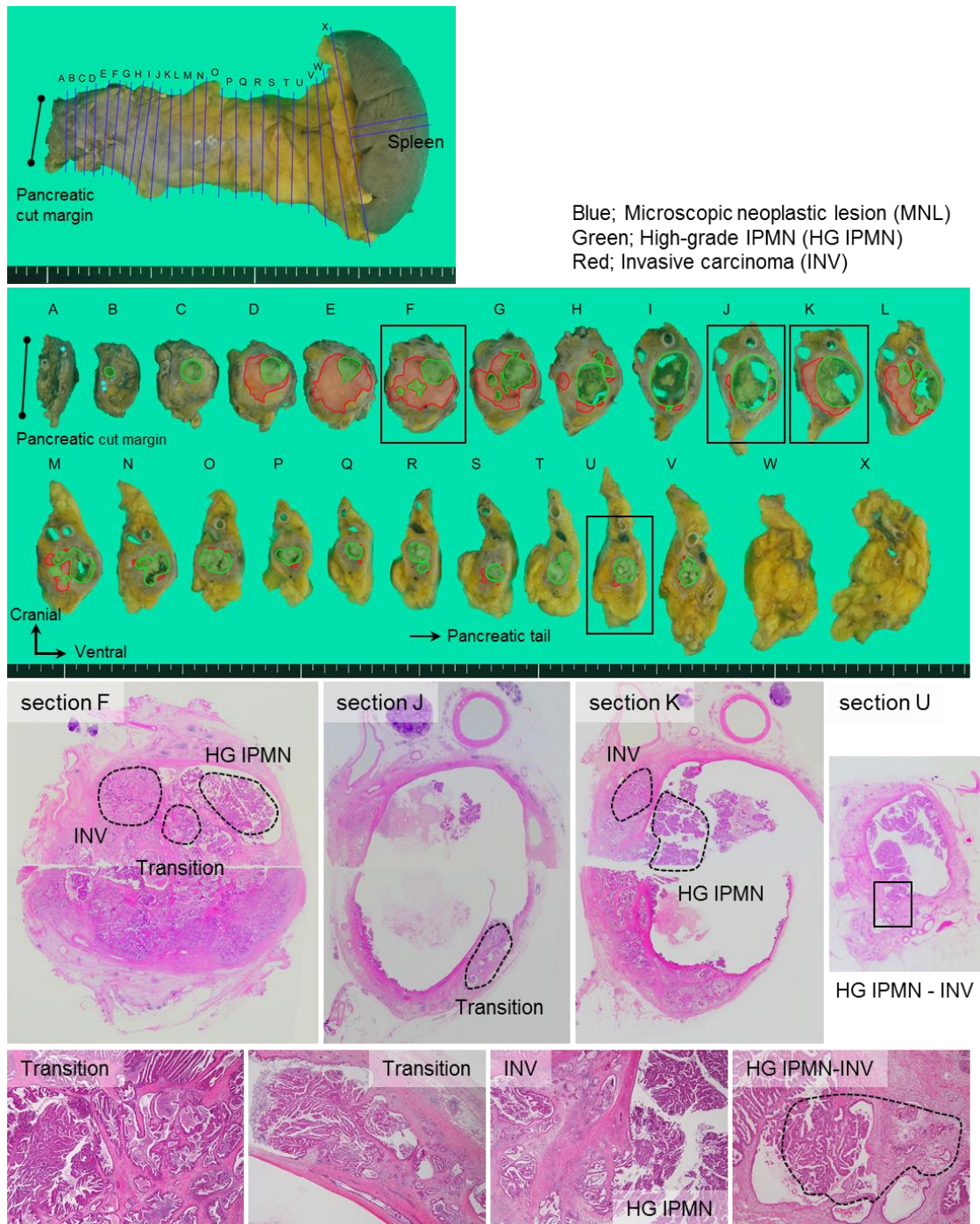


図 5：IPMN 由来癌のマッピング図作製例（case 2）

（上段）膵体尾部切除後ホルマリン固定検体。（2 段目）主膵管に垂直に 0.5 cm 幅で切り出した断面と腫瘍マッピング。（3 段目）断面 F、J、K、U のルーペ像を示す。（4 段目）その拡大像。非連続的に認められた HG IPMN から浸潤癌への組織学的移行像を示す。Transition, 組織学的移行部; INV, invasive cancer.

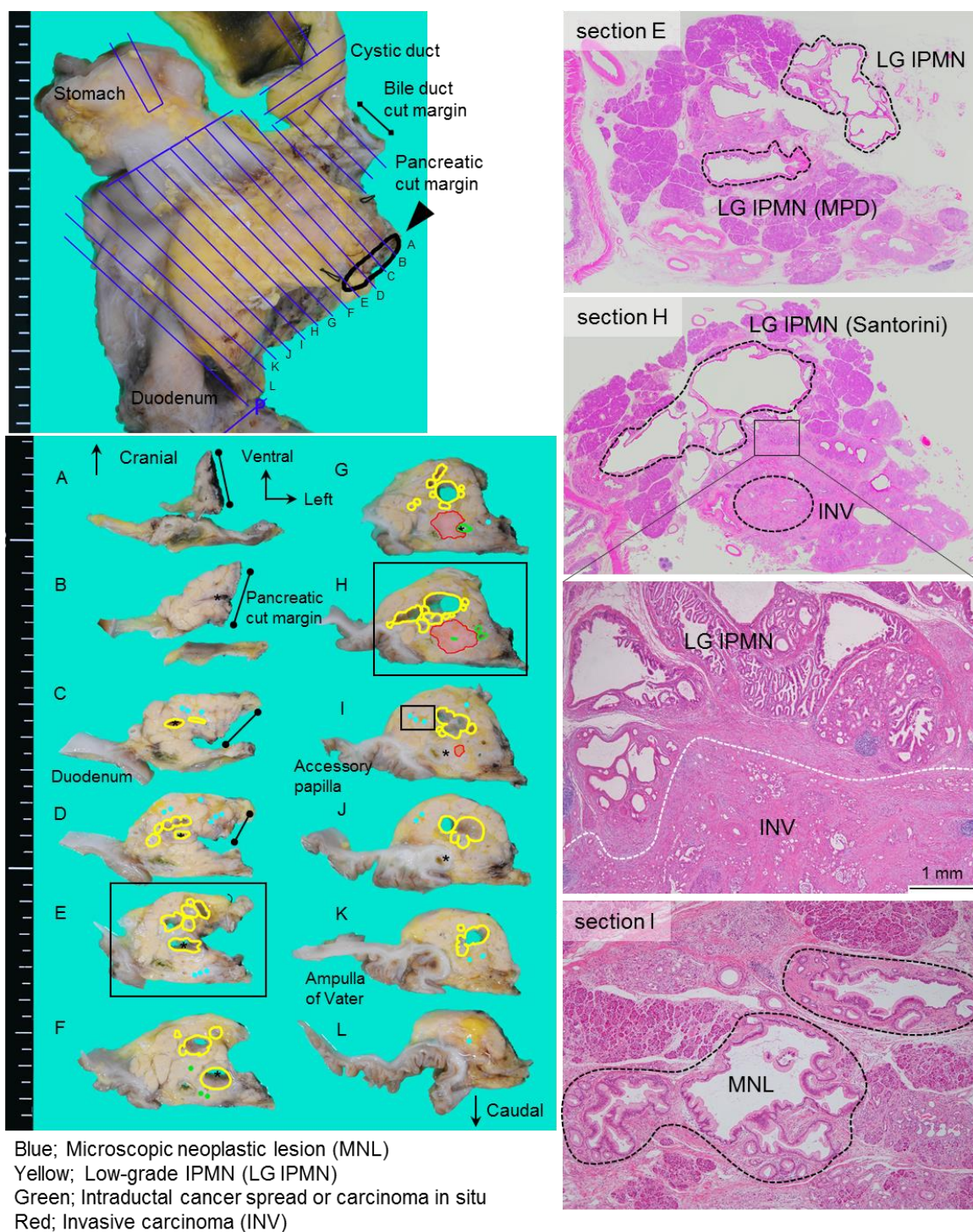


図 6 : IPMN に隣接した併存癌のマッピング図作製例 (case 13)

(左上) 脾頭十二指腸切除後ホルマリン検体。(左下) CT 断で 0.5 cm 幅で切り出した断面と腫瘍マッピング。(右上段) 断面 E のルーペ像。(右 2 段目) 断面 H のルーペ像。(右 3 段目) 断面 H のマイクロ像。LG IPMN と浸潤癌 (INV) は近接するが、組織学的移行像は見られない。(右 4 段目) 顕微鏡的腫瘍性病変 (MNL) のマイクロ像。

4) 免疫組織化学染色

FFPE 検体から解析対象病変部分を選択した後、4 μm に薄切し、同一切除腓における複数の病変組織を 1 枚のスライドグラスに貼付したコンポジット標本（図 7）を作製し、H&E 染色と各種の免疫組織化学染色を施行した。選択した各病変から DNA を採取し遺伝子解析を行うことで、組織像、蛋白発現、遺伝子解析から得た各情報の統合が可能であった。薄切標本をキシレンで脱パラフィン化し、エタノールで再水和し、pH 9.0 のエチレンジアミン四酢酸（ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA）緩衝液中で抗原を賦活化した。一次抗体として抗 MUC1 抗体（NCL-MUC-1, clone MA552, 1:100, Leica Biosystems, Vetzlar, Germany）、抗 MUC2 抗体（NCL-MUC2, 1:200, Leica Biosystems）、抗 MUC5AC 抗体（NCL-MUC5AC, 1:100; Leica Biosystems）、抗 MUC6 抗体（NCL-MUC6, 1:100; Leica Biosystems）、抗 CDX2 抗体（Clone DAK-CDX2; DAKO, Glostrup, Denmark）、抗 p53 抗体（DO-7, 1:100; DAKO）、抗 Sma and Mad homolog 4（SMAD4）抗体（B-8, 1:100; Santa Cruz Biotech）、抗 p16 抗体（E6H4; Roche）、抗 RNF43 抗体（HPA008079, 1:100; Sigma-Aldrich）、抗 β -catenin 抗体（14, 1:800; BD Transduction Laboratories）を用いて、自動免疫染色装置（Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ, USA）でポリマー法にて行った。MUC1、MUC2、MUC5AC、MUC6 と CDX2 免疫染色は IPMN 上皮型の決定に使用した。p 53 は核のびまん性強発現³⁹、および完全な発現消失⁶⁷を蛋白発現異常と判定した。SMAD4 は核染色性消失³⁹と弱陽性（haploinsufficiency⁴⁴）を蛋白発現異常と判定した。p16 は核染色性消失^{40, 44}及び、びまん性の核強発現を蛋白発現異常と判定した。 β -catenin は核内集積を蛋白発現異常³⁵と判定した。RNF43 は核染色性消失を蛋白発現異常⁴²と判定した（図 8）。

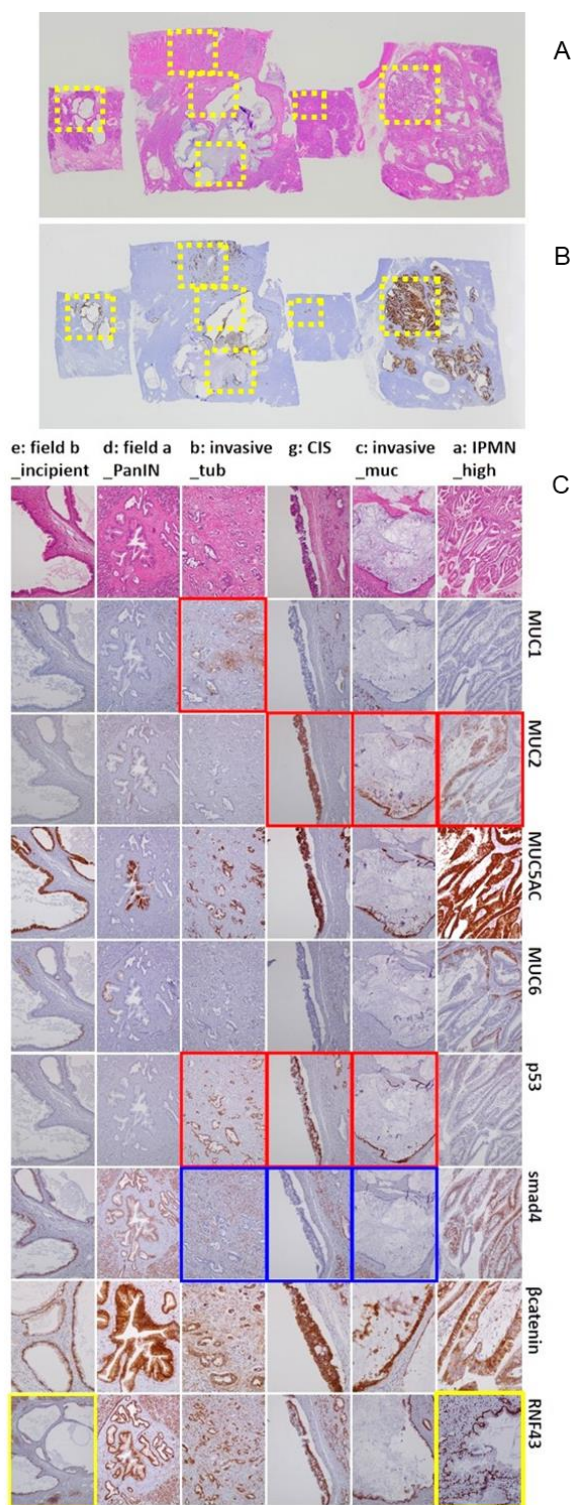


図 7：コンポジット標本の作製と免疫組織化学染色パネル

(A) 関心領域のみを切り抜き、まとめたコンポジット標本における H&E 染色標本、(B) 免疫組織化学染色標本。黄点線枠の領域から DNA を抽出した。(C) 各病変における HE 像と免疫組織化学染色像のパネル。赤枠；発現上昇、青枠；発現消失、黄枠；部分的な消失。

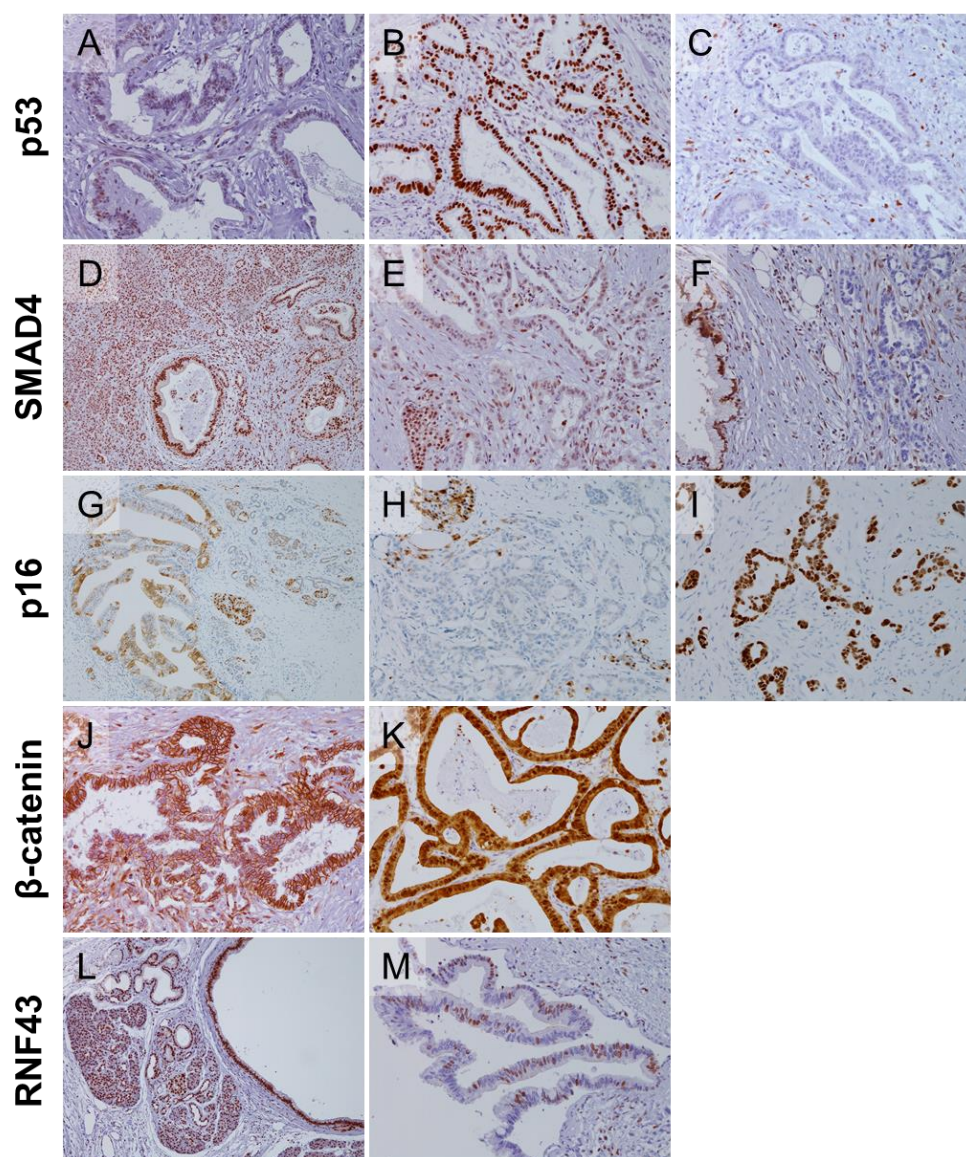


図 8：免疫組織化学染色の評価基準

(A) p53 の疎らな核弱陽性をみる正常発現パターン、(B) p53 の核強陽性をみる蛋白過剰発現パターン、(C) p53 の核発現完全消失をみる異常発現パターン。(D) SMAD4 の核陽性をみる正常発現パターン、(E) SMAD4 の核弱陽性をみる haploinsufficiency が示唆されるパターン、(F) SMAD4 の核発現消失をみる異常発現パターン。(G) p16 のモザイク状の核、細胞質発現をみる正常発現パターン、(H) p16 の核発現消失をみる異常発現パターン、(I) p16 がびまん性に核強発現をみるパターン。(J) β -catenin が細胞膜に局在する正常発現パターン、(K) β -catenin 核内集積をみる異常発現パターン。(L) RNF43 の核陽性をみる正常発現パターン、(M) RNF43 のバーコード状に核発現消失をみる異常発現パターン。

5) NGS による遺伝子解析

(i) Needle microdissection を用いた腫瘍組織の採取 (図 9、図 10)

FFPE 組織を 10 μm で薄切し、未染色状態で顕微鏡 (Nikon, ECLIPSE 80i) 観察下に、23G 針で関心領域をくり抜き、レーザー刃で FFPE 組織を採取した (図 9)。顕微鏡下で採取部位を選択することで、可能な限り非腫瘍性細胞を除外し、採取組織内の腫瘍細胞率の濃縮を目指した。関心対象が衝突 (隣接) していない場合、1 mm 以下の MNL においても needle microdissection (NM) により腫瘍の個別採取が可能であった (図 10)。十分な DNA 採取のため、NM を用いた場合は腫瘍細胞数 5,000 個以上の採取を目標とした。採取範囲における腫瘍細胞の炎症細胞や間質細胞を含めた全細胞に対する比率 (10~100%) を目視にて判定した。胚細胞変異除外のため、症例毎に非腫瘍部として脾臓もしくは十二指腸から組織を採取した。

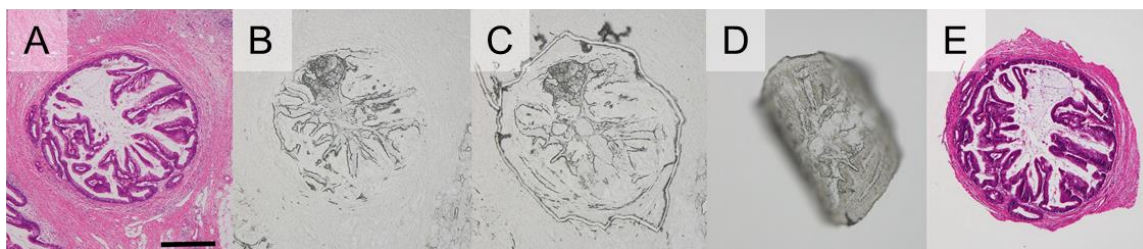


図 9 : Needle microdissection の方法 (IPMN の採取例)

(A) 関心領域の HE 像を確認する。Scale bar 1 mm。(B) 10 μm 厚で薄切した未染色状態の FFPE 組織。(C) 顕微鏡観察下に 23G 針で腫瘍部のみをくり抜く。

(D) レーザー刃で関心領域の FFPE 組織を採取する。(E) 採取組織を HE 染色し、病変部が適切に採取されていることを確認した。

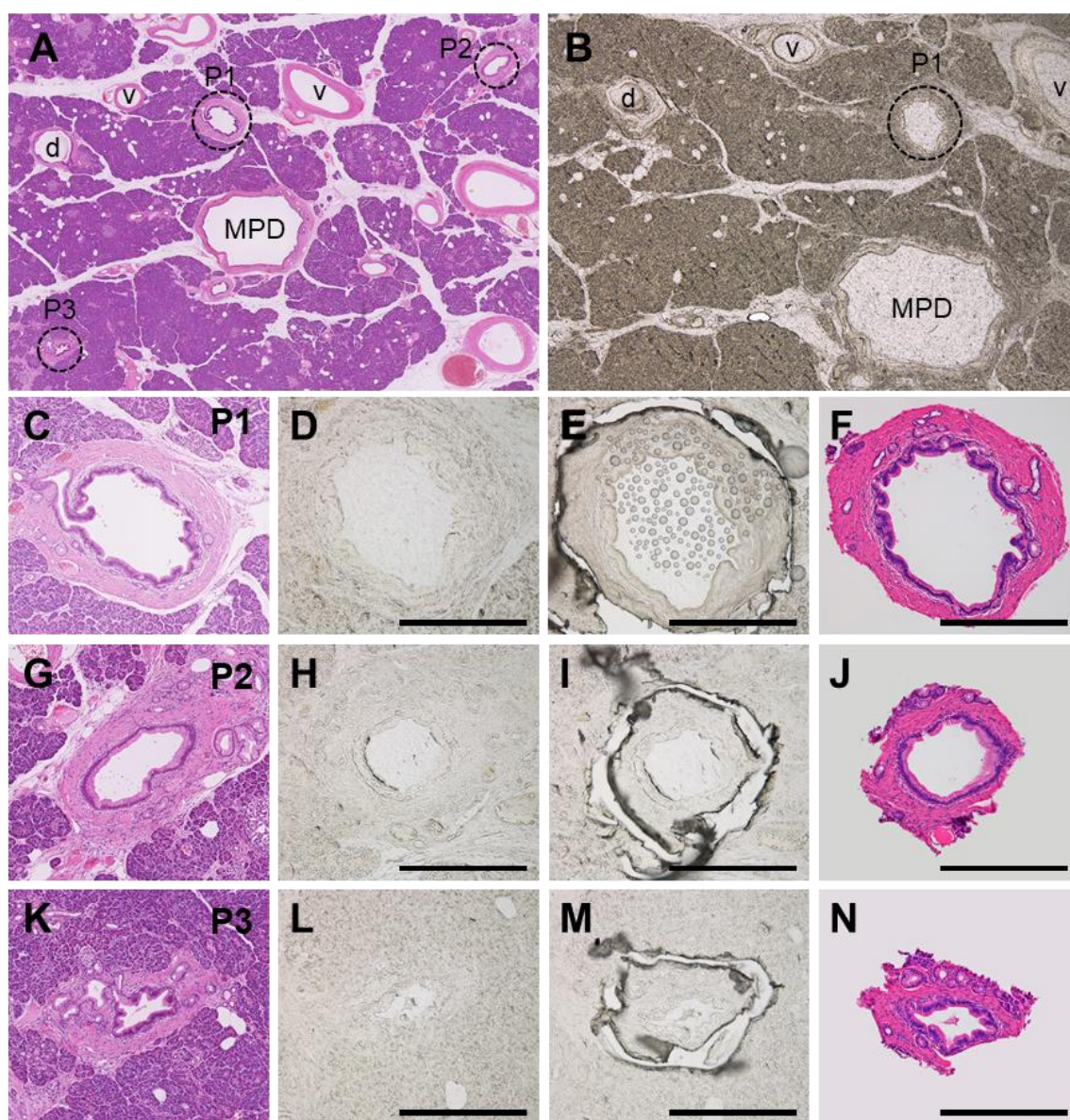


図 10 : Needle microdissection の方法 (MNL、pool sample の採取例)

(A, C, G, K) HE 標本で、関心領域 (P1、P2、P3) と周囲の主膵管 (MPD)、血管 (v)、非腫瘍性膵管 (d) の位置関係と組織像を確認する。(B, D, H, L) 10 μ m 厚で薄切した未染色状態の FFPE 組織、対物 4 倍視野 (B)、対物 20 倍視野 (D, H, L)。採取対象の膵管病変 (P1) は、主膵管や血管との位置関係から視認可能である。(E, I, M) 顕微鏡観察下に 23G 針で膵管のみをくり抜く。(F, J, N) レーザー刃で組織を採取し、HE 染色で病変部が適切に採取されていることを確認した。Scale bar 0.5 mm。

(ii) Laser capture microdissection を用いた腫瘍組織の採取 (図 11)

FFPE 組織を 10 μm で薄切し、laser capture microdissection (LCM) 用スライド (Leica, PEN-Membrane 2,0 μm) を用いて LCM 用標本を作製し、HE 染色を施行した。LMD6500 (Leica) を用いて、関心病変の FFPE 組織を採取した。LCM は微小病変や隣接する関心領域を取り分ける際に用いた。LCM を用いた場合、DNA 抽出量が needle microdissection に比較し、採取細胞数あたりの DNA 抽出量が約 1/3 から 1/5 であったため、腫瘍細胞数 50,000 個以上の採取を目標とした。また浸潤癌よりも腺管内病変では採取細胞数あたりの DNA 抽出量が低値の傾向があった (図 12)。

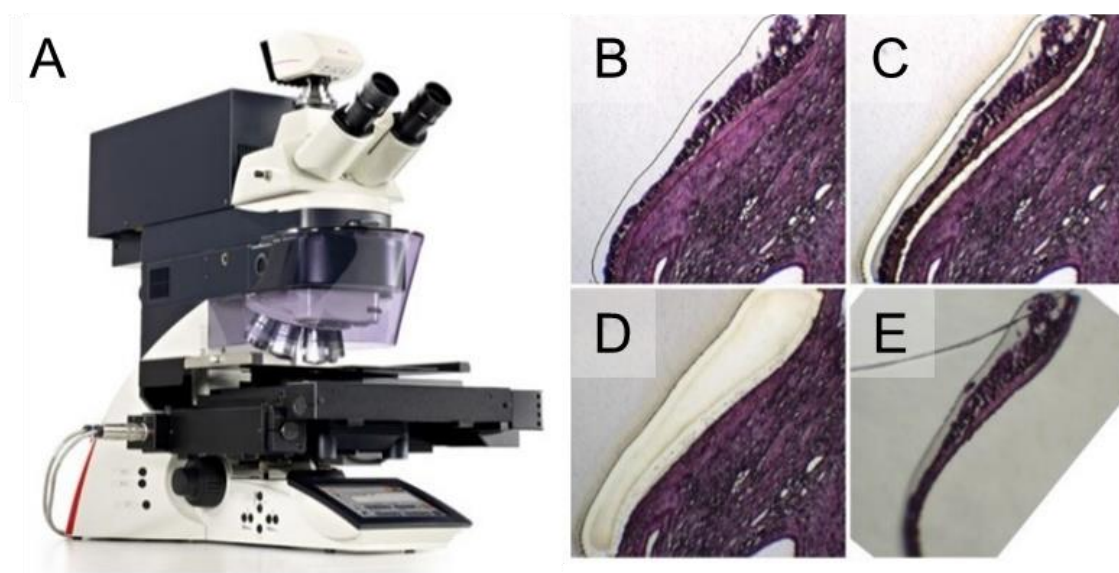


図 11 : Laser capture microdissection の方法

(A) LMD6500, Leica。(B) マイクロダイセクション前。10 μm 厚で薄切し HE 染色した標本を、LMD6500 のステージにセットし、標的領域をパソコン画面上で選択する (黒線)。(C) レーザーでカットする (白線状)。(D) マイクロダイセクション後の状態。(E) マイクロダイセクションされた組織の確認。

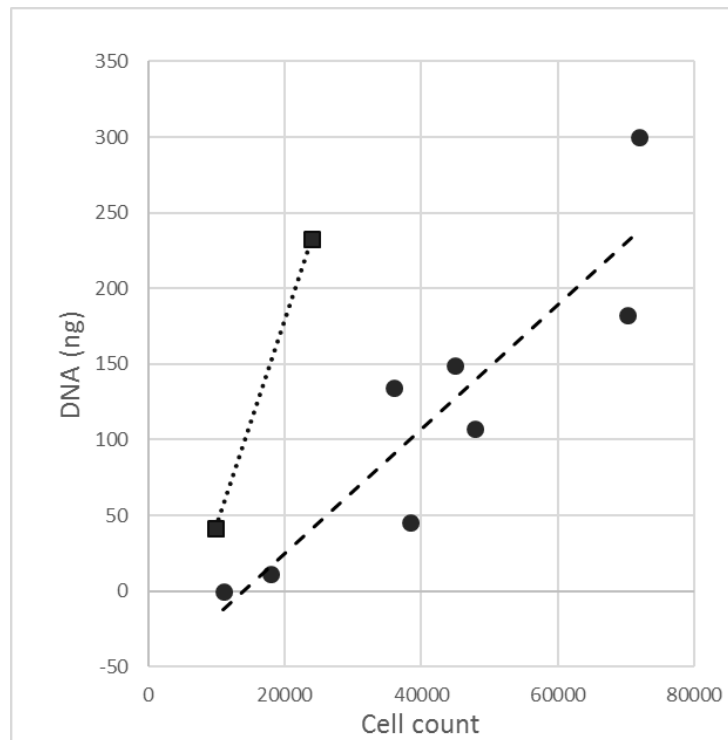


図 12 : Laser capture microdissection での腫瘍細胞数と抽出 DNA 量の関係

■浸潤癌、●膵管内病変とそれぞれの近似曲線。膵管内病変は浸潤癌よりも細胞あたりの DNA 抽出量が低値な傾向があり、安定して 100 ng の DNA を抽出するには約 40,000 個の細胞採取が必要であった。

(iii) ゲノム DNA の抽出

採取した FFPE 組織から、GeneRead DNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてゲノム DNA を抽出した。NM にて採取したサンプルでは、抽出方法はキット添付のマニュアルに従った。LCM にて採取したサンプルでは、添付のプロトコルを基に、Proteinase K 20 ul を追加し、56℃ にて 16 時間溶解を行った。ゲノム DNA の濃度は Qubit fluorometer 2.0 および Qubit dsDNA HS assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて測定した。

(iv) ターゲットアンプリコン解析のためのパネル設計

膵癌と IPMN に関連した 18 遺伝子のアンプリコンシーケンスパネル (Ion AmpliSeq Custom DNA Panel) を設計した (図 13、表 2)。*KRAS*、*TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A/p16*、*GNAS*、*ARID1A*、*BRAF*、*CTNNB1*、*IDH1*、*KDM6A*、*PIK3CA*、*RBM10*、*SF3B1*、*STK11*、*TGFBR1*、*TGFBR2* の 17 遺伝子で

は膵癌・IPMN との関連が報告されている hot spot を含む領域を標的として、*RNF43* は全エクソン領域を標的として、カスタムパネル作製専用 Web サイトである Ion Ampliseq Designer (<https://www.ampliseq.com>) を用いて、標的領域の 99.59% をカバーするシーケンスパネルを設計した。

カスタムパネルはアンプリコン総数 220 個から成り、アンプリコンサイズは 67~105 bp (平均 87 bp) であった。2 つの primer pool に分かれ、プライマーの総塩基長は 17.8 kb であった。

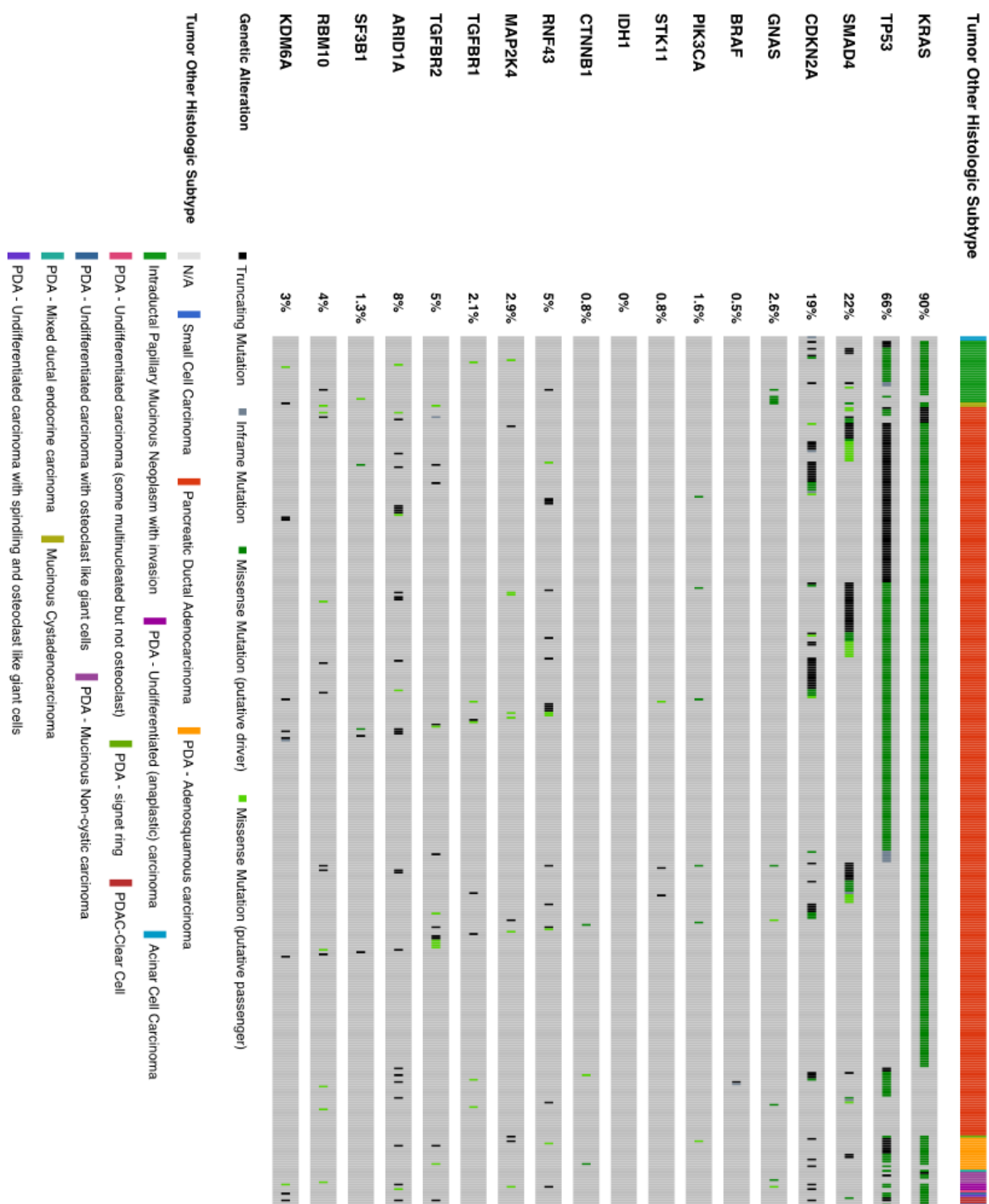


図 13：既に報告されている膵癌における関連 18 遺伝子の変異頻度
(cBioPortal Web サイトより引用 [http://www.cbioportal.org/])

表 2：膵癌と IPMN に関連した 18 遺伝子のアンプリコンシーケンスパネル

Amplicon No.	Chromosome	Start	End	Gene	Main Hotspots
1	chr1	27023416	27023515	ARID1A	S178C (COSM3771707)
2	chr1	27023503	27023594	ARID1A	Y229* (COSM3771708),Y216S (COSM4809210)
3	chr1	27023688	27023773	ARID1A	GGPS277GGPSdel
4	chr1	27023791	27023885	ARID1A	P320Pdel_fs
5	chr1	27056098	27056186	ARID1A	splicing_site (COSM3785246),Q393* (COSM51446)
6	chr1	27056201	27056290	ARID1A	Q420* (COSM3386055),G414E (COSM39850)
7	chr1	27057708	27057788	ARID1A	Q482Q_for_deletion (COSM266034),H495Q (COSM5001656)
8	chr1	27057732	27057827	ARID1A	H495Q (COSM5001656),Q482Q_for_deletion (COSM266034),Q507R (COSM3377104)
9	chr1	27057846	27057941	ARID1A	Q529* (COSM133027),S523Y (COSM3386056),Q546* (COSM96944)
10	chr1	27057971	27058053	ARID1A	Q563* (COSM51426)
11	chr1	27058033	27058117	ARID1A	S593fs*26 (COSM51462)
12	chr1	27059167	27059238	ARID1A	Q611H ,S614* (COSM1578112)
13	chr1	27059197	27059282	ARID1A	S614* (COSM1578112),S634A (COSM3386057)
14	chr1	27087327	27087404	ARID1A	splicing_site (COSM2235438),G655* (COSM4965578),M651fs*25 (COSM133024)
15	chr1	27087454	27087550	ARID1A	R693* (COSM184236)
16	chr1	27088639	27088718	ARID1A	Q766* (COSM3377105),Q766fs*51 (COSM133025)
17	chr1	27088739	27088831	ARID1A	G801fs*32 (COSM1659160)
18	chr1	27089494	27089580	ARID1A	Y823fs*49 (COSM1168673),Y823fs*49 (COSM1159110)
19	chr1	27089625	27089711	ARID1A	Q878* (COSM251399)
20	chr1	27092693	27092779	ARID1A	G922D (COSM184237),Q920* (COSM4401613)
21	chr1	27092768	27092848	ARID1A	Q944* (COSM130413)
22	chr1	27092982	27093072	ARID1A	A978fs*3 (COSM1159149),splicing_site (COSM133031),M981* (COSM96942)
23	chr1	27094334	27094424	ARID1A	R1020K (COSM51863),E1032Eins_fs
24	chr1	27094457	27094546	ARID1A	G1063V (COSM4807291)
25	chr1	27097594	27097680	ARID1A	W1073fs*32 (COSM4663223)
26	chr1	27097621	27097708	ARID1A	Q1095* (COSM1296223),Q1098* (COSM1192095),W1073fs*32 (COSM4663223)
27	chr1	27099342	27099431	ARID1A	Q1212* (COSM254541)
28	chr1	27099420	27099490	ARID1A	YEPNK1226*
29	chr1	27099866	27099959	ARID1A	R1276* (COSM83884)
30	chr1	27100136	27100223	ARID1A	Q1335del (COSM133030),R1335* (COSM907723),Q1334del (COSM298325),Q1334delQinframe (COSM1578346)
31	chr1	27100322	27100417	ARID1A	Y1362* (COSM3386058)
32	chr1	27100996	27101087	ARID1A	G1450S (COSM1734086),R1446* (COSM907726),A1434V
33	chr1	27101191	27101283	ARID1A	G1495fs*11 (COSM4998739)
34	chr1	27101255	27101352	ARID1A	N1540Ndel_fs ,R1528* (COSM51475)
35	chr1	27105495	27105579	ARID1A	R1722L (COSM1341422)
36	chr1	27105751	27105832	ARID1A	E1802* (COSM1296227),N1800Y
37	chr1	27105878	27105962	ARID1A	G1847fs*36 (COSM51434),D1850fs*4 (COSM133004),G1848fs*6 (COSM51420)
38	chr1	27105959	27106048	ARID1A	A1872V (COSM1734087),HA1871HAdel_fs
39	chr1	27106149	27106244	ARID1A	G1926A_for_fs (COSM414503),R1950W (COSM4965766),K1928N (COSM4998905),Q1947* (COSM2235552)
40	chr1	27106284	27106375	ARID1A	S1985fs*13 (COSM85584),W1973* (COSM4808707),R1989* (COSM51425)
41	chr1	27106434	27106517	ARID1A	Q2026* (COSM218428),Y2031Yins ,E2032* (COSM4999331)
42	chr1	27106485	27106573	ARID1A	E2054* (COSM1172130)
43	chr1	27106568	27106653	ARID1A	L2064H (COSM4961597),V2084G (COSM3386059),E2078fs*21 (COSM1159268),Y2076fs*23 (COSM218429),S2068L (COSM3377106),G2087R (COSM132992)
44	chr1	27106630	27106728	ARID1A	G2087R (COSM132992),D2101N (COSM4998896),H2090Q (COSM1162578),V2084G (COSM3386059),S2096* (COSM133026)
45	chr1	27106764	27106860	ARID1A	R2143C (COSM1473819)
46	chr1	27107068	27107159	ARID1A	DMM2229 ,R2236C (COSM1341435)
47	chr1	27107144	27107219	ARID1A	S2262* (COSM1168674),I2275T_for_fs (COSM464366),SL2269SLdel_fs
48	chr2	198266505	198266575	SF3B1	L773R (COSM1158256),N763S (COSM4387541)
49	chr2	198266584	198266661	SF3B1	A744P (COSM4383628)
50	chr2	198266693	198266759	SF3B1	K741K_ins

表 2 (続き)

Amplicon No.	Chromosome	Start	End	Gene	Main Hotspots
51	chr2	198266786	198266861	SF3B1	Q699H (COSM84678),T703N (COSM4965767),Q699_K700>HE (COSM4387504),K700E (COSM84677)
52	chr2	198267321	198267401	SF3B1	K666E (COSM110694)
53	chr2	198267438	198267525	SF3B1	R625C (COSM110696)
54	chr2	198268310	198268384	SF3B1	R568H (COSM84679)
55	chr2	198273102	198273193	SF3B1	P342T (COSM5002182)
56	chr2	209113047	209113123	IDH1	R132H (COSM28746),H133Q (COSM96533),R132C (COSM28747),R132H (COSM86993),I130M (COSM96532),R132V (COSM28751),A134D (COSM96534)
57	chr2	209113123	209113198	IDH1	R119Q (COSM242544),G123R (COSM96922),G123E (COSM51542),G105G ,N116S (COSM97049)
58	chr3	30686298	30686390	TGFBR2	C77S (COSM3392330)
59	chr3	30691760	30691847	TGFBR2	L97R (COSM4808212)
60	chr3	30691847	30691919	TGFBR2	P129fs*3 (COSM300123)
61	chr3	30713386	30713482	TGFBR2	Y259D (COSM3392332)
62	chr3	30713470	30713559	TGFBR2	Y284* (COSM1158078)
63	chr3	30713695	30713789	TGFBR2	S353F (COSM1168994),H360P ,R356fs*9 (COSM85641)
64	chr3	30713840	30713929	TGFBR2	S416fs*25 (COSM85617),F398S (COSM3392334),C393F (COSM84784)
65	chr3	30715561	30715649	TGFBR2	R423* (COSM4999995),A422T (COSM4964774)
66	chr3	30715660	30715747	TGFBR2	E456* ,D446N (COSM95333),R460L (COSM3780877),W455S (COSM218768),D446V (COSM218767)
67	chr3	30729835	30729924	TGFBR2	Y470Yfs ,splicing_site (COSM4781611),V467Vfs ,Y470D (COSM3392339)
68	chr3	30729907	30729997	TGFBR2	R495* (COSM20398),R495fs*23 (COSM4999956),V491M ,D494fs*24 (COSM85572),E499Efs ,V484fs*28 (COSM85610)
69	chr3	30732926	30733012	TGFBR2	W521* (COSM84785),D524Y (COSM84786),R528H (COSM33076),DPE524del ,R528C (COSM583215),R537C (COSM84787),R528L (COSM3392342)
70	chr3	41266008	41266082	CTNNB1	A21T (COSM5738),V22_G38del (COSM6050),E15K (COSM49161),V22A (COSM5706),W25L (COSM5749),S23G (COSM17941),A20V (COSM5702),V22_S33del (COSM6052),A13T (COSM5747),S23_S33del (COSM6057)
71	chr3	41266076	41266152	CTNNB1	A43V (COSM5699),T41A (COSM5664),W25L (COSM5749),H36R (COSM27378),L46L (COSM13175),T40I (COSM5708),S33L (COSM6098),A39T (COSM5762),A39G (COSM5753),G34V (COSM5670)
72	chr3	178936043	178936124	PIK3CA	Q546H (COSM24712),E545Q (COSM27133),Q546E (COSM6147),E545D (COSM27374),E545A (COSM12458),T544N (COSM249872),E542Q (COSM17442),E542V (COSM762),Q546R (COSM12459),P539R (COSM759)
73	chr3	178951990	178952065	PIK3CA	A1020V (COSM28938),D1029H (COSM36286),A1035V (COSM17445),M1040I (COSM25085),F1039L (COSM29110),T1025T (COSM21451),T1025I (COSM36285),R1023Q (COSM13594),T1025S (COSM12597),N1044D (COSM27134),D1045N (COSM25086),M1043I (COSM29313),H1048R (COSM36289),H1047Q (COSM24714),A1046T (COSM27273),M1043V (COSM12591),H1047R
74	chr3	178952065	178952135	PIK3CA	?
75	chr3	178952135	178952216	PIK3CA	? (COSM249908),*1069_1069insWKDN* (COSM17449)
76	chr7	140453086	140453170	BRAF	G596D (COSM26506),A598_T599insV (COSM26625),T599_V600insT (COSM30730),S605N (COSM1136),I592V (COSM1120),S605G (COSM21542),L597S (COSM1126),V600Q (COSM249889),V600A (COSM18443),I592M (COSM1119)
77	chr7	140453141	140453223	BRAF	L597L (COSM1124),L597Q (COSM1125),F595L (COSM468),F595S (COSM1123),L597V (COSM470),G596D (COSM26506),L584L (COSM1117),E586E (COSM1118),L597S (COSM1126),I592V (COSM1120)
78	chr7	140481364	140481457	BRAF	R462I (COSM447),P453T (COSM21492),G469R (COSM457),G466V (COSM451),G469S (COSM458),G466R (COSM1112),G464E (COSM449),G469V (COSM459)
79	chr7	140481471	140481550	BRAF	R444W (COSM6262)
80	chr9	21970928	21971032	CDKN2A	E119* (COSM13300),W110* (COSM12547),G122fs*24 (COSM13619),D116Y (COSM13807),H123Q (COSM13463),R124H (COSM13608),R124fs*22 (COSM33797),G122D (COSM12501),R128W (COSM12748),G122G (COSM13645)
81	chr9	21971018	21971120	CDKN2A	R112G (COSM12503),G101G (COSM12493),H83P (COSM12494),V106V (COSM12491),V82M (COSM12469),R80Q (COSM12480),D108N (COSM12484),D84fs*63 (COSM13297),A102E (COSM12502),L104fs*42 (COSM13607)
82	chr9	21971120	21971218	CDKN2A	? (COSM12539),N71K (COSM22561),V51I (COSM13496),V51A (COSM13276),H66R (COSM14253),L65P (COSM13972),? (COSM14254),M54fs*61 (COSM13494),D74V (COSM13546),L64L (COSM12758)
83	chr9	101891100	101891166	TGFBR1	C36Y (COSM5002854),A33V (COSM1458891),H39delH (COSM1579683)
84	chr9	101891163	101891254	TGFBR1	F46C (COSM277668),C71R (COSM4733369),L53fs*20 (COSM392525),N45S (COSM1755840),V65G (COSM3665359),H67Y (COSM1103188)
85	chr9	101891252	101891330	TGFBR1	K91N (COSM171197),C86Y (COSM384991),R80Q (COSM3835284),L77S (COSM3382379),P83S (COSM1267722),D81H (COSM3902535),L77V (COSM4806644)

表 2 (続き)

Amplicon No.	Chromosome	Start	End	Gene	Main Hotspots
86	chr9	101891327	101891411	TGFBF1	C106* (COSM3902536),N107S (COSM4431876),C101Y (COSM3382380),E110* (COSM4733370)
87	chr9	101894784	101894875	TGFBF1	V137I (COSM5003147),I130V (COSM1458892)
88	chr9	101894875	101894959	TGFBF1	R157* (COSM1755841),P164A (COSM3996195),R168C (COSM175302),R151H (COSM3166648),I147V (COSM1635938)
89	chr9	101894959	101895028	TGFBF1	G192C (COSM4733371)
90	chr9	101900123	101900206	TGFBF1	splicing_site (COSM131530),I201V (COSM3413199),A202V (COSM285682),A202_I205delARTI (COSM4733372),P194S (COSM1103192),G214V (COSM341538),E209Q (COSM365447)
91	chr9	101900205	101900291	TGFBF1	R215P (COSM3942845),G217A (COSM1330848),G226_E227insG (COSM2157819),E228V (COSM455037),S241L (COSM277669),V219F (COSM1458893),S241T (COSM1458894),G214V (COSM341538),A230V (COSM199702),R215G (COSM3765418)
92	chr9	101900291	101900371	TGFBF1	I259N (COSM4856498),Q250E (COSM1553855),R255L (COSM1132653),E245K (COSM1553856),D266N (COSM3395476),R255C (COSM1103193)
93	chr9	101904807	101904895	TGFBF1	Y291* (COSM1458897),S287F (COSM3902538),G286R (COSM1267721),H283R (COSM1458896),E284* (COSM1157821),D281N_Y282D (COSM3652272),T274S (COSM3786069)
94	chr9	101904883	101904954	TGFBF1	G312V (COSM221365),T298I (COSM223352),T296I (COSM607138),Y291* (COSM1458897),L305R (COSM1674664)
95	chr9	101904953	101905034	TGFBF1	Q324R (COSM1458898)
96	chr9	101907025	101907094	TGFBF1	L340fs*20 (COSM308715),L340fs*20 (COSM21239),D351E (COSM3786070),G345* (COSM4618792),D333H (COSM3166660),S336fs*21 (COSM48974),D333V (COSM4768618)
97	chr9	101907083	101907150	TGFBF1	I365V (COSM3929698),L354P (COSM3902539),D351E (COSM3786070)
98	chr9	101908726	101908816	TGFBF1	A380T (COSM4909648),F393L (COSM1288444)
99	chr9	101908803	101908876	TGFBF1	D400H (COSM1288445),L406V (COSM4759510),R413* (COSM1458899),F396L (COSM455038),V407I (COSM2149451),F393L (COSM1288444)
100	chr9	101908859	101908928	TGFBF1	R413* (COSM1458899),S416F (COSM607136)
101	chr9	101909905	101909995	TGFBF1	P427S (COSM3663973),Q425* (COSM4463063)
102	chr9	101909995	101910088	TGFBF1	V444G (COSM356248),E447G (COSM4656034),K443I (COSM1736496),S460I (COSM1103198),L450* (COSM258174),K449N (COSM1103196),C446fs*4 (COSM1745237)
103	chr9	101911479	101911567	TGFBF1	R482M (COSM1180345),T491fs*14 (COSM1193043),R487W (COSM199708),R487Q (COSM1635939)
104	chr12	25378538	25378607	KRAS	A146V (COSM19900),A146T (COSM19404)
105	chr12	25378604	25378683	KRAS	K117N (COSM19940)
106	chr12	25380260	25380336	KRAS	A59G (COSM28518),T58I (COSM87288),Q61P (COSM551),Q61H (COSM554),Q61K (COSM549),Q61K (COSM87298),A59T (COSM546)
107	chr12	25398229	25398310	KRAS	L19F (COSM12703),G13_V14insG (COSM219781),G12D (COSM14209),G13V (COSM12721),G13G (COSM535),G13C (COSM527),Q22K (COSM543),A18D (COSM542),A11P (COSM510),G12G (COSM523)
108	chr17	7573882	7573974	TP53	Q354R (COSM45536),S366A (COSM44832),G356W (COSM44830)
109	chr17	7573933	7574031	TP53	Q354R (COSM45536),G334V (COSM11514),R342P (COSM45276),L344P (COSM44070),L348F (COSM46348),R337C (COSM11071),N345fs*25 (COSM44879),E339* (COSM11286),E343* (COSM11078),R337L (COSM11411)
110	chr17	7576963	7577062	TP53	R306* (COSM10663),K305R (COSM43743),K292N (COSM45611),H297Y (COSM45494),K305N (COSM44345),G302E (COSM43988),T304I (COSM45128),E298* (COSM10710),G293G (COSM44128),H296L (COSM44522)
111	chr17	7577062	7577150	TP53	E286fs*17 (COSM44651),S269_F270>I (COSM146240),C277* (COSM44972),F270S (COSM11305),R282R (COSM44724),L265P (COSM11011),S269S (COSM44886),G279W (COSM43674),N268H (COSM43979),A276V (COSM10756)
112	chr17	7577508	7577591	TP53	R249S (COSM10785),M237K (COSM43952),C242Y (COSM10646),G245G (COSM44900),Y234del (COSM44953),N247Y (COSM43864),R249G (COSM10668),N239K (COSM44510),G245R (COSM10957),H233Y (COSM44705)
113	chr17	7577517	7577612	TP53	C229Y (COSM44313),M246V (COSM43555),N247T (COSM43588),N239D (COSM10777),I232N (COSM10715),Y234C (COSM10725),P250S (COSM43695),I251I (COSM44511),L252del (COSM44247),I251del (COSM44650)
114	chr17	7578158	7578261	TP53	R209fs*35 (COSM96575),N210S (COSM45441),R202S (COSM44174),R209fs*6 (COSM13120),E221* (COSM44817),F212S (COSM46214),R213fs*34 (COSM44358),D208V (COSM44249),V197M (COSM43779),P219P (COSM44689)
115	chr17	7578258	7578362	TP53	R196* (COSM45021),H193R (COSM10742),Q192Q (COSM43782),L194L (COSM43929),A189A (COSM45440),I195T (COSM11089),? (COSM46059),A189G (COSM43698),P190del (COSM44665),P191S (COSM43702)
116	chr17	7578352	7578440	TP53	H168R (COSM43545),H179Y (COSM10768),H178P (COSM44215),C176S (COSM44146),H179Y (COSM43584),C182S (COSM43828),Q167fs*14 (COSM51646),D184D (COSM45338),? (COSM43541),V172V (COSM44973)

表 2 (続き)

Amplicon No.	Chromosome	Start	End	Gene	Main Hotspots
117	chr17	7578428	7578518	TP53	T155P (COSM10912),P153S (COSM43675),Q167fs*14 (COSM51646),P153P (COSM43964),A159T (COSM43626),G154S (COSM43692),R156P (COSM10760),I162M (COSM44125),A161A (COSM44119),R158fs*11 (COSM43831)
118	chr17	7578518	7578599	TP53	C135R (COSM10684),Q136* (COSM11166),Y126D (COSM220782),M133fs*37 (COSM45586),A129T (COSM44966),L130L (COSM45077),? (COSM45672),P128fs*42 (COSM44396),Y126C (COSM11517),S127F (COSM40942)
119	chr17	7579288	7579384	TP53	G105C (COSM42813),F109S (COSM45169),T102I (COSM43678),Q104* (COSM10886),G105fs*18 (COSM45801),R110C (COSM43682),Y107* (COSM11448),S106R (COSM45944),Y103* (COSM44453),R110L (COSM10716)
120	chr17	7579384	7579478	TP53	A88fs*35 (COSM44231),P82L (COSM43910),A84G (COSM44075),K101R (COSM44986),R72H (COSM45985),R72C (COSM44018),V73M (COSM43787),P77A (COSM44287),S99F (COSM44036),S95F (COSM44673)
121	chr17	7579857	7579949	TP53	E11Q (COSM11606)
122	chr17	11984657	11984743	MAP2K4	S83A
123	chr17	11984706	11984800	MAP2K4	I108M (COSM5001088),R110Q (COSM3387710)
124	chr17	11998863	11998931	MAP2K4	R134W (COSM137092)
125	chr17	11998906	11998987	MAP2K4	V151L (COSM218506)
126	chr17	12011070	12011136	MAP2K4	M178R (COSM3771265)
127	chr17	12013702	12013786	MAP2K4	E221* (COSM26106),splicing_site (COSM3387711)
128	chr17	12016515	12016585	MAP2K4	I230M (COSM4961576)
129	chr17	12016573	12016658	MAP2K4	G265D (COSM2737664),D247N (COSM3387712)
130	chr17	12016651	12016733	MAP2K4	A271V (COSM3378078),G265D (COSM2737664)
131	chr17	12028613	12028683	MAP2K4	R281* (COSM218507)
132	chr17	12032456	12032544	MAP2K4	Q327* (COSM1732967),G303V (COSM216381)
133	chr17	12032487	12032579	MAP2K4	S337Y ,Q327* (COSM1732967)
134	chr17	56432275	56432376	RNF43	RNF43 Exon1
135	chr17	56434796	56434884	RNF43	RNF43 Exon2
136	chr17	56434870	56434962	RNF43	RNF43 Exon2
137	chr17	56434951	56435048	RNF43	RNF43 Exon2
138	chr17	56435031	56435123	RNF43	RNF43 Exon2
139	chr17	56435113	56435204	RNF43	RNF43 Exon2
140	chr17	56435195	56435291	RNF43	RNF43 Exon2
141	chr17	56435261	56435356	RNF43	RNF43 Exon2
142	chr17	56435351	56435445	RNF43	RNF43 Exon2
143	chr17	56435435	56435535	RNF43	RNF43 Exon2
144	chr17	56435524	56435627	RNF43	RNF43 Exon2
145	chr17	56435617	56435707	RNF43	RNF43 Exon2
146	chr17	56435696	56435797	RNF43	RNF43 Exon2
147	chr17	56435786	56435890	RNF43	RNF43 Exon2
148	chr17	56435873	56435959	RNF43	RNF43 Exon2
149	chr17	56435938	56436039	RNF43	RNF43 Exon2
150	chr17	56436028	56436118	RNF43	RNF43 Exon2
151	chr17	56436107	56436196	RNF43	RNF43 Exon2
152	chr17	56437474	56437566	RNF43	RNF43 Exon3
153	chr17	56437555	56437634	RNF43	RNF43 Exon3
154	chr17	56438067	56438169	RNF43	RNF43 Exon4
155	chr17	56438158	56438249	RNF43	RNF43 Exon4
156	chr17	56438223	56438310	RNF43	RNF43 Exon4
157	chr17	56439831	56439930	RNF43	RNF43 Exon5
158	chr17	56439904	56439981	RNF43	RNF43 Exon5
159	chr17	56439966	56440058	RNF43	RNF43 Exon5
160	chr17	56440603	56440677	RNF43	RNF43 Exon6
161	chr17	56440666	56440764	RNF43	RNF43 Exon6
162	chr17	56440739	56440826	RNF43	RNF43 Exon6

表 2 (続き)

Amplicon No.	Chromosome	Start	End	Gene	Main Hotspots
163	chr17	56440875	56440972	RNF43	RNF43 Exon7
164	chr17	56448266	56448356	RNF43	RNF43 Exon8
165	chr17	56448345	56448438	RNF43	RNF43 Exon8
166	chr17	56492620	56492709	RNF43	RNF43 Exon9
167	chr17	56492701	56492770	RNF43	RNF43 Exon9
168	chr17	56492758	56492848	RNF43	RNF43 Exon9
169	chr17	56492847	56492944	RNF43	RNF43 Exon9
170	chr18	48575131	48575206	SMAD4	C123fs*2 (COSM25274),C123fs*2 (COSM14216),A118V (COSM14215)
171	chr18	48581183	48581254	SMAD4	G168* (COSM14118)
172	chr18	48584511	48584591	SMAD4	Q245* (COSM14057)
173	chr18	48584591	48584670	SMAD4	T259fs*4 (COSM14217)
174	chr18	48586253	48586344	SMAD4	Q311* (COSM14163),? (COSM14167)
175	chr18	48591801	48591871	SMAD4	E330A (COSM14110),F339_S343del (COSM14121),S343* (COSM14111)
176	chr18	48591871	48591959	SMAD4	R361C (COSM14140),D355G (COSM14232),G358* (COSM14174),R361H (COSM14122),Y353C (COSM14220),D351H (COSM14135)
177	chr18	48593433	48593523	SMAD4	Y412* (COSM14175),Q410fs*6 (COSM14223)
178	chr18	48603025	48603115	SMAD4	A466fs*28 (COSM14105),Q448fs*20 (COSM14124)
179	chr18	48604619	48604709	SMAD4	K507Q (COSM14126),C499Y (COSM14221),R497H (COSM14113)
180	chr18	48604703	48604780	SMAD4	C523W (COSM14115),R515* (COSM14129),S517fs*7 (COSM14177),E526* (COSM14134)
181	chr19	1206990	1207080	STK11	Q37* (COSM12925),E57fs*7 (COSM21212),T32T (COSM21378)
182	chr19	1207066	1207143	STK11	E57fs*7 (COSM21212),Y60* (COSM20874)
183	chr19	1220374	1220467	STK11	Q170* (COSM20943),Q159* (COSM27316),G171S (COSM21354)
184	chr19	1220464	1220553	STK11	D194Y (COSM20944),E199K (COSM21359),D194V (COSM20957),G196V (COSM48786)
185	chr19	1221234	1221335	STK11	P281fs*6 (COSM28298),Y272Y (COSM29005),L282fs*3 (COSM25851),P281fs*6 (COSM12924),F264fs*22 (COSM20857),P281fs*6 (COSM20871)
186	chr19	1223036	1223133	STK11	F354L (COSM21360),W332* (COSM18652)
187	chr20	57484388	57484464	GNAS	R201C (COSM27887),R201H (COSM27895)
188	chr20	57484533	57484625	GNAS	Q227L (COSM27888),Q227K (COSM28618),K233N (COSM192557),Q227H (COSM27900)
189	chrX	44820585	44820668	KDM6A	L105inframedel
190	chrX	44833879	44833959	KDM6A	Y116H
191	chrX	44879953	44880037	KDM6A	X188_splice ,E184* (COSM5003816)
192	chrX	44910946	44911013	KDM6A	Q230fs*12 (COSM3734563),L231Ldel_fs ,S238Lfs*6
193	chrX	44913090	44913182	KDM6A	A269Ains_fs
194	chrX	44918462	44918535	KDM6A	Q333* (COSM28786)
195	chrX	44919347	44919434	KDM6A	P428S (COSM3390647)
196	chrX	44922912	44922994	KDM6A	Q611* (COSM3733889),V607M (COSM216867),T616Tins_fs
197	chrX	44929360	44929449	KDM6A	T825Nfs*10 ,TN838TNdel_fs
198	chrX	44935962	44936042	KDM6A	L914fs*4 (COSM1734601)
199	chrX	44938551	44938625	KDM6A	Q1039E (COSM1162420)
200	chrX	44945118	44945190	KDM6A	W1166* (COSM3780474)
201	chrX	44949054	44949128	KDM6A	D1216N (COSM3390649)
202	chrX	44949942	44950029	KDM6A	R1255W (COSM212434)
203	chrX	44950037	44950124	KDM6A	E1290K (COSM3780477)
204	chrX	44969254	44969334	KDM6A	splice_site (COSM1319435)
205	chrX	44969434	44969520	KDM6A	splice_site (COSM3780480),X1392_splice
206	chrX	47028717	47028809	RBM10	R32* (COSM258802)
207	chrX	47030548	47030644	RBM10	E119del ,E119D (COSM1263896),E125del
208	chrX	47034385	47034472	RBM10	V176D (COSM3780484)
209	chrX	47034469	47034550	RBM10	W187C (COSM4961555)
210	chrX	47038480	47038570	RBM10	K235* (COSM3390652),R230* (COSM371213)
211	chrX	47038773	47038870	RBM10	A283D (COSM25582)
212	chrX	47039272	47039362	RBM10	I302N (COSM3390653)

表 2 (続き)

Amplicon No.	Chromosome	Start	End	Gene	Main Hotspots
213	chrX	47039834	47039933	RBM10	R396H (COSM33000),I414F (COSM4807546)
214	chrX	47041219	47041303	RBM10	splicing_site (COSM4965696)
215	chrX	47041495	47041587	RBM10	Q603* (COSM3390654)
216	chrX	47044418	47044511	RBM10	R657L (COSM4389174),R660C (COSM4387729),E667* (COSM1121722)
217	chrX	47044769	47044867	RBM10	R726* (COSM3780485)
218	chrX	47044941	47045027	RBM10	R766C (COSM1315532),R766L (COSM5000096),R776W (COSM3786735)
219	chrX	47045095	47045172	RBM10	R793* (COSM3780486),splicing_site
220	chrX	47045637	47045731	RBM10	Q850* (COSM3390655)

(v) シーケンスライブラリ調製と IonPGM を用いたシーケンス

シーケンスライブラリ調製は Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。精製したゲノム DNA 10~60 ng をインプット量とし、前項にて作製したアンプリコンシーケンスパネルを用いて、シーケンスキット添付のマニュアルに従ってライブラリ調製を行った(ターゲット領域増幅サイクル数：22 サイクル)。ライブラリの精製については Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を使用し、方法については添付のマニュアルに従った。

ライブラリの定量は Ion Library Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、qPCR 法によって測定し、最終的にライブラリを 100 pM の濃度に調整した。

作製したライブラリを用いて IonOneTouch 2 システム、および Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンステンプレート調製を行った。半導体チップである Ion 318 Chip v2 (Thermo Fisher Scientific) に調製したテンプレートをロードし、Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて IonPGM シーケンサーによるシーケンス(シーケンス長：200 bp)を行った。なお、シーケンス操作については全て添付のマニュアルに従って行った。

(vii) データ解析

アンプリコンシーケンスにより得られたデータを用いて、IonTorrent システム付属の解析サーバーである Torrent Server とサーバー内蔵解析ソフトにより変異の解析を行った。上記解析システムは統合型ソフト Torrent Suite (version 5.0.5) としてサーバーに内蔵されており、本研究においてはフィルタリング、マッピング、変異抽出とカバレッジ解析を一連のパイプラインとして行った。Torrent Suite 内の内蔵解析パイプラインは

IonTorrent 出力のシーケンスリードを最適にマッピング・変異抽出できるように特化されて組まれている。Variant calling 分析は、低頻度の変異体を検出するため、最小アレル変異頻度 (Minimum allele frequency) 0.02、最小カバレッジ (Minimum coverage) 100 に設定した。得られた変異データ全てに関し、アラインメントビューアである IGV ソフトウェア (version 2.3.59) を用いて、目視により変異妥当性を検討した。また、アミノ酸情報などのアノテーション追加に関しては Ion Torrent データを用いたクラウド解析システムである IonReporter サイト (<https://ionreporter.thermo-fisher.com/ir/>) における Annotate Variants (version 5.4) ソフトウェアを使用した。

同定された各遺伝子変異は COSMIC <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> と ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> を用いて、その病的意義を検討した。また COSMIC、ClinVar に未登録で、病的意義不明な遺伝子変異バリエント (variant unknown significance, VUS) については、アミノ酸変化の蛋白構造への影響度を推定する PROVEAN + SIFT <http://provean.jcvi.org/index.php> を用いて、有害変異の可能性がある変異バリエントを同定した。計算されたアレル変異頻度を、サンプル内の腫瘍細胞比率で除し、腫瘍細胞における補正アレル変異頻度として算出した。

6) デジタル PCR による遺伝子解析

高度な DNA 断片化により NGS 解析が困難であったサンプルは、*KRAS* (codons 12 and 13) と *GNAS* (codon 201) について、デジタル PCR により変異の存在を確認した。DNA、プローブおよび酵素プレミックスである ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (BioRad, Hercules, CA, USA) を用いて PCR 溶液を調製した。プライマー・プローブは、表 3 に示す配列に設計し、プローブは高い特異性と親和性を示す LNA (Locked Nucleic Acid) を含む配列とした (プライマー: Thermo Fisher Scientific、プローブ: IDT, Coralville, IA, USA)。また、PCR 溶液の組成は表 4 に示す。Droplet Generator (BioRad) を用いて PCR 溶液と Droplet Generation Oil for probes (Bio-Rad) を混合して DNA 封入ドロップレットを作成し、表 5 の条件で PCR 反応を行った。反応後、Droplet Reader QX200 (BioRad) にて変異型 DNA 断片が存在するドロップレットをカウントし、専用解析ソフトウェアである Quanta Soft (ver. 1.7) により存在量と変異頻度を計算した。計算されたアレル変異頻度を、サンプル内の腫瘍細胞比率で除し、腫瘍細胞における補正アレル変異頻度として算出した。

表 3 : ddPCR に用いたプライマー配列とプローブ

For detection of *KRAS* codon 12/13 mutation

Primers	Forward	5'-GTGTGACATGTTCTAATATAGTCACA-3'
	Reverse	5'-TATCGTCAAGGCACTCTTGC-3'
Product size; 122 bp		
Probes	wild-type <i>KRAS</i> (HEX)	5'-HEX-A+G+C+TGG+TGGC-lowaBlack FQ -3'
	<i>KRAS G12C</i>	5'-6FAM-AG+C+T+TG+TGGC-lowaBlack FQ -3'
	<i>KRAS G12D</i>	5'-6FAM-A+G+C+TG+A+TGGC-lowaBlack FQ -3'
	<i>KRAS G12V</i>	5'-6FAM-AG+C+TG+T+TGGC-lowaBlack FQ -3'
	<i>KRAS G13D</i>	5'-6FAM-A+G+C+TGG+TG+AC-lowaBlack FQ -3'
	<i>KRAS G12A</i>	5'-6FAM-AGC+TG+C+TGGC-lowaBlack FQ -3'
	<i>KRAS G12R</i>	5'-6FAM-A+GC+T+CG+TGGC-lowaBlack FQ -3'
	<i>KRAS G12S</i>	5'-6FAM-A+G+C+T+AG+TGGC-lowaBlack FQ -3'
	<i>KRAS G13C</i>	5'-6FAM-A+G+CTGG+T+T+GC-lowaBlack FQ -3'

Note; "+N" represents LNA base.

For detection of *GNAS* codon 201 mutation

Primers	Forward	5'-GCTTTGGTGAGATCCATTGAC-3'
	Reverse	5'-TCCACCTGGAAGTGGTCTC-3'
Product size; 96 bp		
Probes	wild-type <i>GNAS</i> (HEX)	5'-HEX-C+TGC+C+GTG+TCC-lowaBlack FQ -3'
	<i>GNAS R201C</i>	5'-6FAM-C+TGC+TG+TG+TCC-lowaBlack FQ -3'
	<i>GNAS R201H</i>	5'-6FAM-C+TGCC+A+TG+TCC-lowaBlack FQ -3'

Note; "+N" represents LNA base.

表 4 : ddPCR に用いたプライマーミックスの調整

Component	Final Concentration
ddPCR Supermix for Probes (no dUTP)	1x
Template DNA*	-
additional dNTP mixture	0.91 mM
Primers (Forward and Reverse primer)	each 0.45 mM
Probes (input as a pair of WT and each Mutant Probe)	
<i>KRAS WT</i>	0.45 mM
<i>KRAS G12C</i>	0.77 mM
<i>KRAS G12D</i>	0.45 mM
<i>KRAS G12V</i>	0.45 mM
<i>KRAS G13D</i>	0.05 mM
<i>KRAS G12A</i>	0.68 mM
<i>KRAS G12R</i>	0.07 mM
<i>KRAS G12S</i>	0.68 mM
<i>KRAS G13C</i>	0.68 mM
<i>GNAS WT</i>	0.45 mM
<i>GNAS R201C</i>	0.34 mM
<i>GNAS R201H</i>	0.45 mM

Total 22 μ L Reaction Volume

* 1-4 μ L purified DNA was utilized.

表 5 : ddPCR のプロトコール

Step	No. of cycles	Temperature (°C)	Time (min)
1	1	95	10
2	40	94	0.5
		58 (<i>KRAS</i>)/60 (<i>GNAS</i>)	1
3	1	98	10

7) 統計学的解析

統計学的解析には、R version 3.3.2 (The R foundation) を用いた。群間の比率の比較には Fisher の正確確率検定を用いた。正規性の検定に Shapiro-Wilk normality 検定を用いた。連続変数の群間比較には paired t 検定を用いた。非連続変数の群間比較には、Mann-Whitney U 検定と Kruskal-Wallis 検定を用いた。予後解析には Kaplan-Meier 法と Cox 比例ハザードモデルを用いた。生存曲線の比較のためのサンプルサイズの計算は Lakatos 法⁶³を用いた。*P*値は 0.05 未満を統計学的有意差ありと判定した。箱ひげ図作図に PRISM (ver.6) を用い、Venn diagram の作図には InteractiVenn (<http://www.interactivenn.net>) の webtool を用いた。

【実験結果】

1) 解析対象症例の臨床所見と組織型の検討

2011 年から 2016 年 6 月に手稲溪仁会病院および東徳洲会病院において膵切除が施行された膵癌 284 例のうち、IPMN 関連膵癌は、IPMN 由来癌が 17 例 (6.0%)、併存癌が 22 例 (7.7%) であった。腸型 IPMN に由来する粘液癌 7 例と併存癌 2 例は、浸潤部微小につき NGS 解析に要する十分な DNA 抽出が困難と考えられ除外した。30 症例のうち 6 症例は初回膵切除後に、再発により残膵切除が施行されていた。2 例が由来癌切除後に、由来癌として再発、1 例が、併存癌切除後に併存癌として再発、2 例が高異型度 IPMN 切除後に、異時性併存癌として再発、1 例が併存癌切除後に、残膵転移として再発していた。30 症例、33 病変 (IPMN 関連膵浸潤癌として) を研究対象とし、うち由来癌 12 病変、併存癌 21 病変であった。

30 症例の臨床病理学的所見を表 6 に示す。由来癌 10 例中、男性 5 例 (50%)、女性 5 例 (50%)、併存癌 20 例中、男性 12 例 (60%)、女性 8 例 (40%) であり、IPMN 診断時の年齢中央値はそれぞれ 64 歳 (52-76 歳)、68 歳 (51-86 歳)、膵切除時の年齢中央値はそれぞれ 68.5 歳 (52-78 歳)、71 歳 (58-86 歳) であった。IPMN 経過観察例はそれぞれ 3 例 (30%)、10 例 (50%) であった。膵癌家族歴はそれぞれ 1 例 (10%)、4 例 (20%) であった。

Co-existing IPMN の上皮型は由来癌症例では胃型 3 例、腸型 5 例、胆膵型 4 例、併存癌症例では胃型 17 例、腸型 4 例、胆膵型 0 例で、由来癌では腸型、胆膵型が優位で、併存癌では胃型が優位であった ($p<0.05$)。Co-existing IPMN の異型度は由来癌症例で高異型度 12 例 (100%)、低異型度 0 例、併存癌では高異型度 6 例 (28.6%)、低異型度 15 例 (71.4%) で、由来癌は全例高異型度で、併存癌の co-existing IPMN では低異型度が多かった ($p<0.05$)。浸潤癌の組織型は、由来癌で胃型もしくは胆膵型 IPMN 由来の管状腺癌 7 例 (58.3%)、腸型 IPMN 由来の粘液癌が 5 例 (41.7%)、併存癌では 21 例 (100%) が管状腺癌で内 1 例 (4.8%) に粘液癌成分も認められた。進行期 (膵癌取扱い規約第 7 版および UICC 第 7 版) は、由来癌で I 期 6 例 (50%)、II 期 6 例 (50%)、併存癌で I 期 3 例 (14.3%)、II 期 18 例 (85.7%) であった ($p<0.05$)。由来癌 I 期 6 例の内、腸型 IPMN 由来の粘液癌が 5 例、胃型由来の管状腺癌が 1 例であった。

表 6：IPMN 関連膵癌の臨床病理学的所見および主たる遺伝子異常の比較

	IPMN-derived PDA	Concomitant PDA	p value
症例数	10	20	
PDA病変数	12	21	
IPMN診断時の年齢			
中央値（最小・最大）	64 (52-76)	68 (51-86)	0.213*
PDA切除時の年齢			
中央値（最小・最大）	68.5 (52-78)	71 (58-86)	0.152*
性別 男性/女性	5/5	12/8	0.705
膵癌家族歴	10% (1/10)	20% (4/20)	0.64
IPMNの上皮粘液形質			
胃型	3	17	< 0.05
腸型	5	4	
胆膵型	4	0	
IPMNの異型度			
高異型度	12	6	< 0.05
低異型度	0	15	
PDAの組織型			
管状腺癌	7	21	< 0.05
粘液癌	5	1	
病期			
0/I/II/III	0/6/6/0	0/3/18/0	< 0.05**
<i>KRAS</i> 変異			
PDA	67% (8/12)	95% (20/21)	< 0.05
Index IPMN	67% (8/12)	95% (20/21)	< 0.05
<i>GNAS</i> 変異			
PDA	67% (8/12)	0% (0/21)	< 0.05
Index IPMN	67% (8/12)	67% (14/21)	1
TP53異常			
PDA	33% (4/12)	71% (15/21)	0.0656
Index IPMN	33% (4/12)	10% (2/21)	0.159
SMAD4異常			
PDA	58% (7/12)	81% (17/21)	0.23
Index IPMN	42% (5/12)	29% (6/21)	0.471
CDKN2A/p16異常			
PDA	58% (7/12)	81% (17/21)	0.23
Index IPMN	33% (4/12)	19% (4/21)	0.42
<i>CTNNB1</i> /β-catenin異常			
PDA	17% (2/12)	19% (4/21)	1
Index IPMN	25% (3/12)	10% (2/21)	0.328
RNF43異常			
PDA	25% (3/12)	10% (2/21)	0.328
Index IPMN	25% (3/12)	24% (5/21)	1

Data are n (%) or median (range) unless otherwise specified. Abnormalities of TP53, SMAD4, CDKN2A/p16, CTNNB1/β-catenin, RNF43 was determined by mutation or aberrant protein expression. IPMN=intraductal papillary mucinous neoplasm. PDA=pancreatic ductal adenocarcinoma. Index IPMN indicates a clinically noticeable lesion most closely associated with PDA. *t-test, **Mann-Whitney U test, otherwise Fisher's exact test.

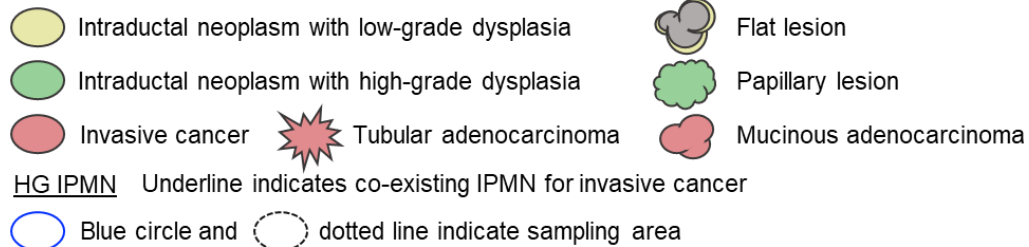
2) 30 症例の組織学的スキームと遺伝子変異および蛋白発現異常

図 15～44 では、30 症例の組織学的シェーマと各病変の遺伝子変異とその補正アレル変異頻度（以下、アレル変異頻度）、蛋白発現異常の結果を示す。また各病変の位置関係、分子プロファイル、及び、進展過程のアレル変異頻度の推移から推測される進展過程を概説する。図 14 にスキーム、遺伝子変異、蛋白発現異常の表示法を示す。

同定された各遺伝子変異は COSMIC <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> と ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> を用いて、その病的意義を検討した。また COSMIC、ClinVar に未登録で、病的意義不明な遺伝子変異バリエント（variant unknown significance, VUS）については、アミノ酸変化の蛋白構造への影響度を推定する PROVEAN + SIFT <http://provean.jcvi.org/index.php> を用いて、有害変異の可能性がある変異バリエントを同定した。

Annotation box

Schema



Mutation profile

KRAS G12V (15.3) ◀ Variant allele frequency corrected by neoplastic cellularity of the sample

▲ Mutation variant detected by NGS and/or ddPCR.

Black letter; pathogenic variant other than KRAS or GNAS,

Gray letter; variant unknown significance,

§ ; variant predicted the functional significance by PROVEAN and/or SIFT.

Immunohistochemical profile (IHC)

(Example)

TP53	Smad4	p16	β-cat	RNF43
------	-------	-----	-------	-------

53	S	16	β	R
100	80			

Strong staining for TP53 and loss of Smad4

The red box indicates strong nuclear staining for TP53, strong nuclear and cytoplasmic staining for p16, and nuclear accumulation of β-catenin.

The blue box indicates loss of TP53, Smad4, p16, and RNF43.

The light blue box indicates weak Smad4 staining, suggestive of haploinsufficiency.

The number under box indicates the percentage of tumor cells with abnormal expression.

*, IHC failed due to poor tissue quality or did not determined due to tissue availability.

図 14 : 図 15～図 44 に示す IPMN 関連膵癌切除検体 30 症例のスキーム、遺伝子変異、蛋白発現異常に関する表示方法の注釈

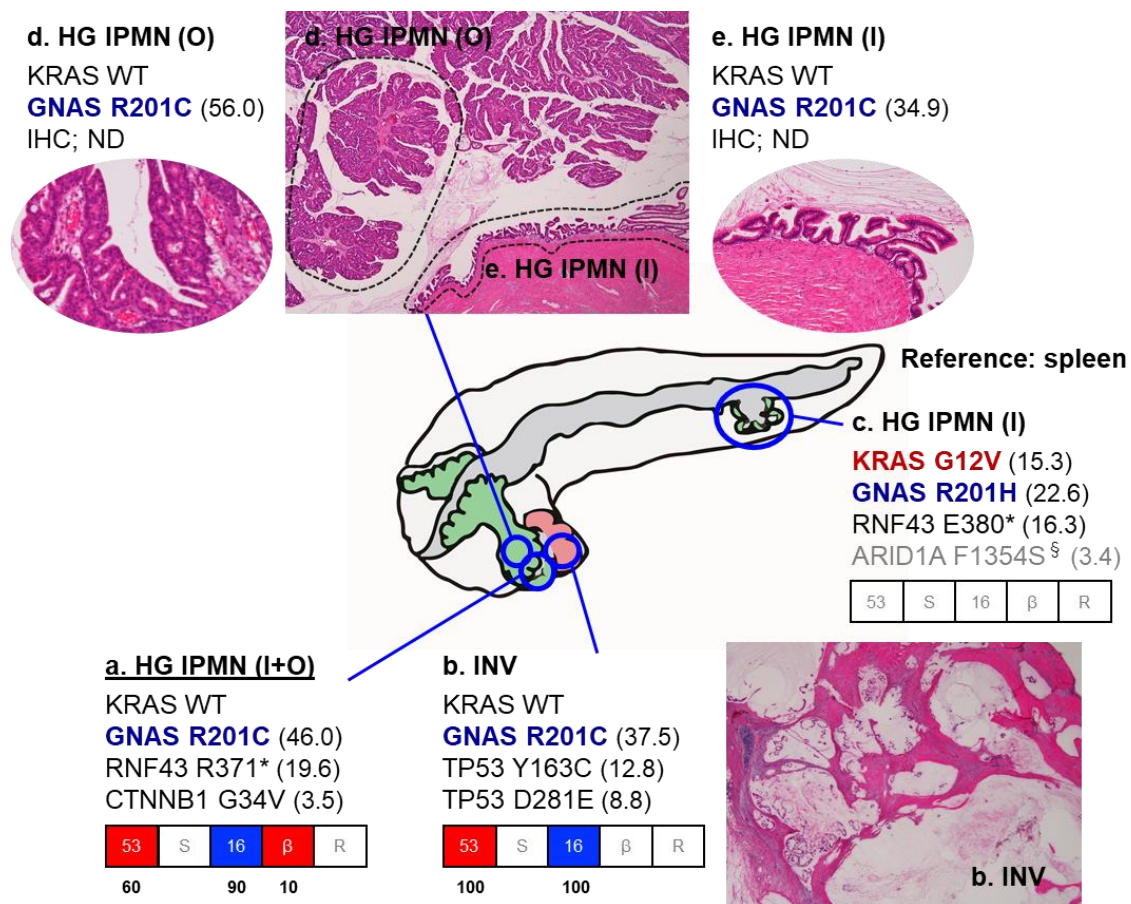


図 15 : **Case 1. Molecular subtype of PDA; Sequential.**

Epithelial type of co-existing IPMN; **Intestinal with oncocytic feature.**

組織学的特徴：分枝型、腸型 IPMN の多発例。膵頭部 IPMN の乳頭状結節は腸型に好酸性細胞型の特徴を伴う HG IPMN から成り、その基部の平坦状増殖する腸型 IPMN から粘液癌へ組織学的移行像が見られた。膵体部にも腸型 IPMN が認められ、IPMN の多発病変と考えられた。

遺伝学的特徴：膵頭部 IPMN(a)と膵体部 IPMN(c)は *KRAS*/*GNAS* 変異バリエントが異なり、別のクローン由来の多中心性発生であった。Ph IPMN(a)と連続する粘液癌(b)は *KRAS* WTで、共通の *GNAS* 変異を有し、共に p53 過剰発現、p16 消失が見られ、遺伝学的連続性が示された。腸型 IPMN(d)と好酸性細胞型の特徴を有する IPMN(e)では同一の *GNAS* 変異のみが検出され、同一クローン由来と考えられたが、形態学的な差異を示す遺伝学的要素は同定されなかった。HG IPMN(a)に検出された *RNF43* 変異と *CTNNB1* 変異は粘液癌(b)には引き継がれなかった。これらのアレル変異頻度は *GNAS* 変異頻度に比して低く、サブクローンレベルでの IPMN の遺伝学的不均一性が示された。浸潤(b)の過程で、2 種の *TP53* 変異が加わり、悪性度上昇に関与した可能性が示唆された。2 病変(a, c)に異なる *RNF43* 変異が検出された。

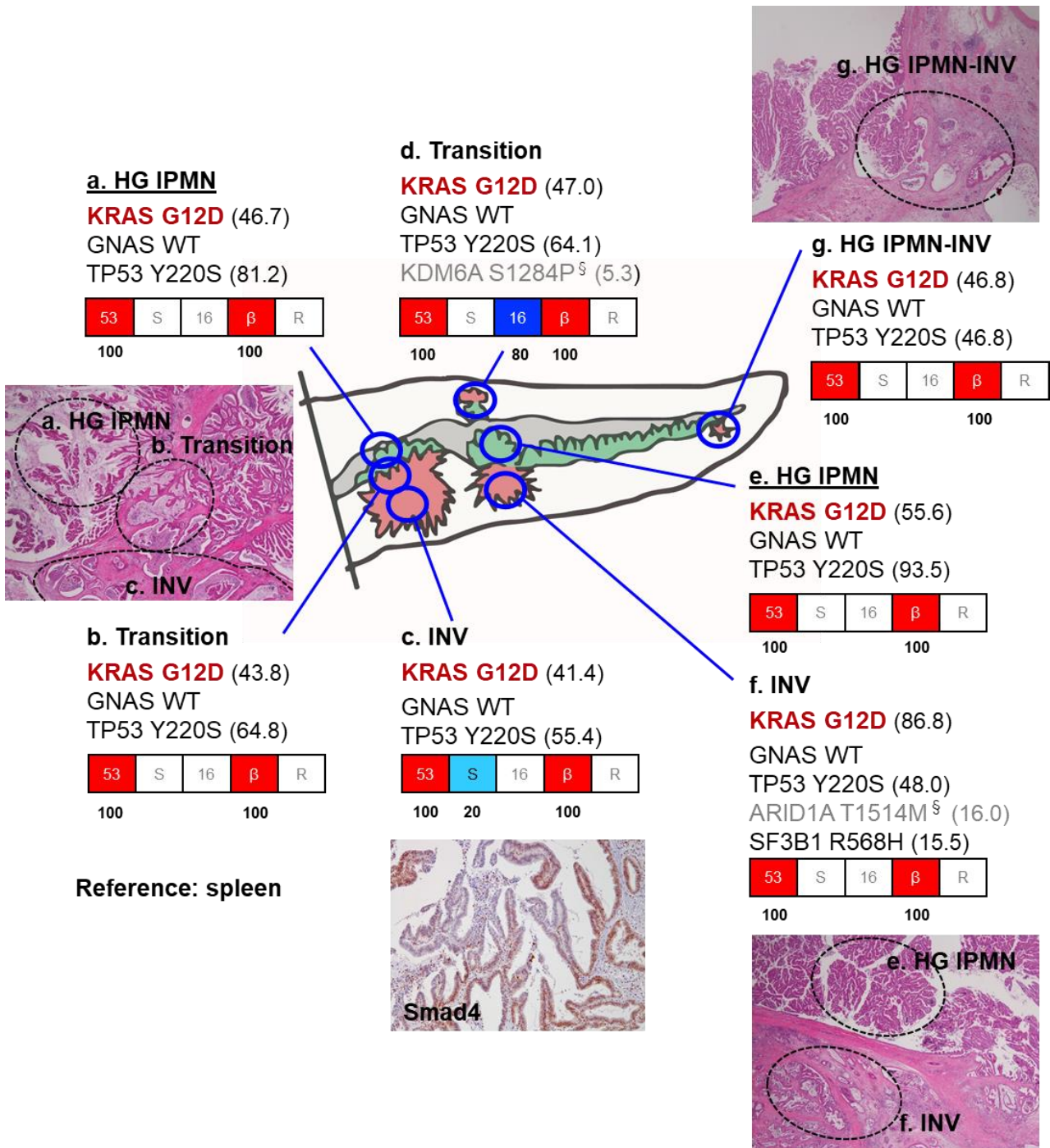


図 16（前ページ）： **Case 2. Molecular subtype of PDA; Sequential.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Pancreatobiliary.

組織学的特徴：主膵管型、胆膵型 IPMN から複数個所で管状腺癌の浸潤を来した例（図 5 参照）。びまん性に拡張した膵体尾部主膵管内を広汎に HG IPMN が進展し、非連続性に複数の浸潤癌形成が認められた。主膵管から移行的に浸潤した癌巣と分枝膵管から移行的に浸潤した癌巣が見られた。

遺伝学的特徴：体尾部に広がる HG IPMN 3 か所、および浸潤癌 4 か所（移行部含む）は共通の *KRAS* 変異と *TP53* 変異および過剰発現、 β -catenin 核内集積が見られ、同一クローンに由来する遺伝学的連続性が示された。IPMN の高異型度化の過程で *TP53* 変異と β -catenin 異常が関与し、主膵管を広く進展したと考えられた。浸潤の過程で、*SMAD4* 減弱(c)や *p16* 消失(d)、*KDM6A*(d)、*ARID1A*(f)、*SF3B1*(f)変異という癌巣により異なる遺伝学的異常の蓄積が見られ、それぞれのサブクローンへの進化を遂げていた。IPMN の段階で *TP53* 変異を獲得したことによるゲノム不安定性から、遺伝子変異蓄積が急激に進み、同時に多発の浸潤癌巣を形成した可能性がある。

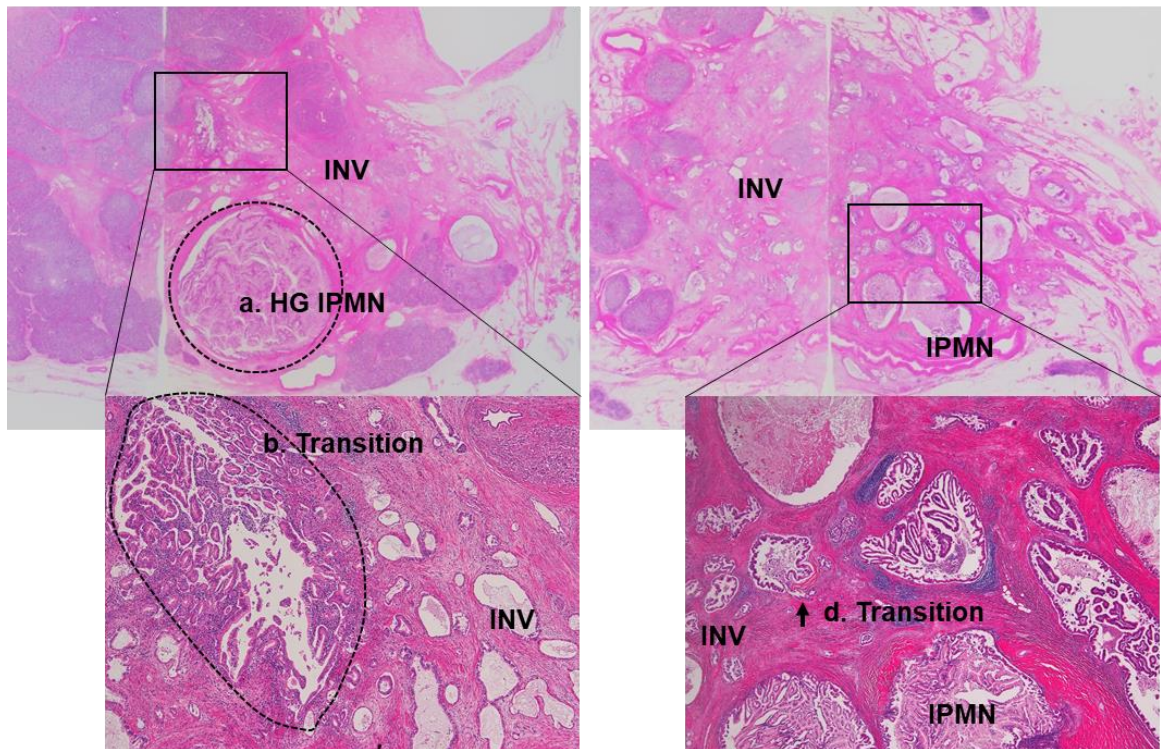
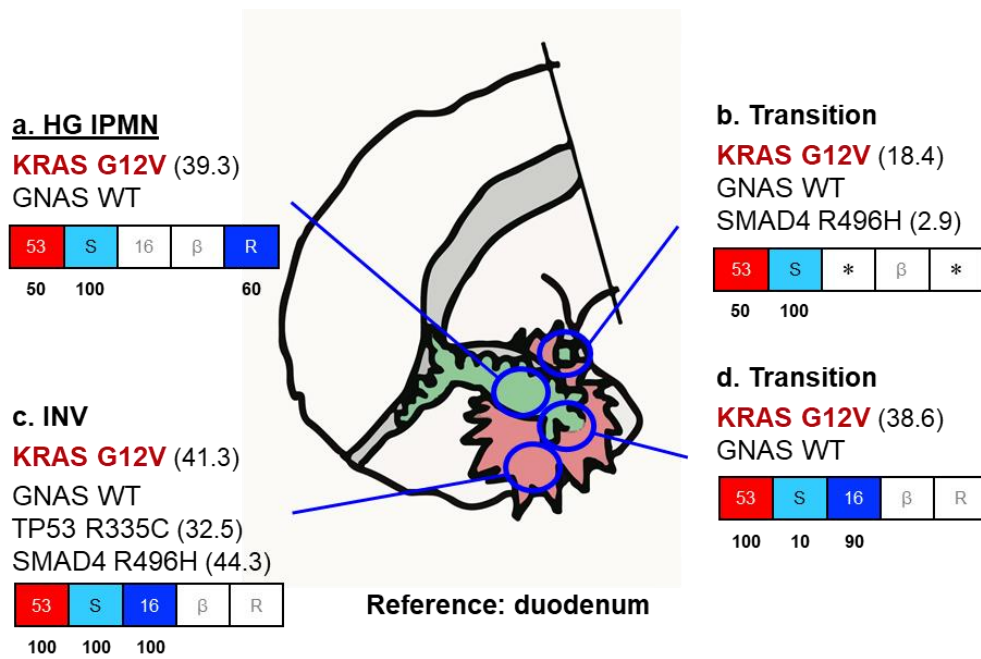


図 17（前ページ）： **Case 3. Molecular subtype of PDA; Sequential.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Pancreatobiliary.

組織学的特徴：分枝型、胆膵型 IPMN から管状腺癌の形態で浸潤を来した例。下頭枝から主膵管を充満する HG IPMN の発育が見られ、分枝膵管から浸潤癌へ組織学的移行像が見られた。

遺伝学的特徴：HG IPMN および浸潤癌は共通の *KRAS* 変異を有し、p53 過剰発現および *SMAD4* 減弱が見られ、同一クローンに由来する遺伝学的連続性が示された。IPMN の高異型度化の過程で p53 と *SMAD4* が関与したと考えられた。浸潤の過程で p16 発現異常(c, d)や *TP53* 変異、*SMAD4* 変異(d)が蓄積し、更なる悪性度上昇に寄与したと考えられた。遺伝子変異は同定されなかったが IPMN の段階で p53 蛋白過剰発現が見られており、p53 異常によるゲノム不安定性から遺伝子変異蓄積が急激に進んだ可能性がある。RNF43 は HG IPMN(a)で発現が消失していたが、浸潤癌に移行した IPMN(d)および管状腺癌(c)では発現が保たれ、RNF43 異常は浸潤の過程へ直接関与していない可能性が示唆された。

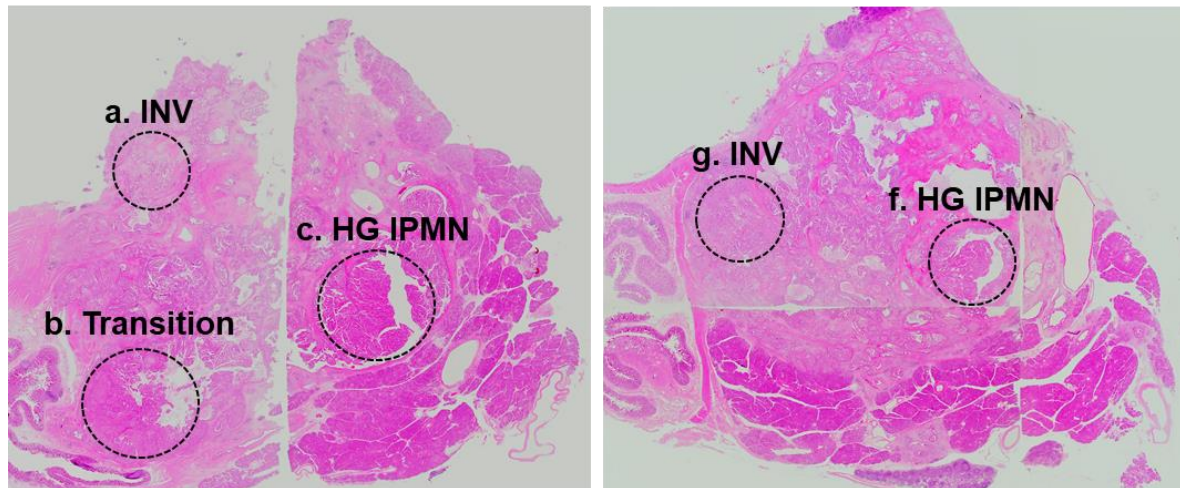
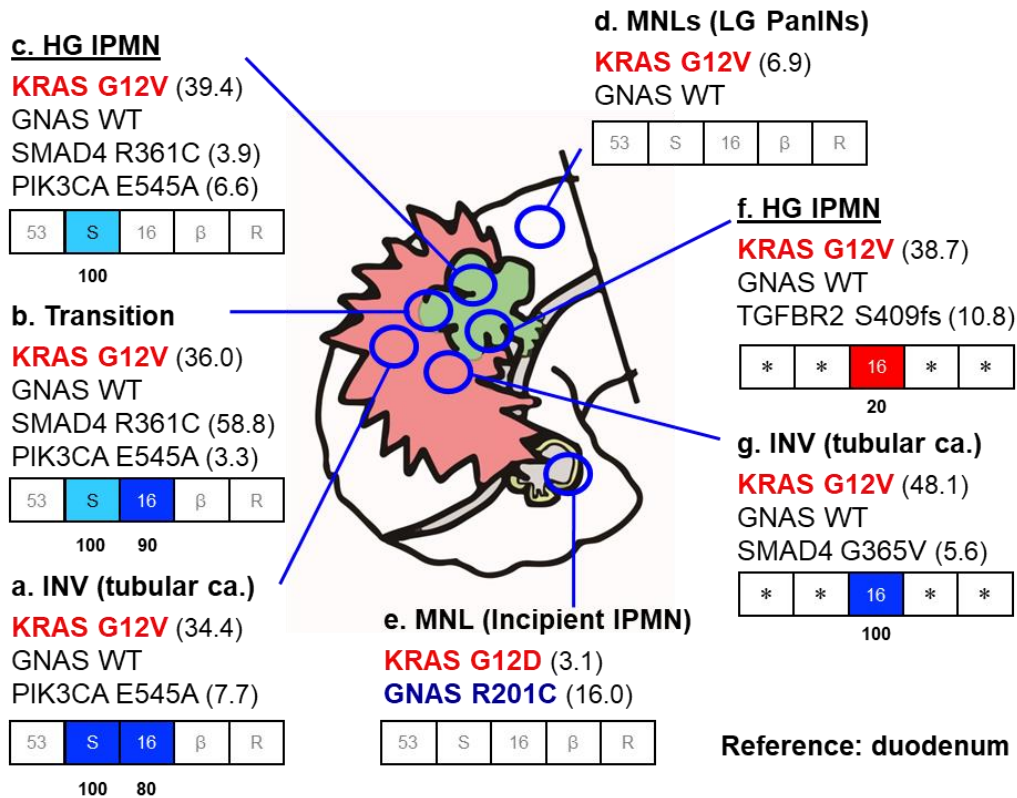


図 18 (前ページ) : **Case 4. Molecular subtype of PDA; Sequential.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Pancreatobiliary.

組織学的特徴 : 分枝型、胆膵型 IPMN から管状腺癌の形態で浸潤を来した例。HG IPMN と浸潤癌が複数個所で組織学的移行像を来し、一塊となっていた。背景膵には顕微鏡的な低異型度膵管内腫瘍性病変 (microscopic neoplastic lesion, MNL) が認められた。

遺伝学的特徴 : HG IPMN 2 か所および浸潤癌 2 か所および移行部は共通の *KRAS* 変異を有し、*GNAS* *WT* であった。組織学的移行像が確認された HG IPMN から管状腺癌(a~c)は共通の *TP53 intronic* (共通変異箇所、非表示)、*PIK3CA* 変異が同定され、遺伝学的連続性が示された。浸潤の過程で p16 消失(b, c)、SMAD4 消失(a)が見られ、悪性度上昇に寄与したと考えられた。移行部(b)や、別の箇所(a-c より 1cm 足側)から採取したサンプル(f, g)には *KRAS* 変異は共通しているが、他のサンプルには同定されない *TGFBR1* 変異(f)や *SMAD4* 変異(b, g)、各異なる p16 発現異常の蓄積が見られ、高度異型化の過程および浸潤の過程で複雑な遺伝学的な進化が生じていた。腫瘍内の heterogeneity 形成の過程を示す一例と考える。また、一連の病変内に複数の *TGFβ* 経路異常の蓄積が見られた点も興味深い。*PIK3CA* 変異は HG IPMN(c)から浸潤癌(a)に共通していたが、その変異アレル頻度はいずれも *KRAS* 変異に比して低値であり、パッセンジャー変異である可能性が示唆された。MNL(e)は主病変と隣接していたが、異なる *KRAS/GNAS* 変異を有し、多中心性発生した incipient IPMN と判断された。

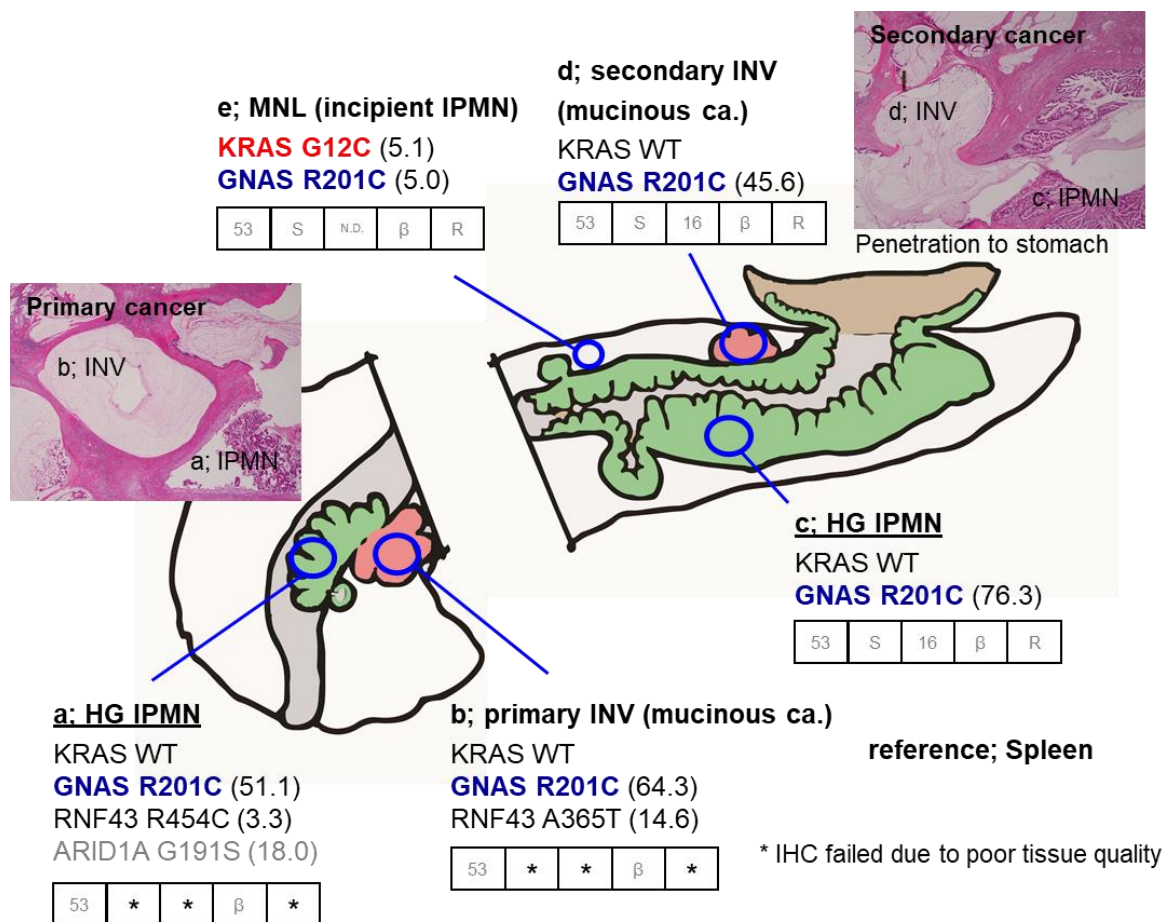


図 19 : **Case 5. Molecular subtype of PDA; Sequential.**

Epithelial type of co-existing IPMNs; **Intestinal.**

組織学的特徴：初発、再発時ともに主膵管型、腸型 IPMN から粘液癌の形態で浸潤を来した例。膵頭十二指腸切除術 16 年後に、膵体尾部主膵管びまん性の HG IPMN 進展と粘液癌の状態で見られ、膵尾部で IPMN の胃への機械的穿破が見られた。初回膵切除断端は IPMN、粘液癌共に陰性であった。

遺伝学的特徴：初発、再発時ともに HG IPMN および浸潤癌は共通の *GNAS* 変異を有し、*KRAS* WT であり、遺伝学的連続性が示された。また初回断端陰性であったが、共通の変異プロファイルを有する IPMN の再発であり、同一の初期クローンが膵管内をスキップ状に広がり、16 年を得て発育した可能性がある。初発時の HG IPMN(a)に同定された *RNF43* 変異と *ARID1A* 変異は浸潤癌(b)へ受け継がれず、浸潤癌では異なる *RNF43* 変異を獲得していた。いずれの粘液癌も *GNAS* 変異と *RNF43* 変異以外の悪性化 module が同定されなかった点は特筆すべきである。MNL(e, 1 腺管を採取)は主病変と隣接し、同一の *GNAS* 変異を有したが、異なる *KRAS* 変異も認められ、多中心性発生した incipient IPMN と考えられた。a, b は 19 年経過した FFPE 組織から DNA を抽出したが、NGS 解析を完遂できた。

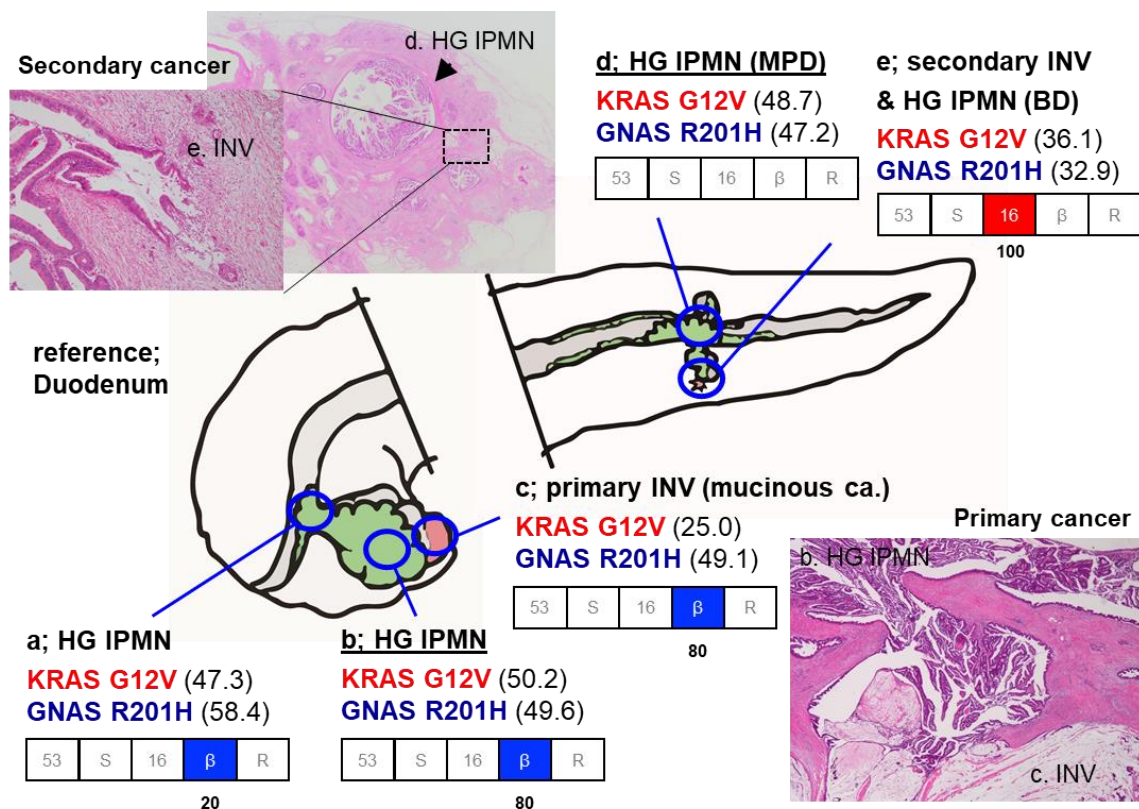


図 20 : Case 6. Molecular subtype of PDA; Sequential.

Epithelial type of co-existing IPMNs; Intestinal.

組織学的特徴：初発、再発時ともに腸型 IPMN から粘液癌および微小癌の形態で浸潤を来した例。初発時、下頭枝から主膵管に進展する HG IPMN から、膵鉤部で組織学的移行像を伴い粘液癌の状態で浸潤を来した。膵頭十二指腸切除の 2 年後に、膵体尾部に広範な HG IPMN 進展と分枝膵管から連続する微小浸潤癌を認めた。小胞巣状の浸潤癌巣周囲に小さな粘液湖がみられ、粘液癌の要素が窺われた。初回膵切除断端は陰性であった。

遺伝学的特徴：初発時、再発時ともに HG IPMN および浸潤癌は共通の *KRAS* および *GNAS* 変異を有し、遺伝学的連続性が示された。初回断端陰性であったが、共通の変異プロファイルを有する IPMN の再発であり、同一の初期クローンが膵管内をスキップ状に進展し、2 年を経て発育した可能性がある。初発時は IPMN(a, b)と浸潤癌(c)いずれも β-catenin 核内集積が見られ、IPMN の高度異型化に寄与したと考えられた。再発時は浸潤部(e)において p16 のびまん性強発現が見られた。膵癌における p16 強発現の意義は明らかでないが、何らかの遺伝子変異もしくはエピジェネティックな異常を反映していると推察される。同様の形態を呈し、遺伝学的にも類似の変異を有する腸型 IPMN 由来の粘液癌の再発であり、初期クローンの共通性に加え、サブクローンのレベルでの異なる進化を遂げた可能性がある。

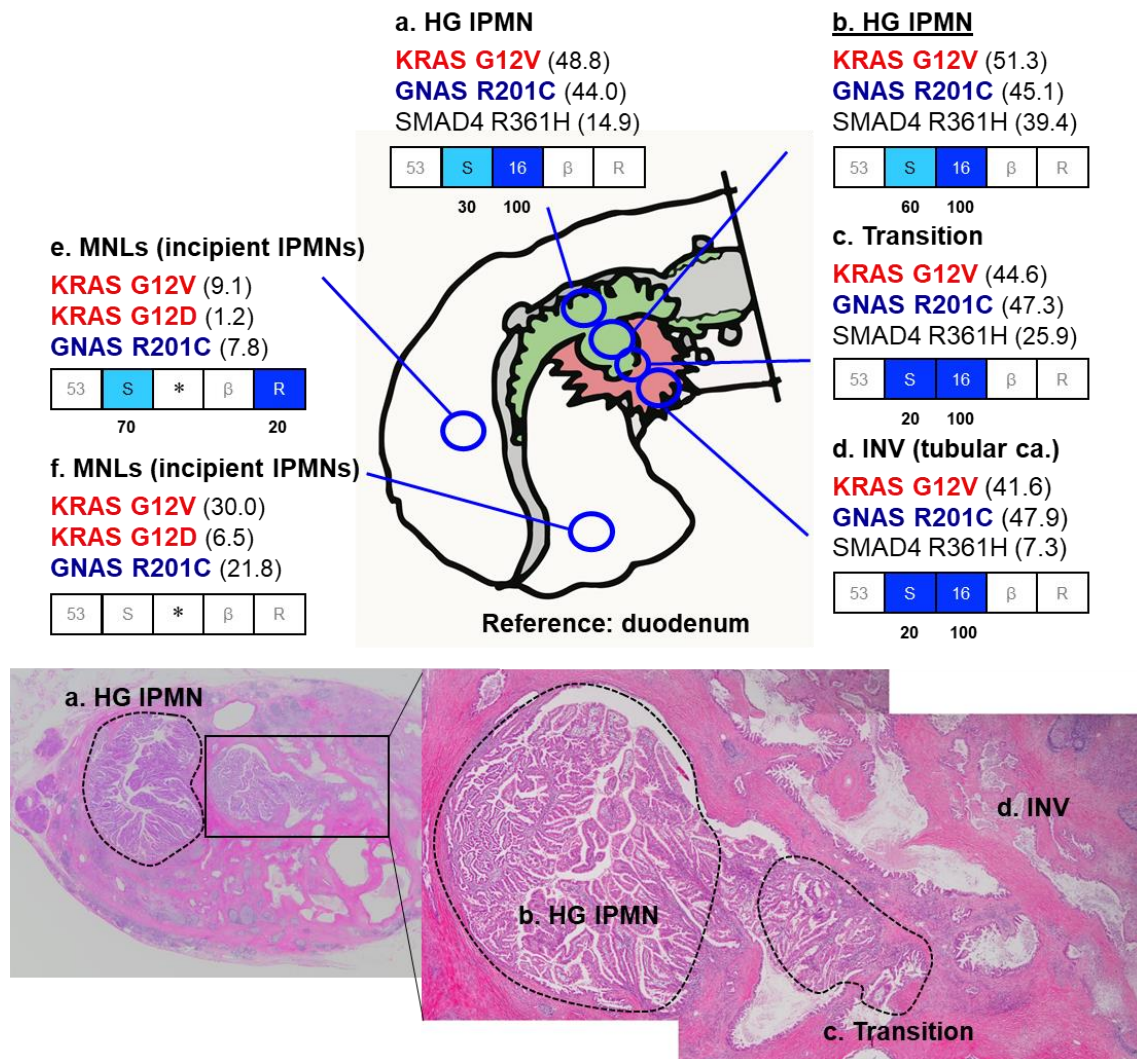


図 21 : Case 7. Molecular subtype of PDA; Sequential.

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN から管状腺癌の形態で浸潤を来した例。膵頭体移行部の分枝から主膵管を充満する IPMN の乳頭状発育が見られ、分枝から浸潤癌へ組織学的移行像が見られた。背景膵に多数の MNL が認められた。

遺伝学的特徴：HG IPMN(a, b)および浸潤癌(d)は共通の *KRAS*、*GNAS*、*SMAD4* 変異を有し、p16 消失が見られ、同一クローンに由来する遺伝学的連続性が示された。浸潤の過程で *SMAD4* が発現減弱から消失へ変化した事より、更なる TGFβ 経路異常の蓄積が示唆された。複数病変を pool sample として採取した MNL(e, f)は、*KRAS* と *GNAS* のアレル変異頻度の近似性から、clone *KRAS G12V+GNAS R201C* と clone *KRAS G12D* が混在していると解釈可能である。いずれも膵管拡張に乏しい低異型度病変で、膵鉤部まで広がっていた。前者は HG IPMN(a, b)の *KRAS/GNAS* と相同であり、IPMN 初期クローンの膵管内播種による広がり否定できない。

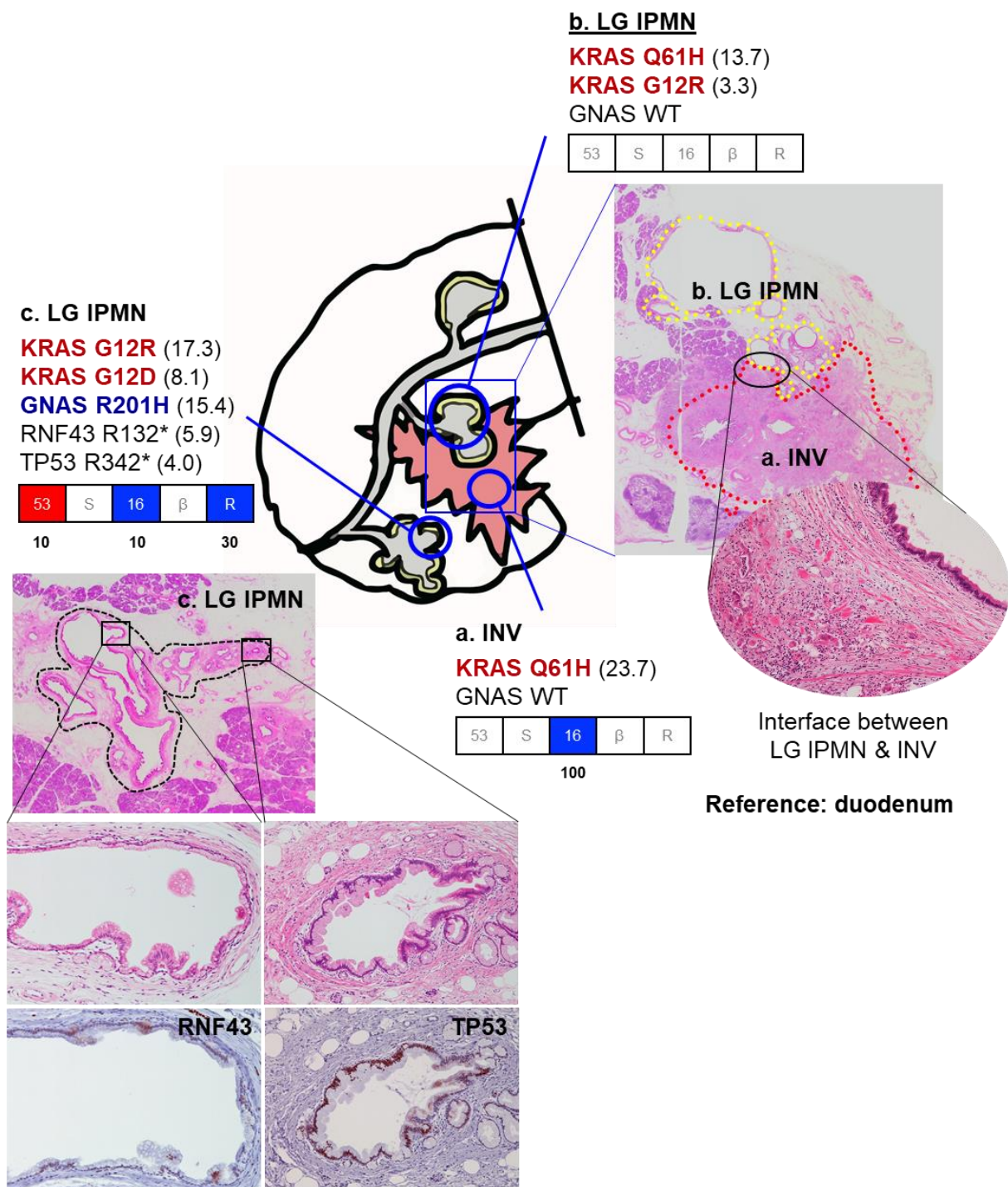


図 22 (前ページ) : **Case 8. Molecular subtype of PDA; Branch-off.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN に隣接して発生した管状腺癌の例。IPMN は低異型度で、浸潤癌に 0.1 cm まで近接していたが、組織学的移行像は明らかでなかった。膵鉤部、頭体移行部にも胃型の低異型度 IPMN が多発していた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と隣接する LG IPMN(b)は、同一の *KRAS Q61H* 変異を有し、離れた IPMN(c)は異なる *KRAS* 変異を有した。浸潤癌(a)では *KRAS* 変異に加え、p16 発現消失が見られ癌化に寄与したと考えられた。隣接する IPMN(b)では 2 種類の *KRAS* 変異が同定され、アレル変異頻度が高い *KRAS Q61H* が隣接する浸潤癌と共通していた。癌と離れた IPMN(c)においても 2 種類の *KRAS* 変異と *GNAS* 変異が同定された。アレル変異頻度の近似性から clone^{*KRAS G12R + GNAS R201H*} と clone^{*KRAS G12D*} が混在していると解釈可能である。また、アレル変異頻度と蛋白発現異常の分布から、さらに clone^{*KRAS G12R + GNAS R201H + RNF43 R132* + p16*} と clone^{*KRAS G12D + TP53 R342**} の異なるクローンが近接し発生したと推察された。形態学的には低異型度な膵管内腫瘍性病変に、*TP53* 変異と蛋白過剰発現、*RNF43* 変異と蛋白発現消失、p16 発現異常が見られ、既に癌化 module の蓄積が開始されていた。また低異型度 IPMN や PanIN では、組織学的に一連の病変として採取されたサンプルに、複数の *KRAS* 変異が同定されることがあり、隣接領域においても多彩なクローンが混在していることが示された。

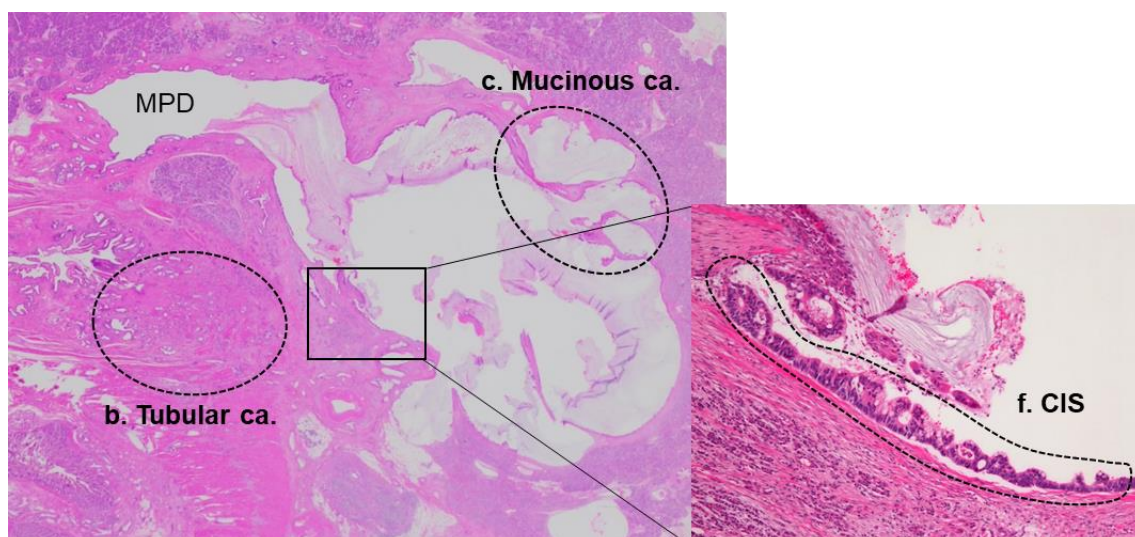
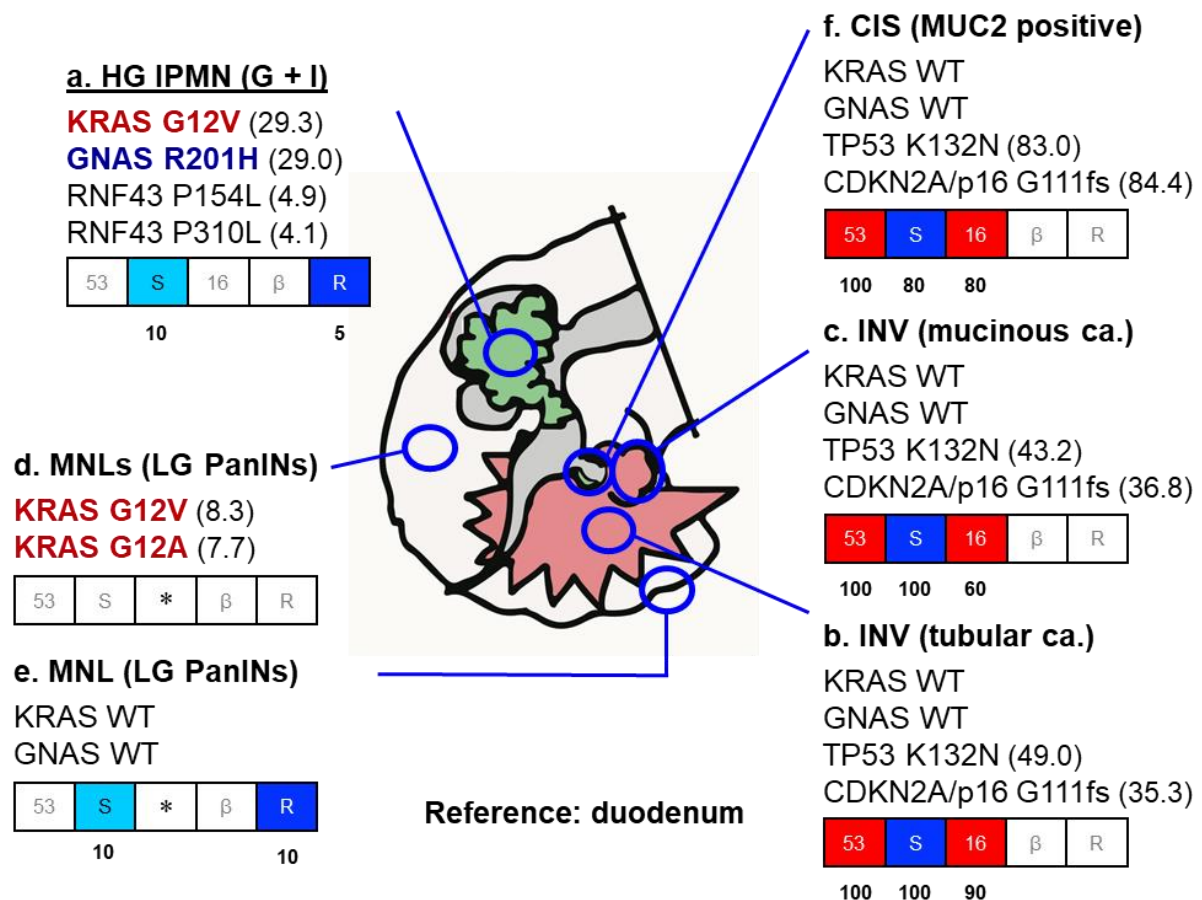


図 23 (前ページ) : **Case 9. Molecular subtype of PDA; *de novo*.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric and intestinal.

組織学的特徴：分枝型、胃型（+腸型）IPMN と離れて粘液癌成分を混じる管状腺癌が発生した例。膵頭部頭側に乳頭状結節を有する HG IPMN を認めた。その足側に、主膵管に交通する分枝膵管が拡張し、平坦状～低乳頭状の上皮内癌の進展と、豊富な粘液湖を形成する粘液癌への移行、また粘液癌から管状腺癌への移行が認められた。分枝を進展した上皮内癌および粘液癌は MUC2 陽性、CDX2 陽性を呈し、管状腺癌では MUC2、CDX2 は減弱～消失していた。Flat 型の腸型 IPMN 由来浸潤癌の可能性も検討されたが、浸潤癌巣に比して膵管内病変の割合が乏しく、臨床画像的にも IPMN と認識できなかったことから、IPMN 由来癌との確定診断には至らなかった。本研究では、頭側の IPMN(a)を本症例の co-existing IPMN とし、足側の浸潤癌をその併存癌として取り扱うこととした。

遺伝学的特徴：Co-existing IPMN(a)と浸潤癌(b, c)は異なる *KRAS* プロファイルを呈し、異なるクローンに由来すると考えられた。腸型形質を示す CIS(f)と粘液癌(b)、及び、管状腺癌(c)は、いずれも *KRAS* と *GNAS* が共に野生型で、同一の *TP53* 変異と *CDKN2A/p16* 変異および蛋白異常発現を有し、*SMAD4* の発現消失も見られた。これらは、遺伝学的連続性が示され、一連の病変と考えられたが、*GNAS* が野生型であり、遺伝学的にも同病変が IPMN 由来であることの証明には至らなかった。膵管癌において高頻度に見られる *KRAS* も野生型であり、遺伝学的にも特殊な膵癌の発生経路を辿ったと考えられる。膵癌における *CDKN2A/p16* の核・細胞質びまん性強陽性所見はこれまで報告されていないが、*CDKN2A/p16 G111fs* が同定され、膵管内病変から浸潤癌へ連続性が見られたことから、病的意義を示す所見の可能性はある。背景には IPMN および浸潤癌とは異なる分子プロファイルを呈する MNL の多発が見られた。

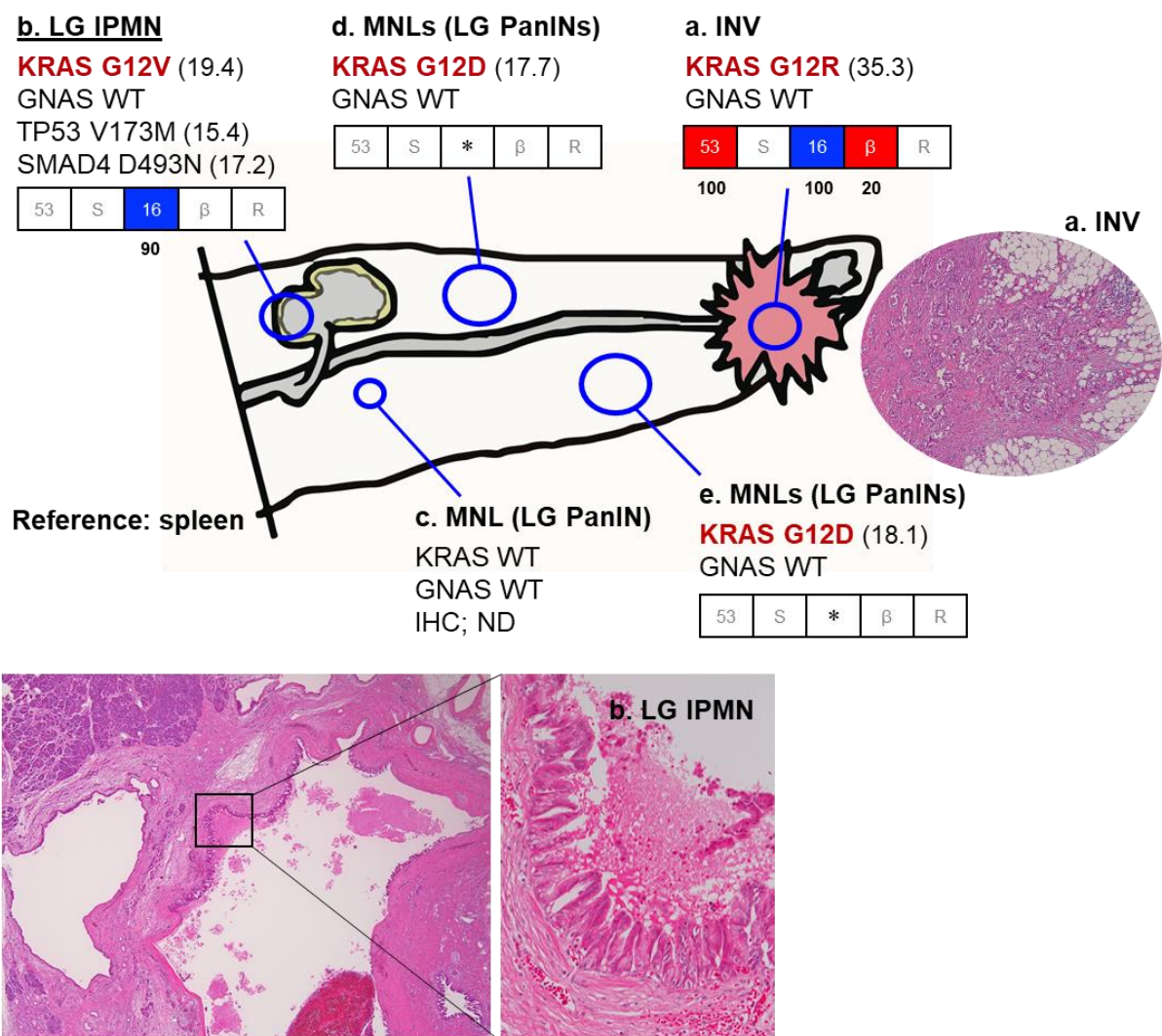


図 24 : **Case 10. Molecular subtype of PDA; *de novo*.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN と離れて発生した管状腺癌の例。IPMN は低異型度であった。背景膵に拡張に乏しい MNL が多発していた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(b)と LG IPMN(a)および MNL3 か所(c, d, e)は、いずれも異なる *KRAS* プロファイルを有し、それぞれ異なるクローンに由来すると考えられた。浸潤癌(b)では p53、p16、β-catenin の発現異常を認め、通常型膵癌と同様の癌化 module の蓄積が見られた。IPMN(a)は *GNAS WT* で、SMAD4 と p16 発現異常が認められた。IPMN 患者の膵臓における多様なクローンに由来する多中心性発生の例である。

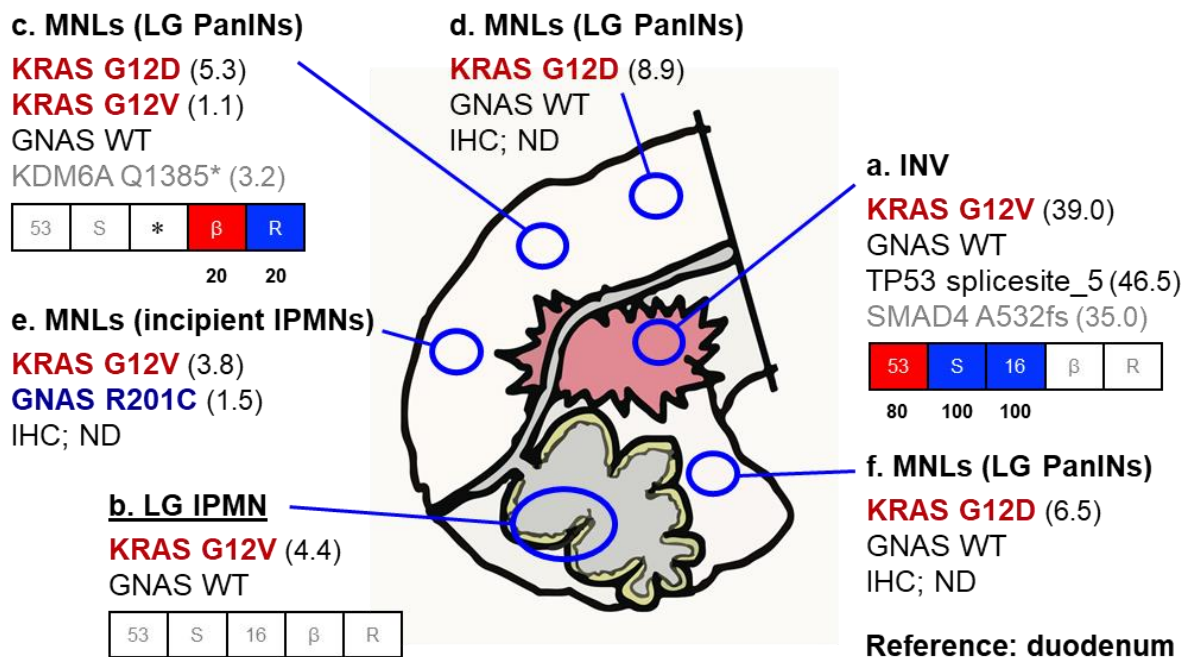


図 25 : **Case 11. Molecular subtype of PDA; Branch-off.**

Epithelial type of co-existing IPMN; **Gastric.**

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN に隣接して発生した管状腺癌の例。IPMN は低異型度で、浸潤癌に 0.5 cm まで近接していたが、組織学的移行像は明らかでなかった。背景膵には拡張に乏しい MNL が多発していた。膵頭部全体に腺房の萎縮、線維化、単核球、好中球浸潤を伴う膵炎が見られた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と隣接する LG IPMN(b)は、同一の *KRAS* 変異を有した。浸潤癌(a)では *KRAS* 変異に加え、*TP53* 変異と蛋白過剰発現、*SMAD4* 変異と蛋白発現消失、p16 発現消失が見られ、癌化に寄与したと考えられた。*SMAD4 A532fs* はデータベースに未登録であったため、variant unknown significance としたが、蛋白発現消失を呈しており、有害な frameshift 変異の可能性がある。隣接する IPMN(b)は *GNAS WT* であった。背景の MNL(c~f)にはそれぞれ *KRAS* 変異が同定され、1 か所では *GNAS* 変異が同定された。形態的にはいずれも膵炎内の LG PanIN と考えられたが、遺伝学的に一部は incipient IPMN と判断された。

d. MNLs (incipient IPMNs)

KRAS G12V (16.9)

KRAS G12D (2.2)

GNAS Q227H (4.2)

GNAS R201H (3.8)

53	S	*	β	R
----	---	---	---	---

b. LG IPMN

KRAS G12V (6.8)

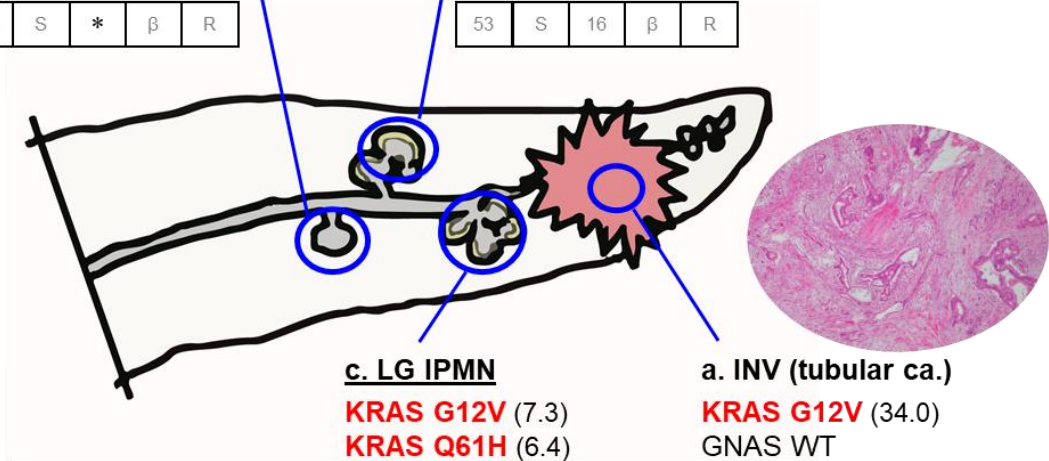
KRAS G12D (2.2)

KRAS Q61H (1.1)

GNAS R201H (8.0)

53	S	16	β	R
----	---	----	---	---

Reference: spleen



c. LG IPMN

KRAS G12V (7.3)

KRAS Q61H (6.4)

KRAS G12D (2.2)

KRAS G12R (1.1)

GNAS R201H (2.2)

53	S	16	β	R
----	---	----	---	---

a. INV (tubular ca.)

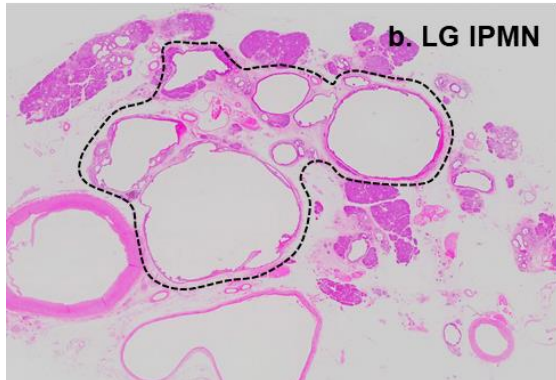
KRAS G12V (34.0)

GNAS WT

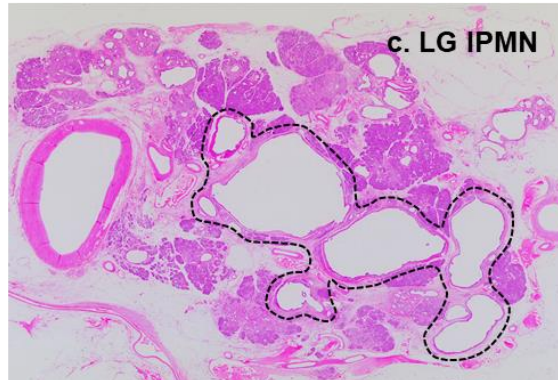
SMAD4 S232fs (35.0)

53	S	16	β	R
----	---	----	---	---

100 100



b. LG IPMN



c. LG IPMN

図 26 (前ページ) :

Case 12. Molecular subtype of PDA; Branch-off, contiguous via MPD.

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN に隣接発生した管状腺癌の例。IPMN は低異型度で、浸潤癌に 0.5 cm まで近接し、IPMN から浸潤癌への組織学的移行像は明らかではなかったが、二者の間の主膵管に低異型度腫瘍性上皮が連続していた。背景には 10 mm 程度の LG IPMN、および 5 mm に満たないが拡張傾向のある分枝膵管の MNL が数珠状に多発し、主膵管にも連続性に進展していた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と隣接する LG IPMN(d)および離れた IPMN(b)、MNL(c)は、いずれも同一の *KRAS* 変異を有した。IPMN、MNL では複数の *KRAS* バリエーションが同定されたが、いずれの病変においても、浸潤癌と共通した *KRAS G12V* のアレル変異頻度が最も高く、主たる変異バリエーションと判断された。浸潤癌(a)では *KRAS* 変異に加え、*SMAD4* 変異と発現消失、p16 発現消失が見られ、癌化に寄与したと考えられた。隣接する IPMN(d)では *GNAS* 変異が同定されたが、浸潤癌では *WT* であり、遺伝学的にも IPMN から直接的な浸潤癌への遺伝学的連続性は示されなかった。多様なクローンの多中心性発生を背景にしているが、近接して発生し二者間の膵管内を腫瘍性上皮が連続した IPMN と浸潤癌では共通の *KRAS* 変異が同定されたことから、形態学的・遺伝学的に同一の初期クローンに由来し、進化の過程で *GNAS* 変異を獲得したサブクローンが IPMN へ、*SMAD4* 変異と p16 異常を獲得したサブクローンが浸潤癌へと、「枝分かれ」して発育した可能性がある。但し、同一切片上に存在する系統学的に拡張傾向の見られた分枝膵管を一連の病変と考え組織採取(b, c, d)したが、複数の *KRAS* 変異バリエーションが同定され、隣接した領域にも多彩な腫瘍性クローンの発生が生じていることも示された。*KRAS G12V* のような hot spot 変異においては、必ずしも一致した *KRAS* 変異バリエーションを有する事が、同一のクローンに由来するとの仮説を直ちに証明するものではないことも示唆される。

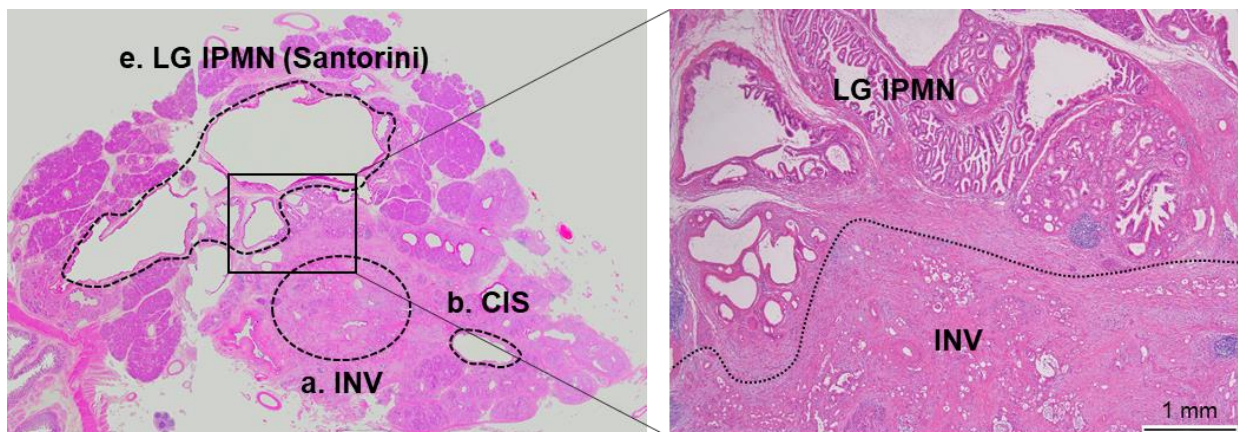
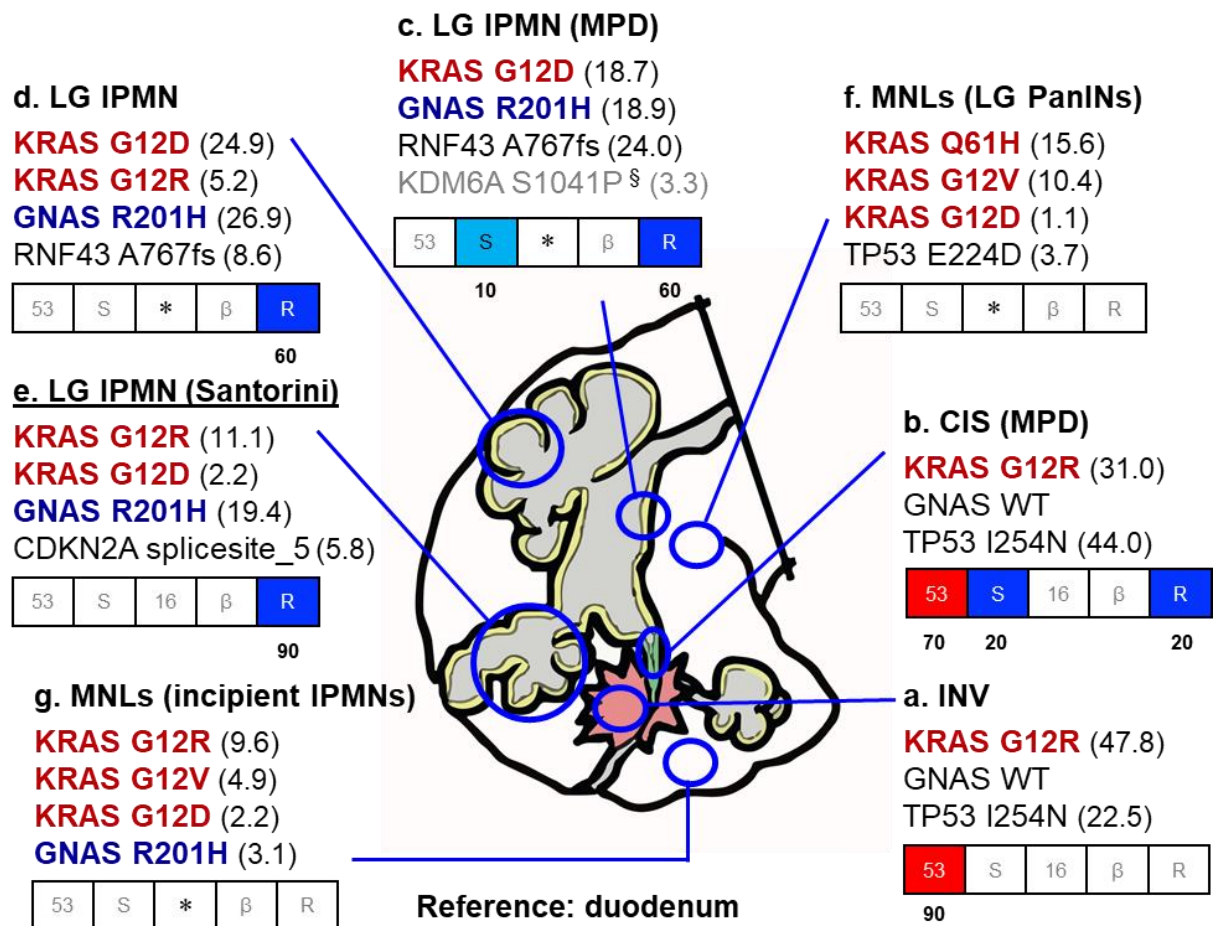


図 27 (前ページ) :

Case 13. Molecular subtype of PDA; Branch-off, contiguous via MPD.

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN に隣接発生した管状腺癌の例。Santorini 管主体に発生した IPMN は低異型度で浸潤癌に 0.1 cm まで近接していたが、IPMN と浸潤癌の組織学的移行像は明らかでなかった。二者間の Santorini 管から主膵管には膵管上皮置換性に進展する低異型度腫瘍性上皮が連続していた。浸潤癌に連続する主膵管に高異型度膵管内病変が見られ、CIS か intraductal cancer spread か鑑別を要した。背景に LG IPMN と MNL が多発していた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と隣接する LG IPMN(e)および連続する“CIS”(b)は、同一の *KRAS* 変異を有した。IPMN(e)には *GNAS* 変異が同定されたが、浸潤癌は *WT* であり、IPMN として成立した腫瘍から浸潤癌への直接的な遺伝学的連続性はない。浸潤癌(a)に *TP53* 変異および蛋白過剰発現が見られ、CIS とした高異型度膵管内病変(b)では同様の異常に加え、*TP53* アレル変異頻度の上昇と *SMAD4* 発現消失、*RNF43* 発現消失が認められた。遺伝子異常蓄積の方向から、CIS よりも intraductal cancer spread である可能性が高いと判断された。頭側の分枝から主膵管に及ぶ IPMN(c, d)と Santorini 管主体の IPMN(e)は連続していたが、異なる *KRAS* 変異が同定され、多中心性発生し衝突したと判断された。背景の MNL には多彩な *KRAS* 変異が同定された。多様なクローンの多中心性発生を背景にしているが、近接して発生し、二者間の膵管内を腫瘍性上皮が連続した IPMN と浸潤癌では共通の *KRAS G12R* 変異が同定されたことから、形態学的・遺伝学的に同一の初期クローンに由来し、進化の過程で *GNAS* 変異を獲得したサブクローンが IPMN へ、*TP53* 変異を獲得したサブクローンが浸潤癌へと、「枝分かれ」して発育した可能性が示唆された。*RNF43 D767fs* は蛋白発現消失を来す frameshift 変異と考えられた(c, d)。

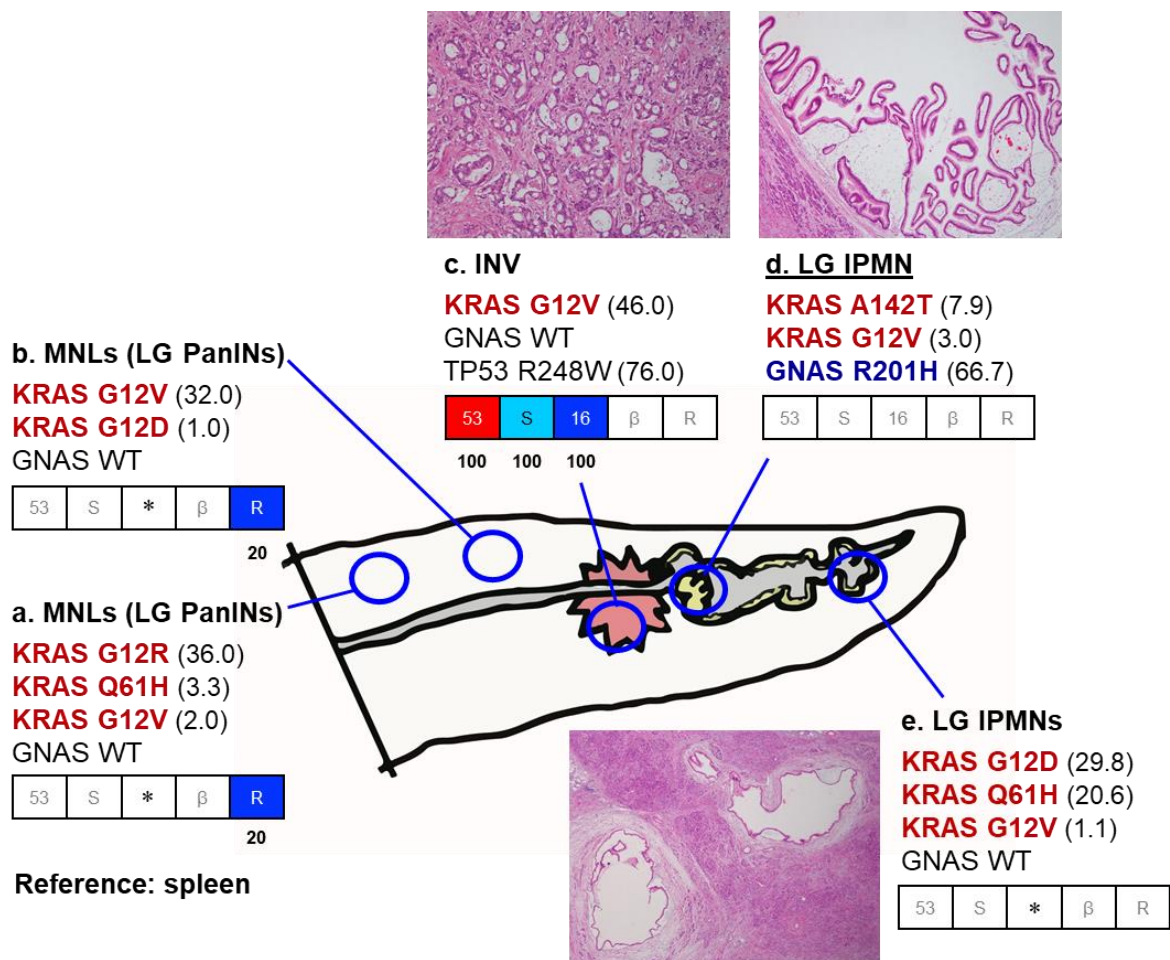


図 28 : **Case 14. Molecular subtype of PDA; Branch-off.**

Epithelial type of co-existing IPMN; **Intestinal.**

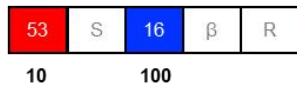
組織学的特徴:分枝型、腸型 IPMN に隣接して発生した低分化管状腺癌の例。IPMN は低異型度で、浸潤癌に 0.5 cm まで近接していたが、IPMN と浸潤癌の組織学的移行像は明らかでなかった。膵尾部にも IPMN が多発していた。背景膵には拡張に乏しい分枝膵管の MNL が多発していた。

遺伝学的特徴:浸潤癌(c)と隣接する LG IPMN(d)では同一の *KRAS* 変異を有した。しかし、IPMN(d)では *KRAS* アレル変異頻度に比較して高率な変異頻度を呈する *GNAS* 変異が同定された。浸潤癌(c)では *KRAS* 変異に加え、*TP53* 変異および蛋白過剰発現、*SMAD4* 発現減弱、*p16* 発現消失が見られ、癌化に寄与したと考えられた。IPMN と浸潤は近接して発生し、共通した *KRAS* 変異が同定され、“branch-off subtype”に分類したが、アレル変異頻度の比較から、IPMN(d)は主に *GNAS* 変異にドライブされる腸型 IPMN で、*KRAS* 変異は連続した異なるクローンの変異を検出した可能性も否定できない。*KRAS* 変異バリエーションの一致性から“branch-off subtype”とした群には、遺伝学的に多様な症例が含まれていると考えられる。背景膵には多様なクローンの多中心性発生が見られた。

Reference: duodenum

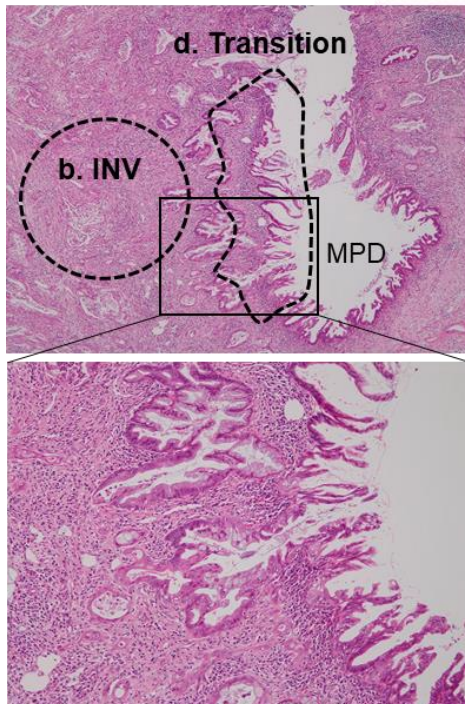
d. Transition

KRAS G12D (44.8)
GNAS WT
TGFB1 V115L (7.0)



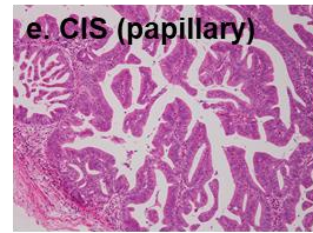
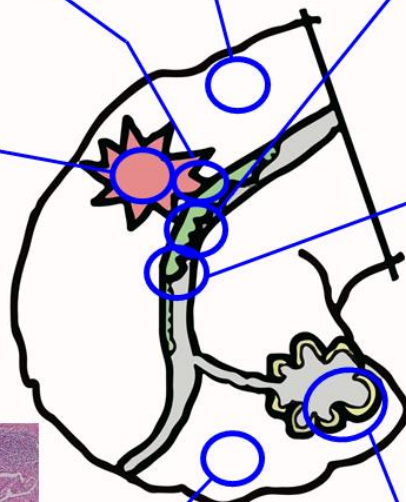
b. INV

KRAS G12D (35.7)
GNAS WT
TGFB1 V115L (12.7)



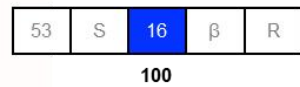
f. MNL (LG PanINs)

KRAS G13D (5.1)
KRAS G12R (4.4)
GNAS WT



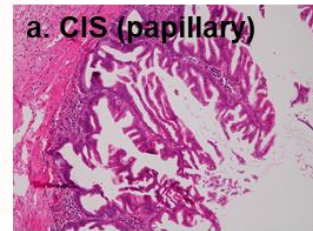
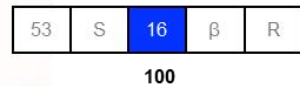
e. CIS (papillary)

KRAS G12D (50.8)
GNAS WT
TGFB1 P436L § (17.1)
PIK3CA R1023L (3.6)



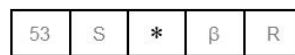
a. CIS (papillary)

KRAS G12D (73.0)
GNAS R201H (1.7)



g. MNL (incipient IPMN)

KRAS G12V (10.3)
GNAS R201H (9.0)
TP53 G108S (3.2)
RBM10 R766C § (4.0)
PIK3CA R1023L (1.1)



c. LG IPMN

KRAS G12V (13.7)
GNAS R201H (12.0)



50

図 29 (前ページ) : **Case 15. Molecular subtype of PDA; *de novo*.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Intestinal and gastric.

組織学的特徴：分枝型、腸型（＋胃型）IPMN と離れて発生した管状腺癌の例。浸潤癌に連続し、主膵管内を充満する丈の高い乳頭状の高異型度膵管内病変(CIS, a)を認めた。CIS には核異型が高度化した領域(e)が混在したが、浸潤癌へ移行した部位(d)の核異型は(a)と同等であった。

遺伝学的特徴：浸潤癌(b)と LG IPMN(c)は異なる *KRAS* プロファイルを有し、各異なるクローンに由来すると考えられた。腸型 IPMN に併存膵癌が発生した症例である。浸潤癌(b)に連続する CIS(a, e)と移行部(d)は共通の *KRAS* 変異を有し、p16 の発現消失も認められ一連の病変と判断される。浸潤に至る過程(d)で *TGFBR1 V115L* と p53 過剰発現が見られ、浸潤癌ではさらに SMAD4 発現減弱が認められた。CIS の発生に *KRAS* 変異および p16 異常が関与し、*TGFBR1* 変異と p53 異常の蓄積により浸潤癌を形成し、浸潤癌の中でさらに SMAD4 異常が蓄積されたと考えられた。また CIS(a)から核異型高度化した CIS(e)に進化する段階で *TGFBR1 P436L* が蓄積したが、そのクローンは浸潤癌へ至っていなかった。上皮内癌の段階においても進化の分岐が示された点が興味深い。CIS(a)に低頻度の *GNAS* 変異が検出されたが、*KRAS* 変異とのアレル変異頻度の差から、CIS 近傍に存在した主膵管内の微小病変 (incipient IPMN) の混在を見ているものと解釈した。背景膵(f, g)には多彩なクローンが確認され、IPMN 患者の膵臓における多中心性発生の例である。

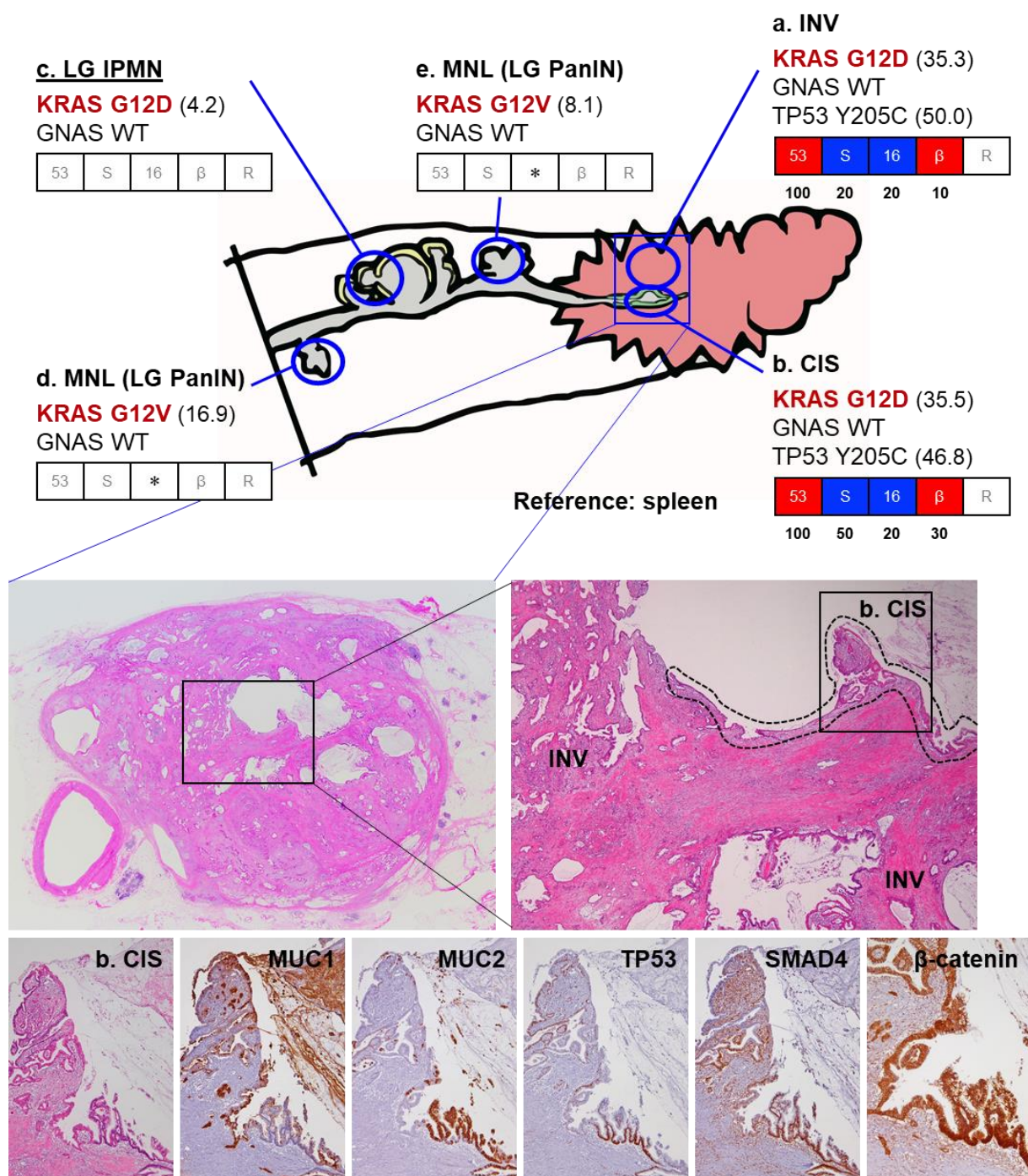


図 30 (前ページ) : **Case 16. Molecular subtype of PDA; Branch-off.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN と 2 cm 離れて発生した管状腺癌の例。浸潤癌の組織型は高～中分化管状腺癌主体だが、脾臓側に癌細胞の粘液産生と間質への粘液漏出を伴う粘液癌成分の混在が認められた。また浸潤癌内の主膵管、分枝膵管に低乳頭状増殖する CIS の進展が見られた。IPMN は低異型度で、背景膵には 10 mm に満たないが拡張が目立つ MNL が数珠状に多発していた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と CIS(b)、および LG IPMN(c)は共通の *KRAS G12D* を有したが、その間に *KRAS G12V* を有する PanIN(MNL, e)が介在していた。*KRAS* プロファイルの共通性のみで、直ちに初期クローンを共有していることの証明にならないことが示唆される一例である。CIS(b)および浸潤癌(a)には *TP53* 変異および蛋白過剰発現が全体に認められ、さらに多彩な遺伝学的形質の蓄積を示した。粘液産生豊富な腺癌領域（ミクロ画像画面右下）は MUC1 陰性、MUC2 陽性で腸型形質を示し、 β -catenin 核内集積を認めた。一方 SMAD4 と p16 の発現異常は見られなかった。本成分が脾臓側の粘液癌の形成に至ったと考えた。また粘液産生の目立たない通常型の管状腺癌の領域（ミクロ画像画面左側）は MUC1 陽性、MUC2 陰性で、SMAD4 発現消失および一部で p16 発現消失を認めた。一方 β -catenin の発現異常は認められなかった。上皮内癌の段階で *TP53* 変異を獲得したことにより、ゲノム不安定性が亢進し、同時期に複数の遺伝子異常の獲得につながり、遺伝学的形質および形態が大きく 2 方向に分かれた可能性が示唆された。膵癌内の遺伝学的多様性と、その成因が示された症例と考える。

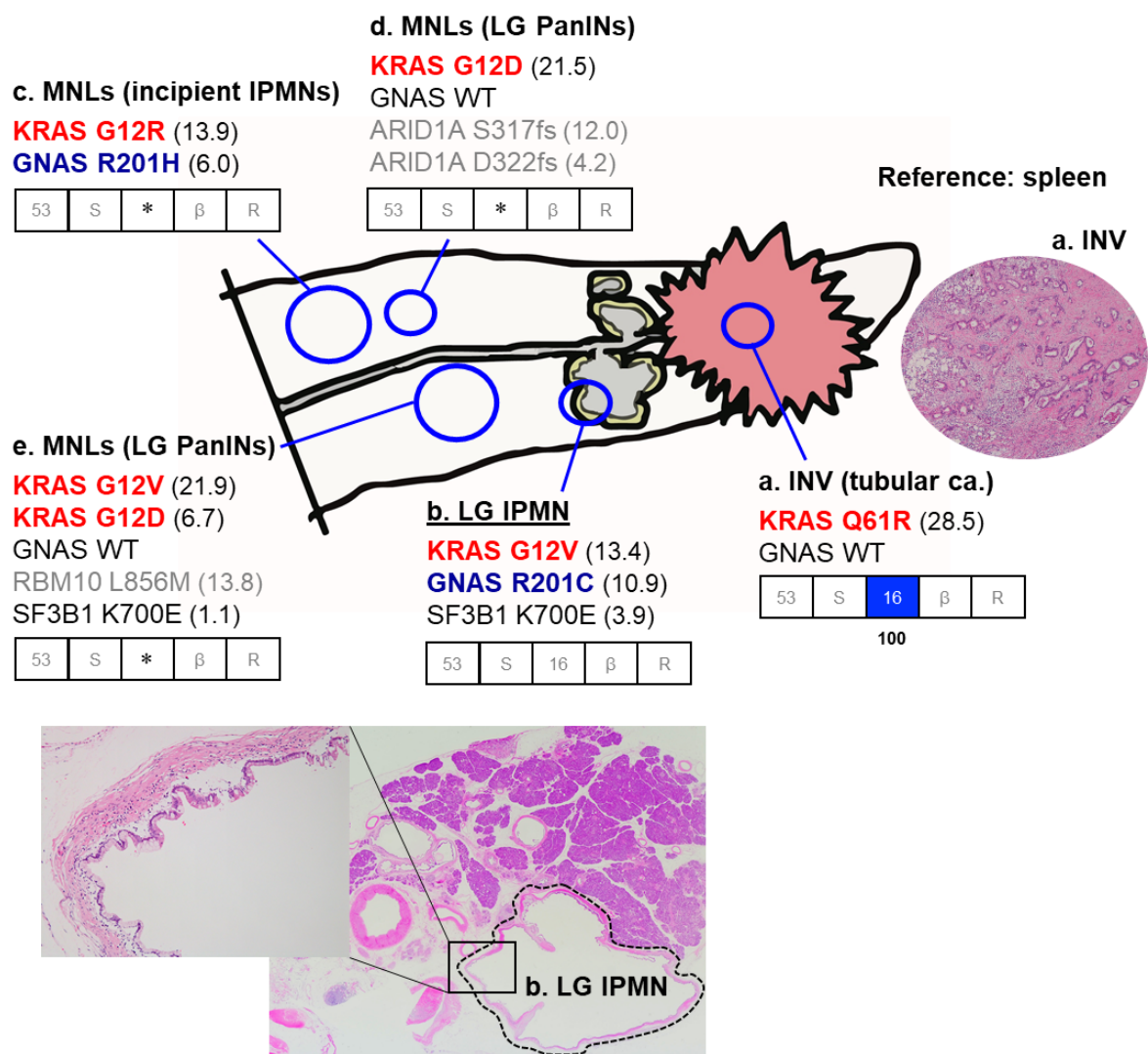


図 31 : **Case 17.** Molecular subtype of PDA; *de novo*.

Epithelial type of co-existing IPMN; **Gastric.**

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN と 0.3 cm と近接して発生した管状腺癌の例。IPMN は低異型度で、浸潤癌との組織学的移行像は明らかでなかった。背景膵に 1.0 cm に至らないが拡張傾向のある MNL が数珠状に多発していた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と LG IPMN(b)は異なる *KRAS* 変異を有し、各異なるクローンに由来すると考えられた。浸潤癌(a)では p16 の発現消失を認めたが、その他の癌化 module の異常は認められなかった。背景膵の MNL(c~e)にも多彩なクローンの発生が認められ、IPMN 患者の膵臓における多様なクローンに由来する多中心性発生の例である。

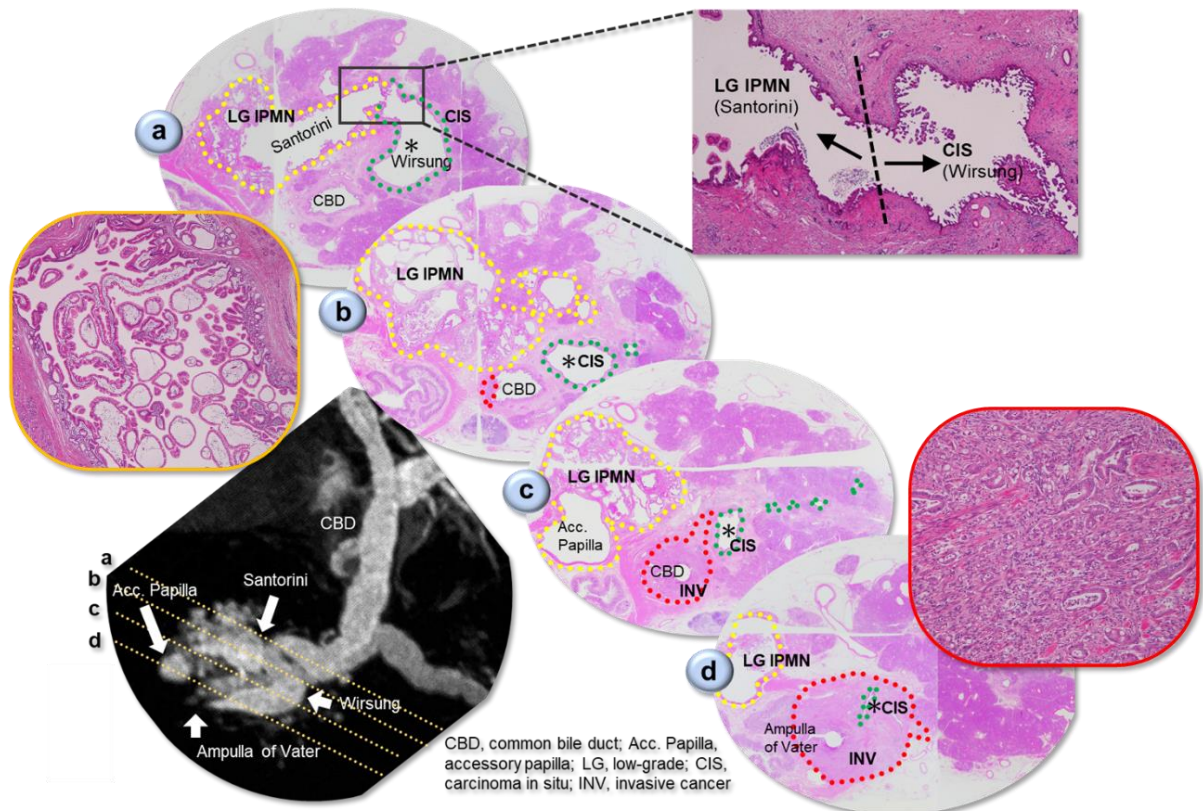
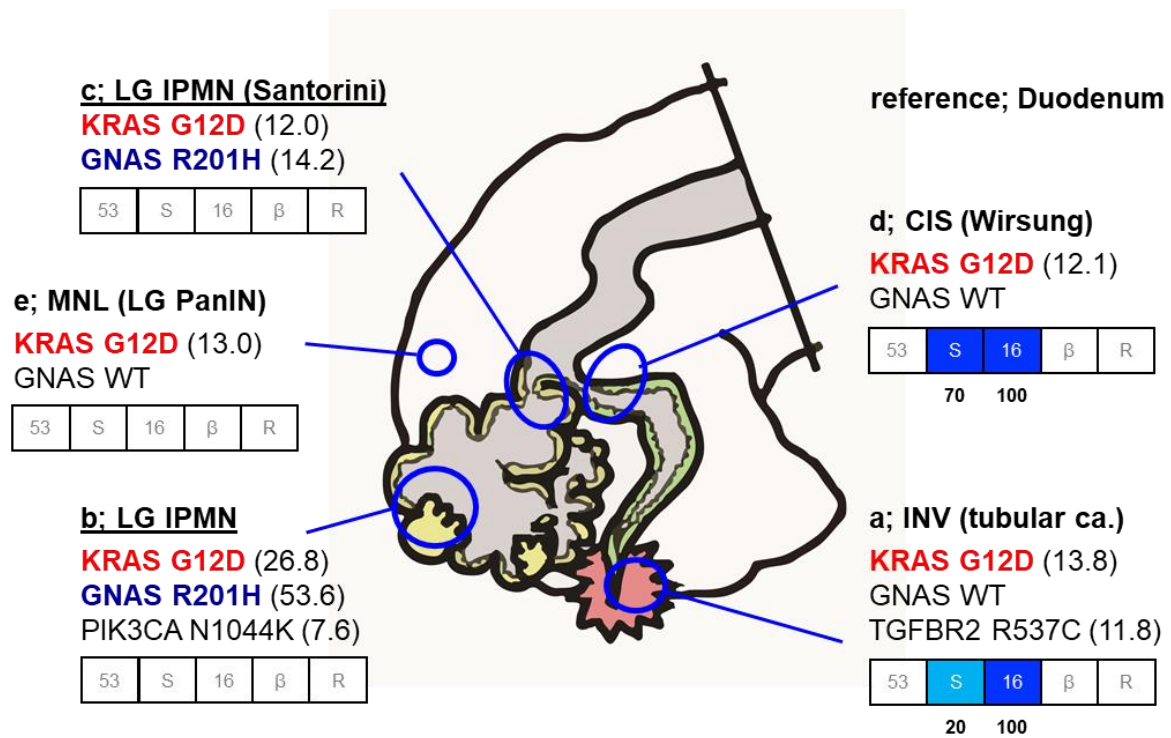
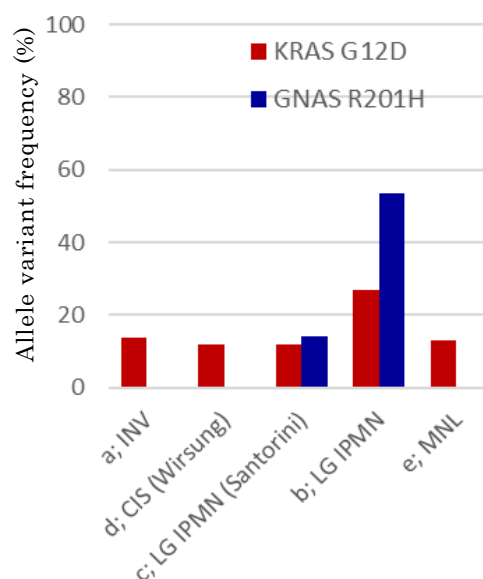


図 32 (前ページ) : **Case 18. Molecular subtype of PDA; Branch-off, contiguous via MPD. Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.**

組織学的特徴: Santorini 管に発生した分枝型、胃型に隣接発生した管状腺癌の例。副乳頭手前に乳頭状結節(b)を形成する低異型度 IPMN は、浸潤癌(a)に 0.5 cm まで近接していたが、IPMN と浸潤癌の組織学的移行像は明らかでなかった。二者間の Santorini 管内には低乳頭増殖する低異型度腫瘍性上皮(c)が進展し、Wirsung 管との分岐部で低乳頭状増殖する高異型度腫瘍性上皮(d)へ連続していた。いずれも粘液形質は胃型を呈した。Vater 乳頭部まで高異型度腫瘍性上皮が連続し、浸潤癌へ移行していた。背景膵の分枝膵管には低異型度な MNL と高異型度腫瘍性病変が分布していた。

遺伝学的特徴: 関心領域 5 病変はいずれも同一の *KRAS G12D* 変異を有した。Santorini 管を進展した低異型度腫瘍性上皮(c)は *GNAS* 変異が同定され、平坦状進展する IPMN と判断される。各病変の *KRAS* と *GNAS* のアレル変異頻度を下図に示す。IPMN 乳頭状結節部(b)では、*GNAS* アレル変異頻度が上昇し、*PIK3CA* の蓄積が見られた。平坦状の IPMN(c)がより初期の病変で、乳頭状結節は IPMN として進化・成熟した病変と捉えられる。Wirsung 管を進展する高異型度腫瘍性上皮(d)および浸潤癌(a)は、*GNAS WT* で、*KRAS* 変異に加え p16 の発現消失が認められ、浸潤癌ではさらに *TGFBR2* 変異が蓄積していた。SMAD4 蛋白発現が(d)での消失に対し、浸潤癌(a)で減弱であった点が議論となるが、*TGFBR2* 変異の蓄積から CIS(d)から浸潤癌に至ったと考えた。背景膵の低異型度 MNL は *KRAS* 変異のみ認められた。近接して発生した IPMN と浸潤癌の間に膵管上皮置換性に進展する腫瘍性上皮の連続が証明され、共通の *KRAS* 変異が同定されたことから、形態学的・遺伝学的に同一の初期クローン

に由来し、進化の過程で *GNAS* 変異を獲得したサブクローンが IPMN へ、p16 異常と *TGFβ* 経路異常を獲得したサブクローンが浸潤癌へ、「枝分かれ」して発育した可能性が示唆された。*KRAS* 変異のみ同定された軽度異型上皮(e)は最も初期段階のクローンの広がり(残存)という解釈もできる。正しく Wirsung 管と Santorini 管の分岐を境に、副乳頭方向へ向かう IPMN の発生と、Vater 乳頭方向へ向かう PanIN 経路からの浸潤癌の発生へ、「Branch-off = 枝分かれ」した症例と考えた。



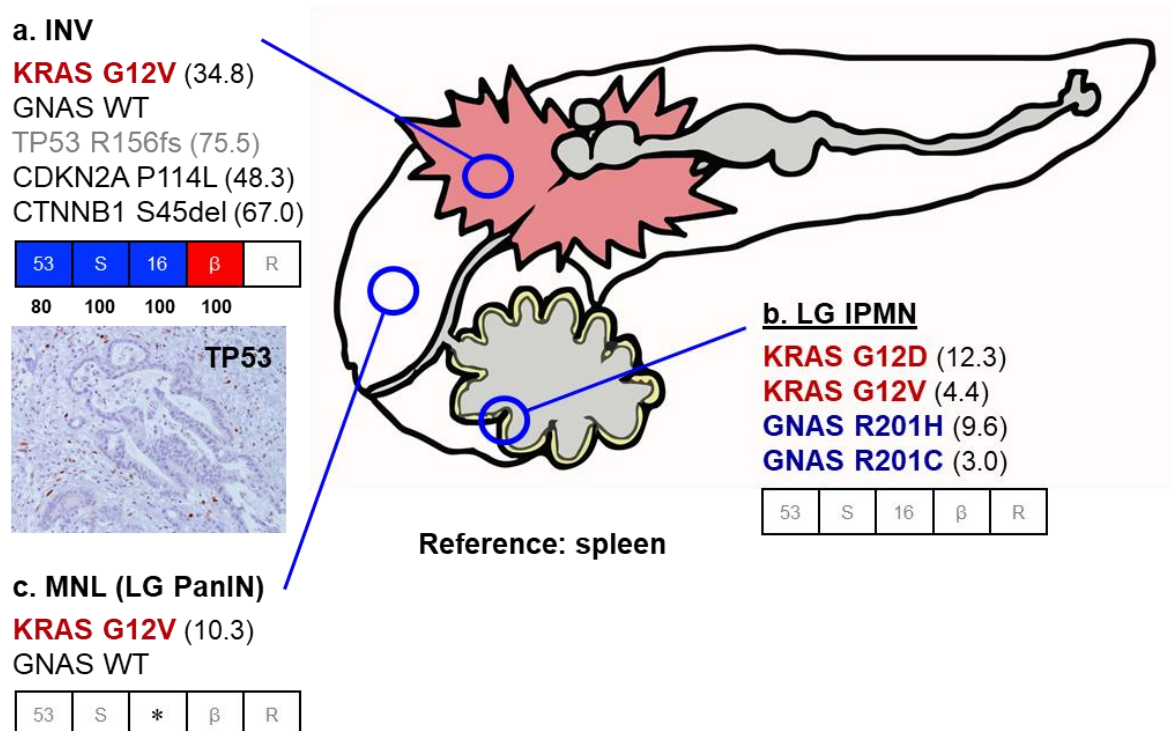


図 33 : **Case 19. Molecular subtype of PDA; Branch-off.**

Epithelial type of co-existing IPMN; **Gastric.**

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN と 2 cm 離れて発生した管状腺癌の例。IPMN は低異型度で、膵鉤部を主体に発生し、浸潤癌は頭体移行部を主体に発生していた。背景膵に拡張に乏しい MNL が散見された。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と LG IPMN(b)には同一の *KRAS G12V* が同定されたが、IPMN には 2 種類の *KRAS* 変異が同定され、アレル変異頻度から判断される主たるバリエントは *KRAS G12D* であった。また両者は発生の主座が離れていた。

“Branch-off subtype”に分類したが *KRAS* プロファイルの共通性のみで、直ちに初期クローンを共有していることの証明にはならないことが示唆される一例である。IPMN(b)では *KRAS* 変異と共に *GNAS* 変異も 2 種類同定された。アレル変異頻度の近似性から、clone^{*KRAS G12D+GNAS R201H*} と clone^{*KRAS G12V+GNAS R201C*} から成る LG IPMN が近接して多中心性に発生したと考えられた。浸潤癌では、*KRAS* 変異に加え、*TP53* フレームシフト変異および蛋白発現消失、*SMAD4* 発現消失と *CDKN2A/p16* 変異および p16 蛋白発現消失、*CTNNB1* 変異および β-catenin 核内集積を認め、多数の癌化 module の蓄積が確認された。

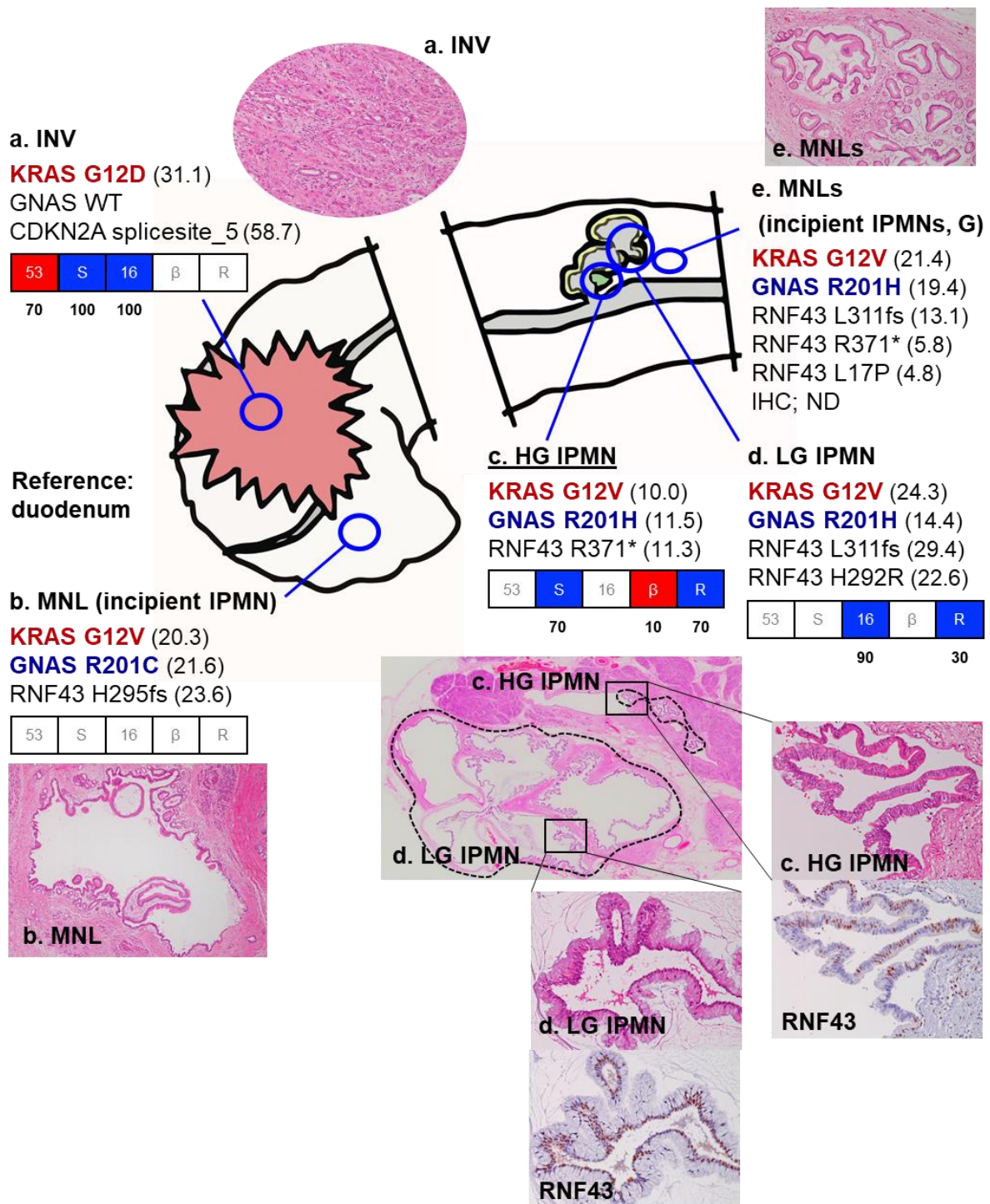


図 34（前ページ）： **Case 20. Molecular subtype of PDA; *de novo*.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Intestinal.

組織学的特徴：膵体部の分枝型、腸型 HG IPMN に対する膵中央切除術 4 年後に、膵頭部に管状腺癌が異時性に発生した例。初回切除断端は陰性であった。IPMN 術後、3 カ月毎に画像フォローアップがなされていたが、急激な増大を呈する進行膵癌の状態で発見された。浸潤部の組織型は腺管形成に乏しく、びまん性に浸潤する低分化腺癌であった。浸潤癌近傍に上皮の乳頭状増殖を呈するやや拡張した MNL が分布していた。初発時の IPMN は多房性に拡張し MUC2 発現を見る腸型 LG IPMN、異型が上昇した HG IPMN、また周囲に PanIN と鑑別困難な拡張に乏しい胃型形質の MNL が分布し、3 段階の病変から成っていた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と IPMN(c, d)は異なる *KRAS* 変異を有し、各異なるクローンに由来すると考えられた。腸型 IPMN にも併存膵癌が発生する。浸潤癌(a)では p53 過剰発現と SMAD4 発現消失、*CDKN2A/p16* 変異および p16 蛋白発現消失を認め、癌化へ関与したと考える。腸型 IPMN(c, d)および近傍の胃型 MNL(e)はいずれも同一の *KRAS* 変異と *GNAS* 変異を有し、同一クローンに由来する一連の IPMN と考えられる。胃型の incipient IPMN(e)に 3 種類の *RNF43* 変異が同定され、*RNF43 L311fs* は LG IPMN(d)に、*RNF43 R371**は HG IPMN にのみ引き継がれていた。胃型 IPMN として発生し、腸型 IPMN に進展した証明になるとともに、限局した範囲の初期クローンの段階でも複数の *RNF43* 変異を獲得し、個々のサブクローンがそれぞれ肉眼的に捉え得る IPMN に進展したと考えられた。LG IPMN(d)に見られた p16 発現消失が、HG IPMN(c)には認められなかったことも、隣接する LG IPMN と HG IPMN が連続的発育を取らなかった根拠となり得る。さらに、離れた incipient IPMN(b)は初発時の IPMN と *GNAS* バリエントが異なることから、多中心性発生と考えられ、初発時とは異なる *RNF43* 変異が同定された。本例では、同一膵に計 5 種類の *RNF43* 変異バリエントが同定された。

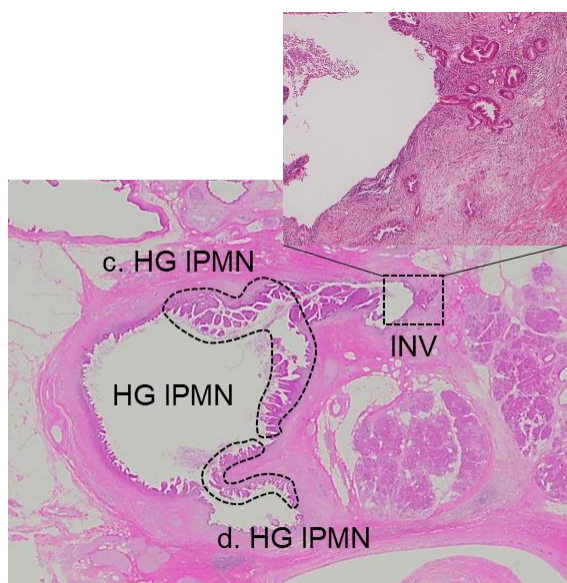
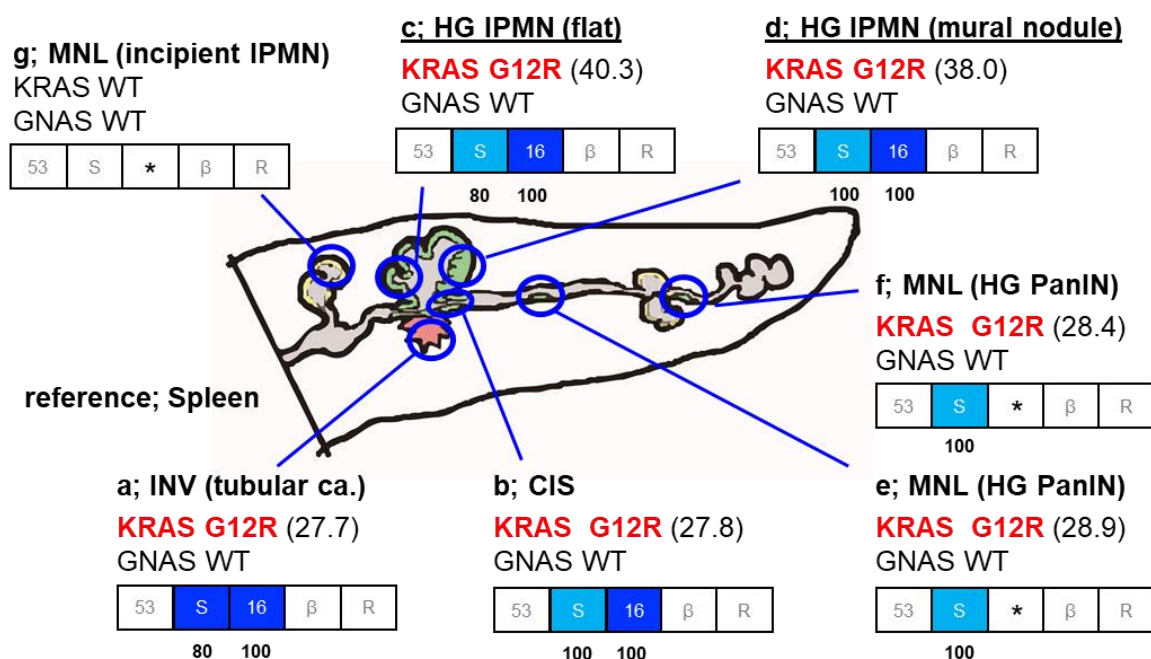


図 35a : Case 21, primary cancer.

Molecular subtype of PDA; **Branch-off**. Epithelial type of co-existing IPMN; **Gastric**.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN に隣接し、管状腺癌が発生した例。術前化学療法により病変は縮小した。分枝膵管に乳頭状増殖する HG IPMN を認め、交通する主膵管に平坦状増殖する CIS から浸潤癌への移行を認めた。隣接した併存癌か、flat type IPMN からの由来浸潤癌か病理医間で意見が分かれた。膵

体部と膵尾部の主膵管に低乳頭状増殖する HG PanIN を非連続性に認めた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と CIS(b)、IPMN(c, d)は、いずれも同一の *KRAS* 変異を有し、p16 発現消失も認められた。

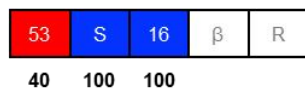
IPMN から浸潤癌への遺伝学的連続性を呈しているという

解釈も成り立つが、形態学的に IPMN から浸潤癌への移行像が明らかでなく、IPMN 由来癌とは判定できなかった。また、非連続性に見られた主膵管内の HG PanIN 2 病変(e, f)、また後述する再発癌巣と IPMN いずれにも、同一の *KRAS* 変異が認められており、遺伝学的に興味深い症例である。

k. Transition

KRAS G12R (29.4)

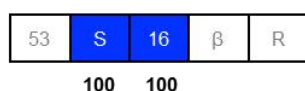
GNAS WT



i. CIS (papillary)

KRAS G12R (53.6)

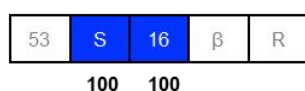
GNAS WT



j. CIS (flat)

KRAS G12R (26.4)

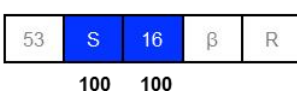
GNAS WT



l. HG IPMN

KRAS G12R (22.3)

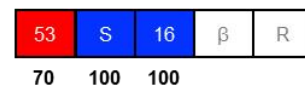
GNAS WT



h. INV

KRAS G12R (16.2)

GNAS WT



m. MNLs (LG PanINs)

KRAS G12R (12.4)

KRAS G12D (5.3)

GNAS WT

BRAF L597V (5.2)

TP53 R175H (4.2)

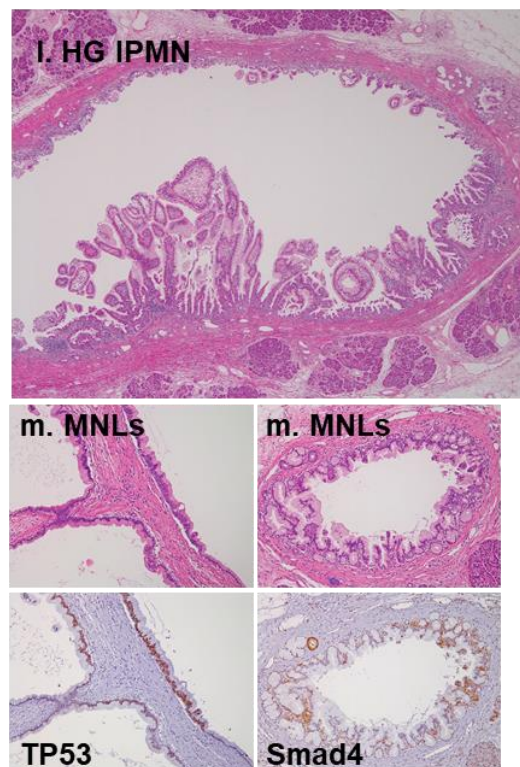
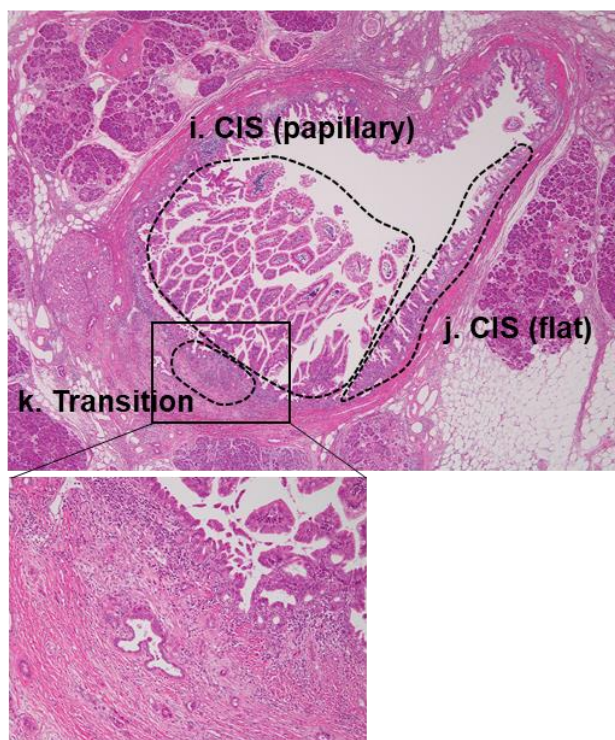
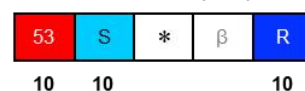


図 35b (前ページ) : **Case 21, secondary cancer.** Molecular subtype of PDA;

Branch-off. Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：膵体尾部切除術の2年後に、残膵（膵頭部）に管状腺癌が再発した例。主膵管乳頭部近傍に乳頭状増殖する胃型、高異型度 IPMN(l)が併存した。浸潤癌の乳頭側に乳頭状～平坦状に増殖する CIS(i, j)を認め、浸潤癌と移行的(k)であった。CIS を IPMN と判断するか否かにつき、病理医間で組織学的見解が分かれた。背景膵には拡張傾向のある MNL が多数認められた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(h)と co-existing IPMN(l)は、同一の *KRAS* 変異を有し、*SMAD4* 発現消失と *p16* 発現消失が共通していた。いずれも *GNAS WT*であった。また相同な遺伝学的異常は CIS(i, j)と移行部(k)にも認められた。同一クローンによる一連の発生を否定できないものの、IPMN の進展範囲と浸潤癌の進展範囲にややずれがあり、IPMN 由来癌としても典型的ではなかった。浸潤癌(h)では *p53* 過剰発現が認められ、悪性度上昇に寄与したと考えられた。MNL(m)では、低異型度であるが、*TP53* 変異および蛋白過剰発現、*SMAD4* 発現消失、*BRAF* 変異が見られ、癌化 module の蓄積が進んでいた。

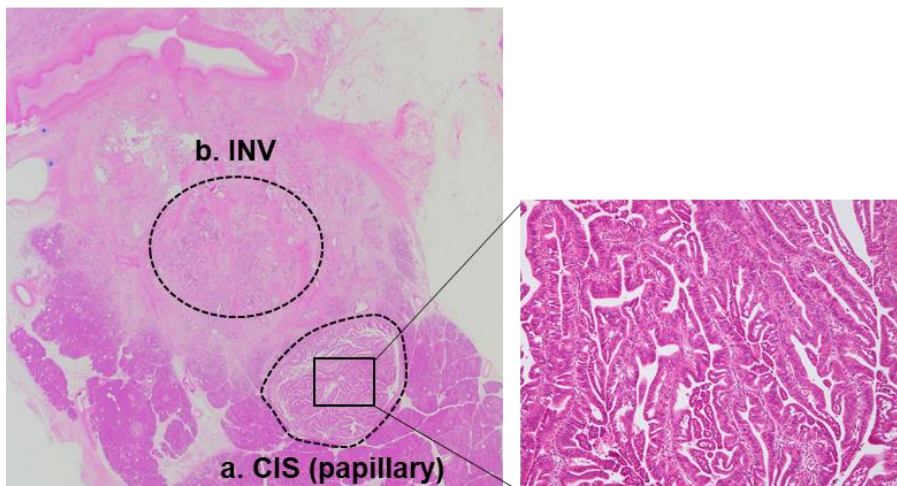
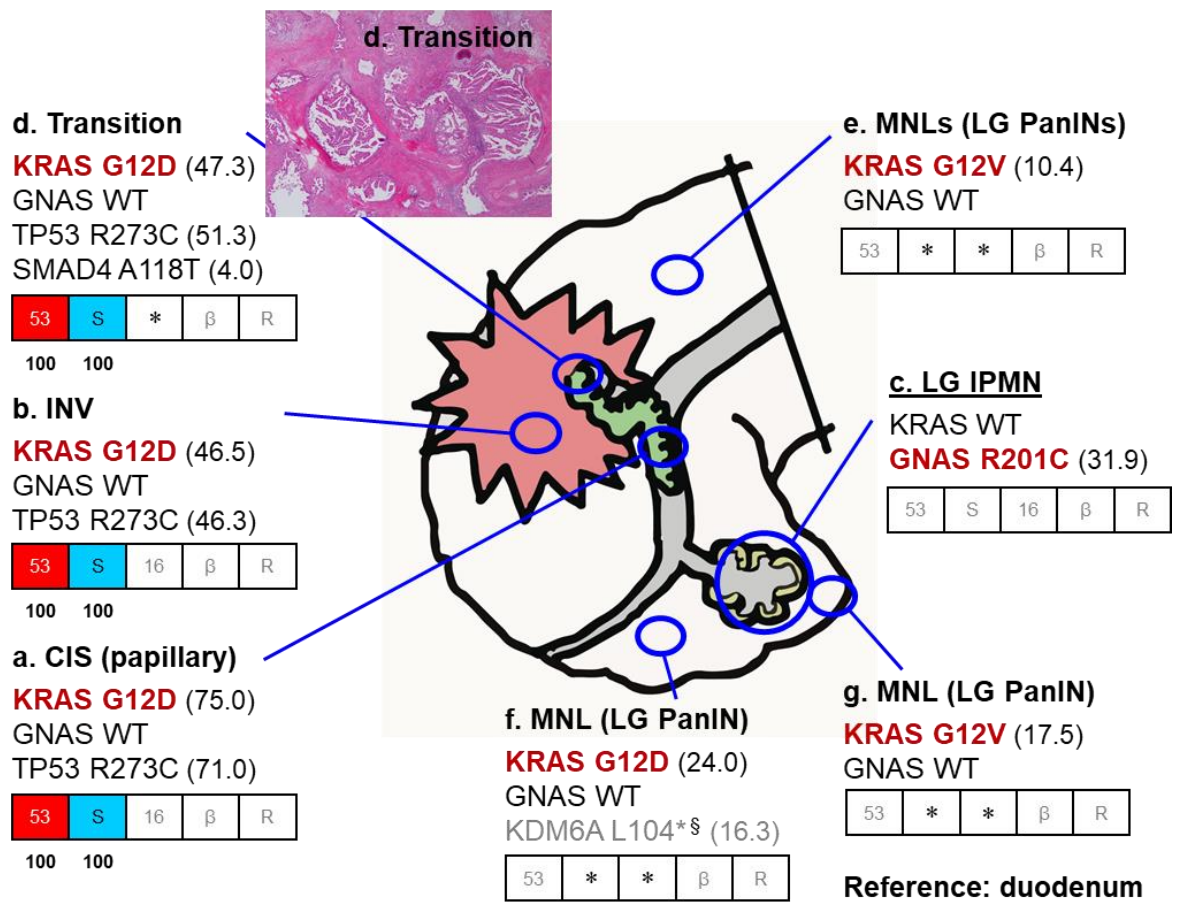


図 36（前ページ）： **Case 22. Molecular subtype of PDA; *de novo*.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN と離れて発生した管状腺癌の例。浸潤癌に連続し、主膵管内を充満する丈の高い乳頭状の CIS を認めた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(b)と LG IPMN(c)は異なる *KRAS* 変異を有し、各異なるクローンに由来すると考えられた。浸潤癌(b)に連続する CIS(a)と移行部(d)は共通の *KRAS* および *TP53* 変異と蛋白過剰発現、*SMAD4* 発現減弱が見られ、一連の病変と判断される。移行部(d)において低いアレル変異頻度であるが、他部位にはない *SMAD4* 変異が同定され、浸潤癌内の遺伝学的多様性が示された。浸潤癌と CIS は同様の遺伝学的形質を呈し、intraductal cancer spread である可能性は否定し得ない。IPMN は *GNAS* 変異を有し、*KRAS WT* であった。背景膵(e, f, g)には多彩なクローンが確認され、IPMN 患者の膵臓における多中心性発生の例である。

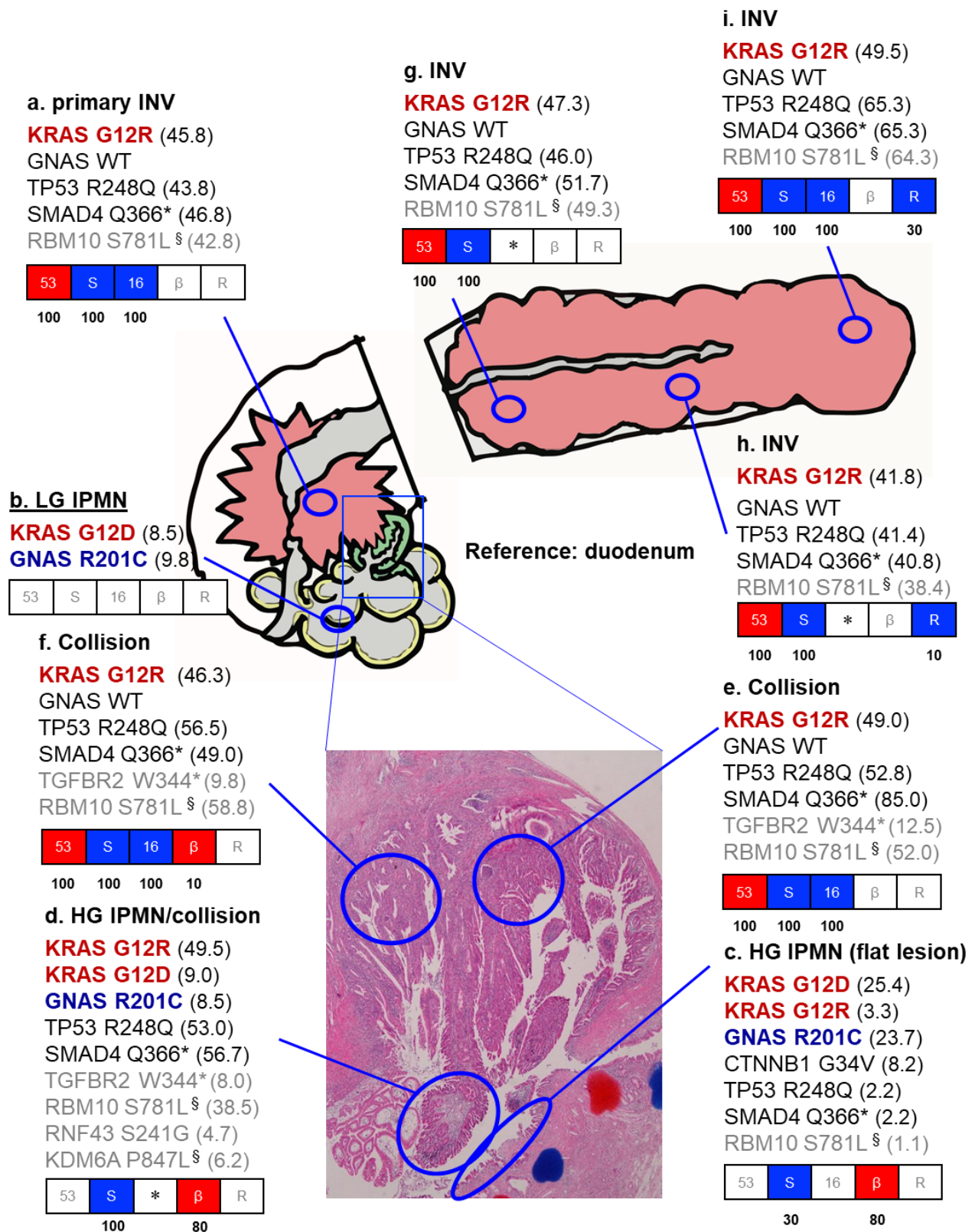


図 37（前ページ）： **Case 23. Molecular subtype of PDA; *de novo*.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN と隣接して発生した管状腺癌の例。IPMN が膵頭部背側・足側に、浸潤癌が膵腹側・頭側に分布し、一部で IPMN により拡張した分枝膵管内に、開大した間質を伴った乳頭状結節様構造を伴い、浸潤癌が衝突していた。衝突部の IPMN は高異型度で、隣接併存癌の衝突と IPMN 由来浸潤癌の鑑別が問題となった。膵頭部癌に対する膵頭十二指腸切除術の 1 年後に、膵体尾部の腫大を認め、残膵切除が施行された。びまん性に管状腺癌が増殖し、癌細胞の形態学的類似性から膵内転移と考えられた。

遺伝学的特徴：初発時の浸潤癌(a)と LG IPMN(b)は異なる *KRAS* 変異を有し、各異なるクローンに由来すると考えられた。LG IPMN(b)に連続した HG IPMN(c)は共通の *KRAS G12D* と *GNAS R201C* を有し、HG IPMN(c)では *CTNNB1* 変異及び蛋白核内集積を認めた。浸潤癌は *KRAS G12R* と *TP53* 変異、*SMAD4* 変異、*RBM10* 変異が認められ、乳頭状結節様の衝突部(d, e, f)にも共通した変異が同定された。衝突部では IPMN と浸潤癌の各変異が混在していた。膵背側に位置する IPMN に、腹側から管状腺癌が浸潤し、IPMN 内に結節状構造を呈したと考えられた。衝突部は laser capture microdissection (LCM) にて各関心領域の組織を採取し DNA を抽出した。(d)では複数の遺伝子にアレル変異頻度の低い変異バリエーション (いずれも VUS) がコールされたが、これらは、LCM による DNA 断片化による“ノイズ”の可能性を否定できない。再発時、膵体尾部 3 か所(g, h, i)はいずれも、初発時の管状腺癌(a)と同一の遺伝子変異と蛋白発現異常を呈し、膵頭部癌と同一クローン由来であると証明され、膵内転移と考えられた。また膵尾部(h, i)では RNF43 発現消失が見られ、転移部で新たな遺伝子異常が蓄積されていた。

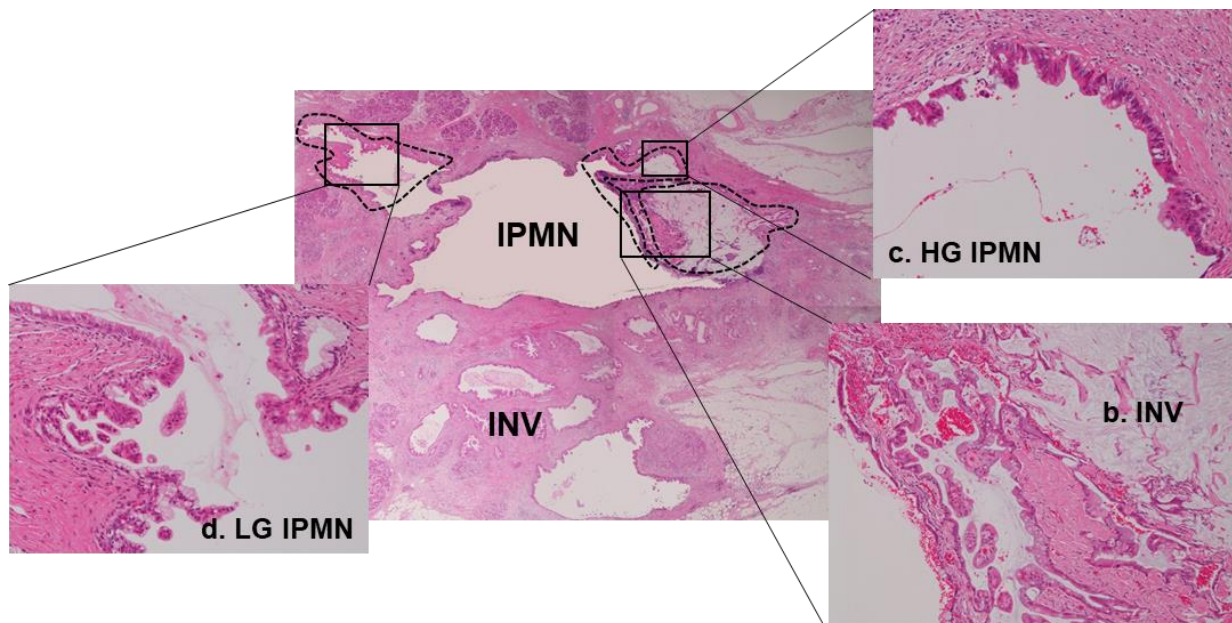
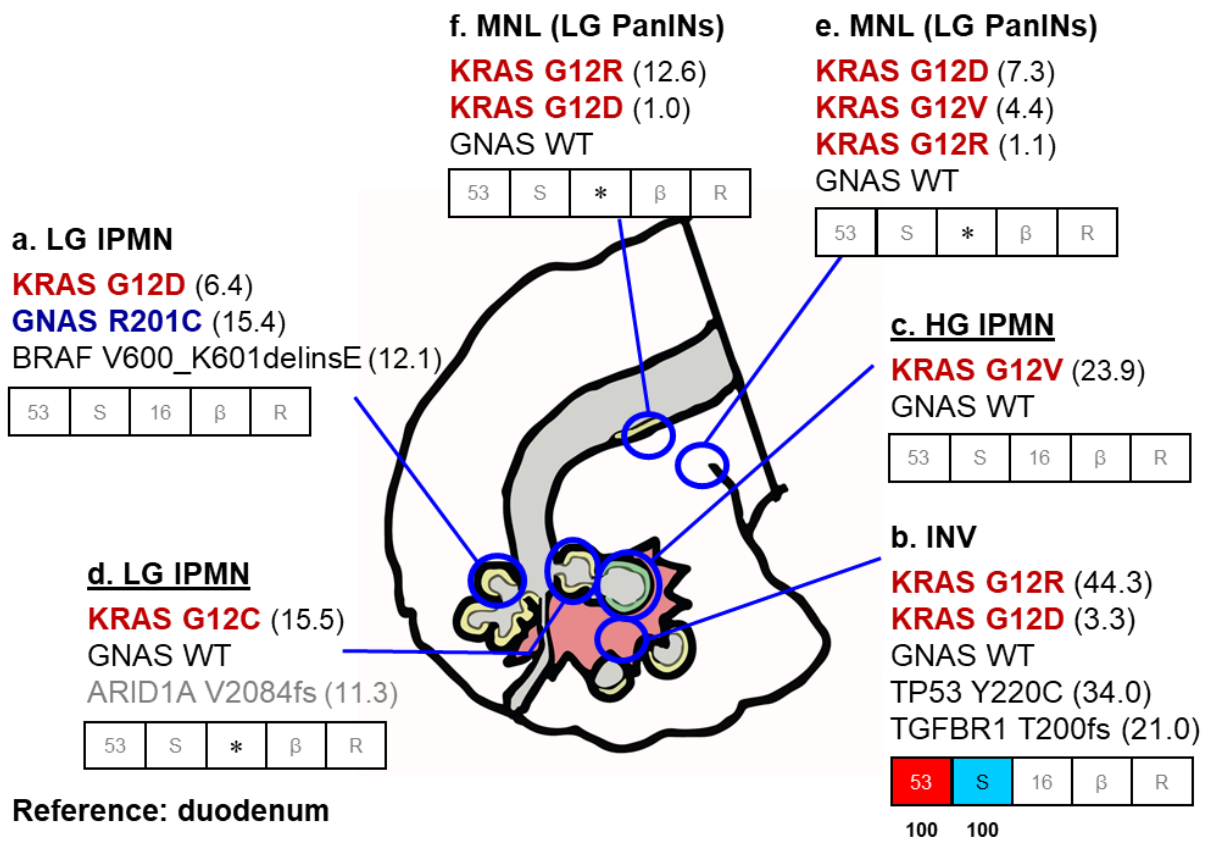


図 38 (前ページ) : **Case 24. Molecular subtype of PDA; *de novo*.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：多発する分枝型、胃型 IPMN に隣接して発生した管状腺癌の例。術前化学療法により腫瘍は縮小しており、組織像にも修飾が加わっている可能性が高い。浸潤癌巣よりも主膵管側に、嚢胞状に拡張した分枝膵管の内腔を平坦状、低乳頭状増殖する HG IPMN を認め、その周囲を取り囲むように管状腺癌の浸潤を認めた。浸潤癌内には CIS (HG PanIN) か intraductal cancer spread か判別のつかない膵管内腫瘍性病変が散見された。背景膵には LG IPMN や拡張に乏しい MNL が多発していた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(b)と HG IPMN(c)、膵管内で連続する LG IPMN(d)、近傍の LG IPMN(a)は、いずれも異なる *KRAS* 変異を有し、各異なるクローンに由来すると考えられた。浸潤癌(b)では *TP53* 変異および蛋白過剰発現と *TGFBR1* 変異および *SMAD4* 発現減弱が見られ、*TP53* と TGFβ 経路異常が癌化に関与したと考えられた。隣接する併存癌であっても、異なるクローンに由来する多中心性発生による例も存在する。30 症例を通じ HG IPMN および浸潤癌の多くでは、単一の *KRAS* バリエントが同定されたが、本症例のみ浸潤癌に複数の *KRAS* バリエントが同定された。本症例の特徴である、背景の多彩なクローンから成る多数の PanIN や LG IPMN の存在を鑑み、浸潤癌 *KRAS* *G12R* の範囲内に、clone^{*KRAS* *G12D*} に由来する PanIN が混在したと推察する。

c. INV

KRAS G12D (55.1)
GNAS WT
RNF43 R330* (53.7)
TGFB1 P436L § (55.1)

53	S	16	β	R
5	5	80		

b. LG IPMN

KRAS G12D (44.9)
GNAS R201C (33.1)

53	S	16	β	R
----	---	----	---	---

a. MNLs (LG PanINs)

KRAS G12R (7.8)
GNAS WT
SMAD4 Y353C (12.8)

53	S	*	β	R
----	---	---	---	---

d. MNLs (LG PanINs)

KRAS Q61H (4.6)
GNAS WT

53	S	*	β	R
----	---	---	---	---

Reference: duodenum

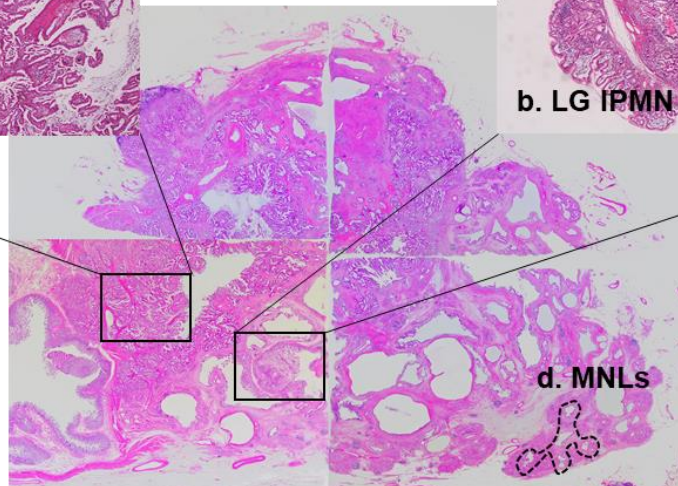
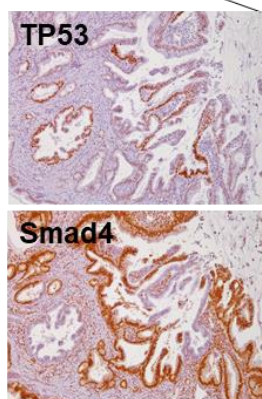
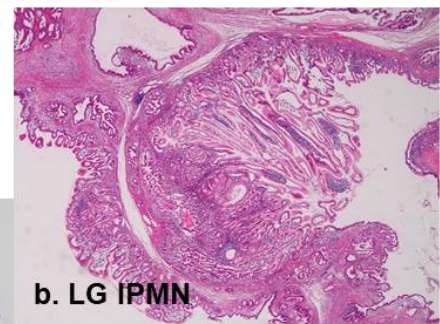
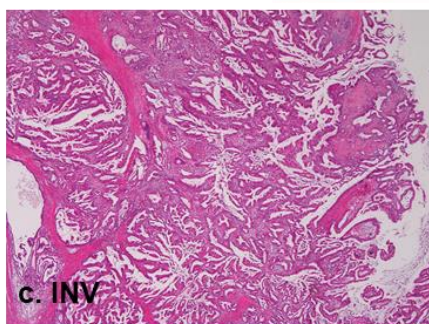


図 39（前ページ）： **Case 25. Molecular subtype of PDA; Branch-off.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN に隣接して発生した管状腺癌の例。IPMN は膵背側に、浸潤癌は膵腹側を主座として発育していた。IPMN は低異型度～高異型度で、浸潤癌に隣接（衝突）していたが、組織学的移行像は明らかでなかった。浸潤癌腺管は乳頭管状構造が目立った。

遺伝学的特徴：浸潤癌(c)と隣接する LG IPMN(b)は、同一の *KRAS* 変異を有したが、IPMN(b)が *GNAS* 変異を有するのに対し、浸潤癌(c)は *GNAS WT* で、p53 過剰発現や *TGFBR1* 変異および *SMAD4* 発現消失（TGFβ 経路異常）、β-catenin 核内発現と *RNF43* 変異（WNT 経路の異常）が蓄積していた。IPMN から浸潤癌への遺伝学的連続性は証明されない。初期クローンを共有し、進化の過程で *GNAS* の獲得により IPMN へ、p53 異常、TGFβ 経路異常、WNT 経路異常の蓄積により浸潤癌へ、「枝分かれ」して発育したと推察された。Case 12 や case 13、case 18 のような IPMN と浸潤癌の間を介在する大型膵管（主膵管や Santorini 管）がなく、分枝膵管同士での発育であった場合には形態学的な連続性は認識されづらいが、同様の機序による癌化である可能性が示唆された。また、背景膵(a, d)には多彩なクローンの発生が示された。

b. CIS

KRAS G12V (70.5)
GNAS WT
TP53 Y234N (70.6)
SMAD4 D351Y (71.9)

53	S	16	β	R
----	---	----	---	---

100

c. INV

KRAS G12V (22.0)
GNAS WT
TP53 Y234N (18.0)
SMAD4 D351Y (22.3)

53	S	16	β	R
----	---	----	---	---

100 100

d. LG IPMN

KRAS G12V (7.2)
GNAS R201H (8.2)
TGFB1 R82G (4.1)

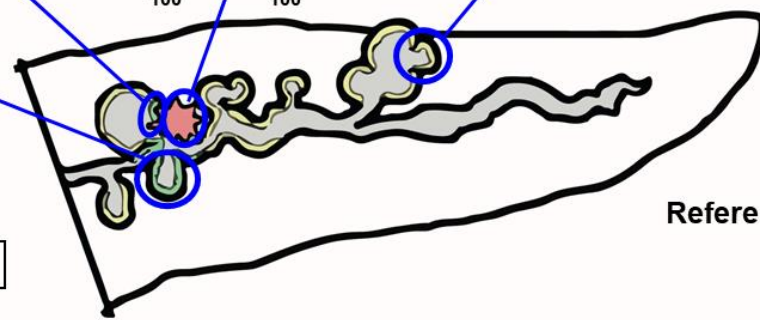
53	S	16	β	R
----	---	----	---	---

a. HG IPMN

KRAS G12V (15.1)
GNAS WT
TP53 Y234N (22.1)
SMAD4 D351Y (23.0)

53	S	16	β	R
----	---	----	---	---

100



Reference: spleen

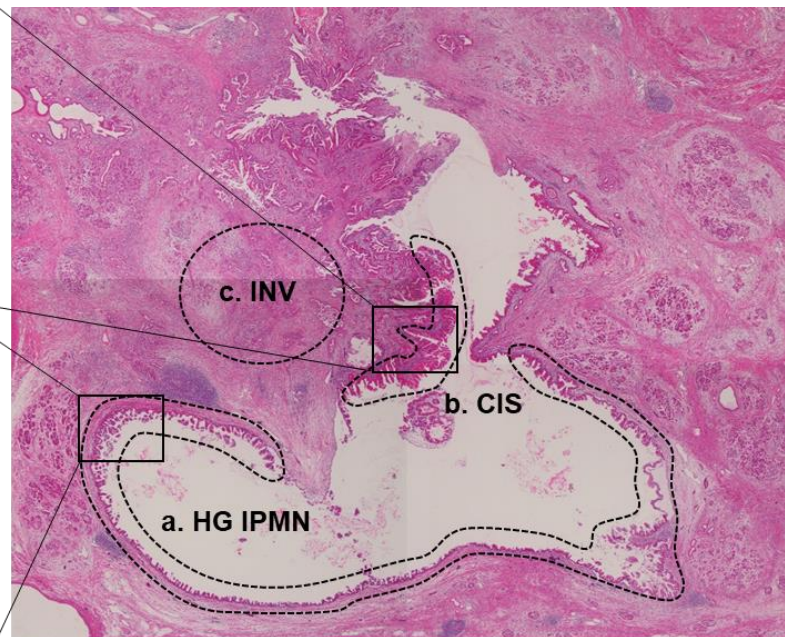
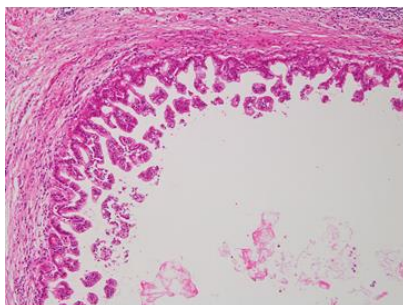
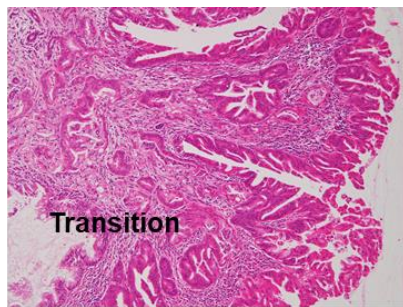


図 40（前ページ）： **Case 26. Molecular subtype of PDA; Sequential.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric.

組織学的特徴：分枝型、胃型、flat 型 IPMN から管状腺癌の形態で浸潤を来した例。浸潤癌へ移行する部分の“CIS”(b)は周囲の HG IPMN に比して異型度が増していた。周囲には LG IPMN が進展し、膵尾部にも画像的に指摘可能な胃型 IPMN を認めた。

遺伝学的特徴：HG IPMN(a)、CIS(b)および浸潤癌(c)は共通の *KRAS* 変異および *TP53* 変異と蛋白過剰発現、*SMAD4* 変異を有し、同一クローンに由来する遺伝学的連続性が示された。浸潤癌ではさらに p16 発現消失が加わっていた。IPMN の高異型度化の過程で *TP53* 変異と *SMAD4* 変異が関与し、浸潤の過程で p16 異常が蓄積し、更なる悪性度上昇に寄与したと考えられた。HG IPMN(a)から異型度をさらに増した CIS(b)となる過程では、検索範囲では付加的異常は指摘されなかった。膵尾部の IPMN(d)には *GNAS* 変異が同定され、IPMN の多中心性発生が示された。

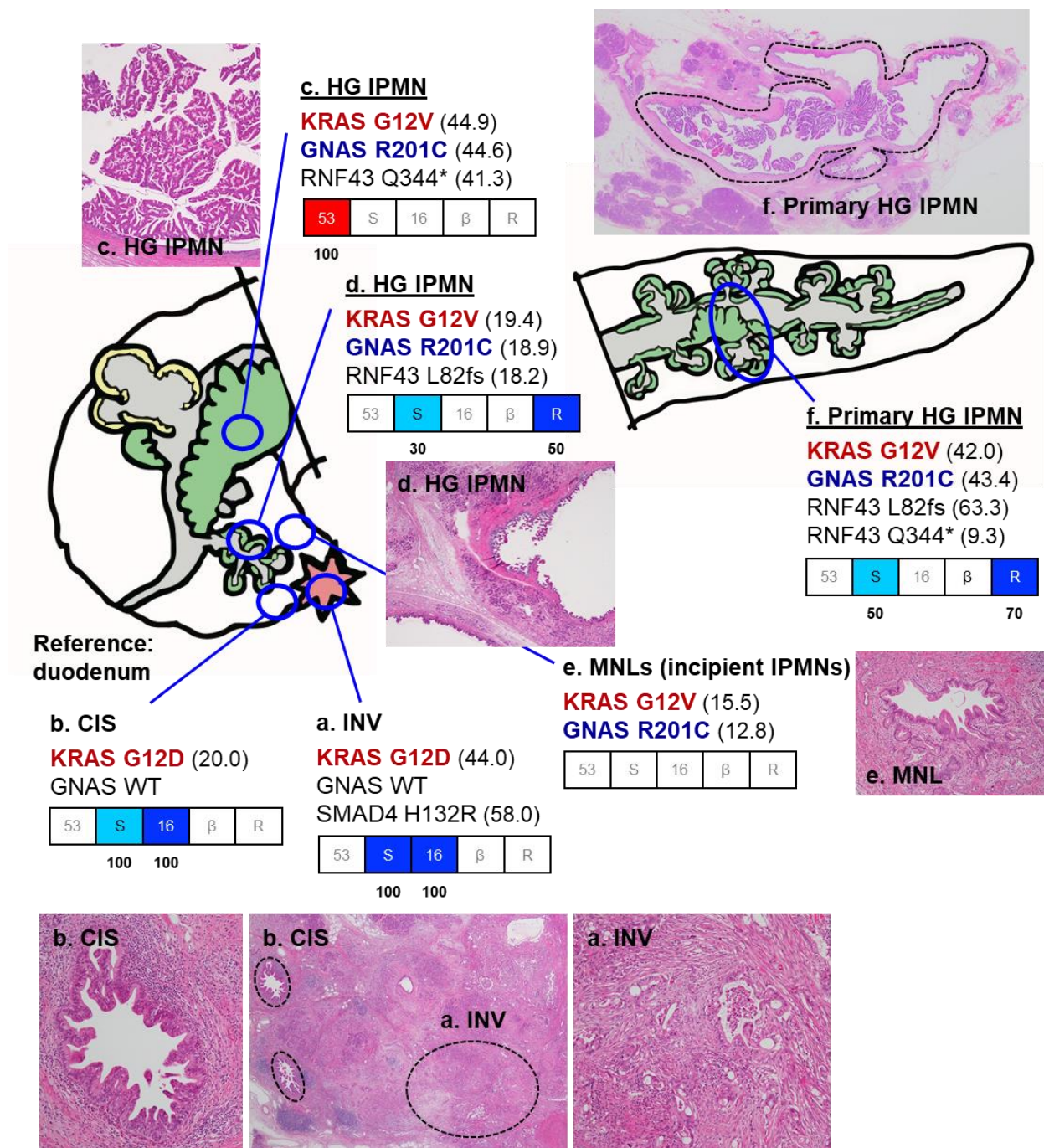


図 41 (前ページ) : **Case 27. Molecular subtype of PDA; *de novo*.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Intestinal.

組織学的特徴：膵体部の腸型 HG IPMN に対する膵体尾部切除術 10 年後に、膵頭部に HG IPMN の再発と膵鉤部に管状腺癌が発生した例。初発時は主膵管から分枝膵管にかけて乳頭状結節形成および低乳頭状に増殖する腸型 IPMN で、初回切除断端は陰性であった。再発時、膵頭部頭側に主膵管から分枝膵管に乳頭状結節を伴う HG IPMN の発生と、その足側に拡張した分枝膵管を低乳頭状に増殖する HG IPMN が認められた。膵鉤部に HG PanIN を伴う管状腺癌の発生を認めたが、IPMN と浸潤癌に組織学的移行像は認められなかった。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a)と IPMN 3 病変(c, d, f)は異なる *KRAS* 変異を有し、各異なるクローンに由来すると考えられた。腸型 IPMN にも併存膵癌が発生する。HG PanIN(b)は *KRAS* 変異に加え *SMAD4* 発現減弱および p16 発現消失を認め、さらに浸潤癌(a)では *SMAD4* 変異および蛋白発現消失が付加されていた。初発時の腸型 IPMN(f)および再発時の腸型 IPMN(c, d)はいずれも同一の *KRAS* 変異と *GNAS* 変異を有した。さらに初発 IPMN に同定された 2 種類の *RNF43* 変異バリエーションのうち、*RNF43 L82fs* は再発 IPMN(d)へ、*RNF43 Q344** は再発 IPMN(c)へそれぞれ引き継がれていた。また MNL として採取した拡張に乏しい軽度異型膵管内上皮病変にも主たる IPMN と同一の *KRAS*、*GNAS* 変異が同定され、両遺伝子変異のアレル変異頻度は近似していた。10 年を経て、地理的にも離れているが、3 つ、もしくは、2 つの遺伝子変異バリエーションが共通しており、これらの IPMN は全て同一クローンに由来する可能性が高い。IPMN は初期 clone^{*KRAS+GNAS*} および、さらに進化した subclone^{*KRAS+GNAS+RNF43*} の段階で、既に膵管内播種を来していることが示された。*KRAS*、*GNAS* 変異に加え、*RNF43* 変異を獲得したクローンは、増殖能が高まり、肉眼的に指摘可能な IPMN へ発育する時間が加速した可能性が示唆された。複数の *RNF43* 変異が同一膵に同定され、*RNF43 82fs* は *RNF43* 蛋白発現消失を生じるが、*RNF43 Q344** は蛋白発現に影響しない遺伝子変異と考えられた。

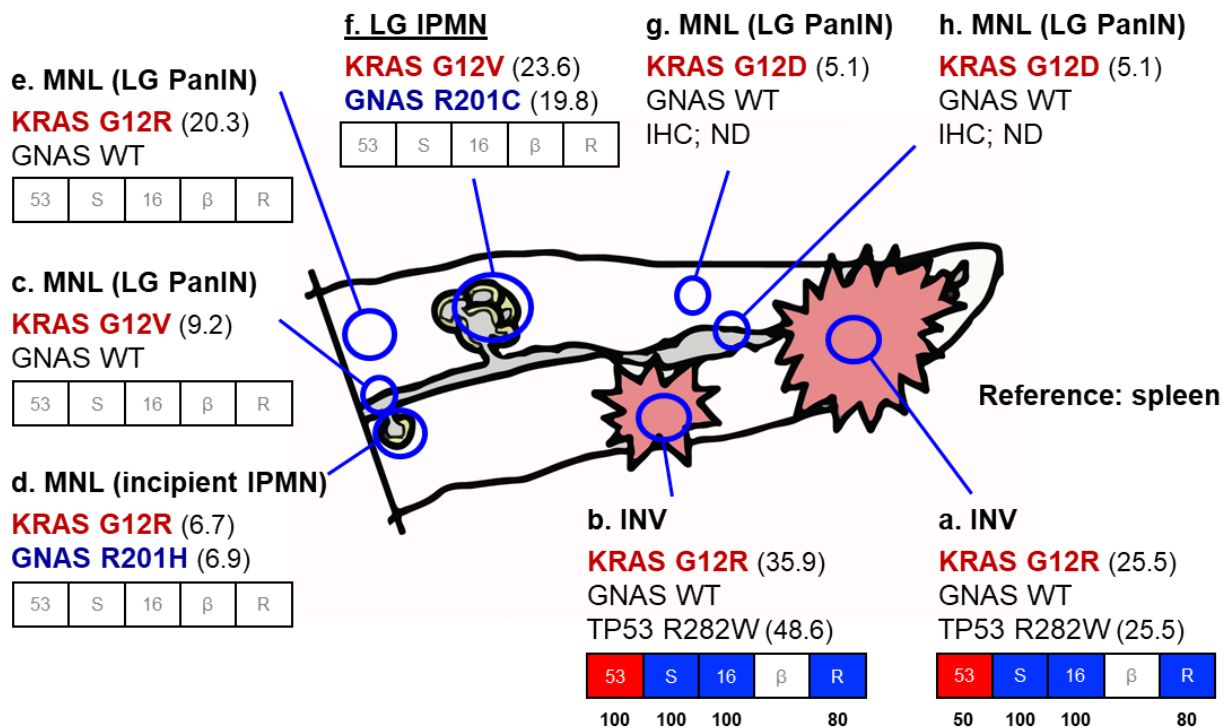


図 42 : **Case 28.** Molecular subtype of PDA; *de novo*.

Epithelial type of co-existing IPMN; **Gastric.**

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN と離れて発生した管状腺癌の例。IPMN は低異型度であった。浸潤癌は膵尾部と膵体部に 2 か所非連続性に認められたが、両浸潤癌の細胞学的形態は類似していた。膵尾部病変よりも膵体部病変の方が小さく、腺癌の分化度は低下していた。背景膵には MNL が多発していた。

遺伝学的特徴：浸潤癌(a, b)と LG IPMN(f)は異なる *KRAS* 変異を有し、各異なるクローンに由来する病変と考えられた。浸潤癌(a, b)は同一の *KRAS* 変異に加え、*TP53* 変異および蛋白過剰発現を認め、*SMAD4* 発現消失、*p16* 発現消失、*RNF43* 発現消失を呈していた。*TP53* アレル変異頻度の上昇および蛋白過剰発現を呈する癌細胞の増加から、膵体部の浸潤癌(b)は膵尾部の浸潤癌(a)からの膵内転移と考えられた。背景膵(c, d, e, g, h)には多様なクローンが見られた。IPMN 患者の膵臓における多様なクローンに由来する多中心性発生の例である。

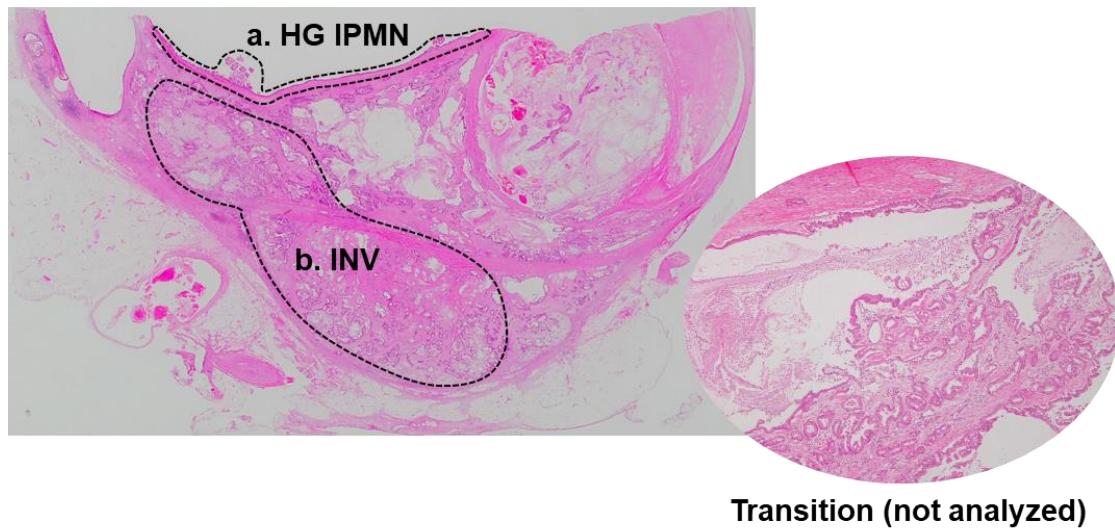
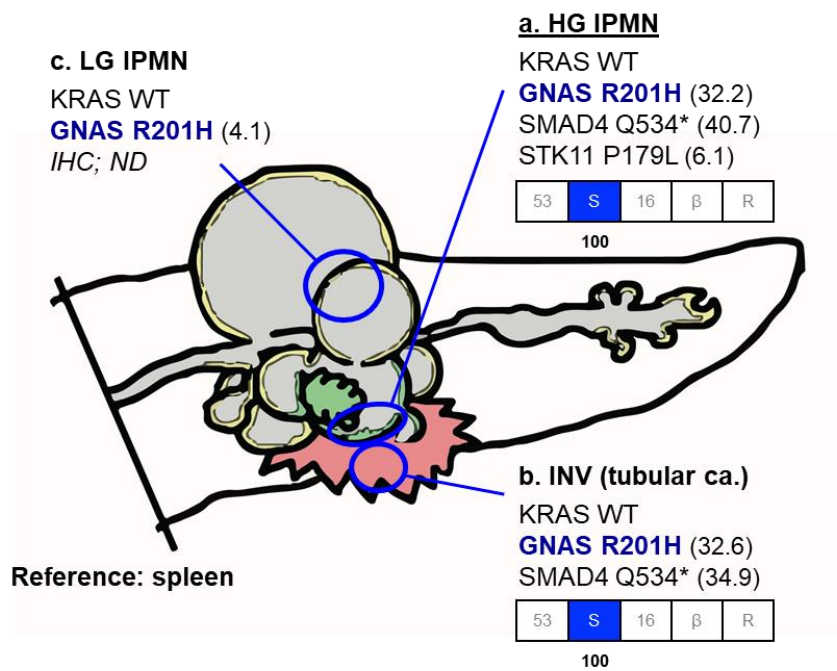
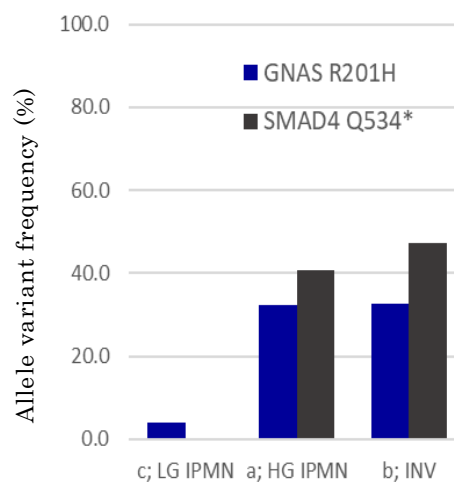


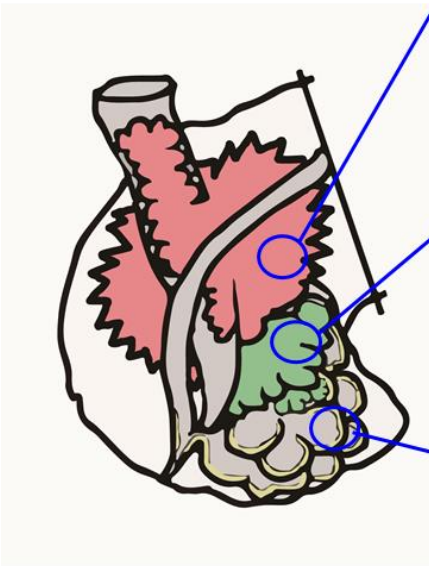
図 43（前ページ）： **Case 29. Molecular subtype of PDA; Sequential.**

Epithelial type of co-existing IPMN; Gastric with oncocytic feature.

組織学的特徴：分枝型、胃型 IPMN から管状腺癌の形態で浸潤を来した例。多房性に発育する LG IPMN から連続して、HG IPMN が進展し、低乳頭状増殖する分枝膵管から浸潤癌へ組織学的移行像が見られた。

遺伝学的特徴：LG IPMN(c)、HG IPMN(a)および浸潤癌(b)は共通の *GNAS* 変異を有し、*KRAS* *WT*であった。HG IPMN で獲得した *SMAD4* 変異および蛋白発現消失は浸潤癌に引き継がれ、同一クローンに由来する遺伝学的連続性が示された。HG IPMN で同定された *STK11* 変異は浸潤癌へは引き継がれなかった。*STK11* の悪性度上昇への寄与は不明であるが、IPMN 内の遺伝学的多様性が示された。各病変の *GNAS* と *SMAD4* アレル変異頻度の推移を右図に示す。LG IPMN(c)から HG IPMN(a)へ進化する段階で *GNAS* アレル変異頻度は上昇し、HG IPMN(a)と浸潤癌(b)においては *GNAS* と *SMAD4* の頻度はいずれも近似していた。





Reference: duodenum

a. INV					
KRAS G12V (45.4)					
GNAS R201C (79.6)					
53	S	16	β	R	
	60	100		10	
b. HG IPMN					
KRAS G12V (58.3)					
GNAS R201C (80.0)					
53	S	16	β	R	
	90	100			
c. LG IPMN (G)					
KRAS G12V (27.0)					
GNAS R201C (26.3)					
RNF43 Q333K (27.0)					
53	S	16	β	R	

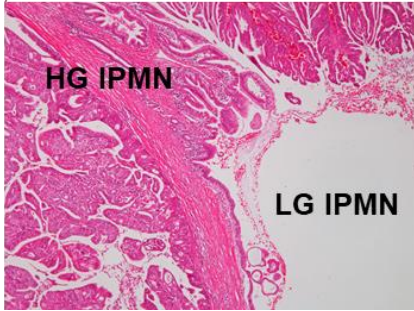
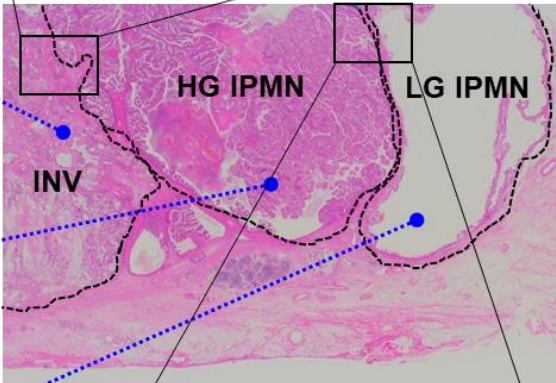
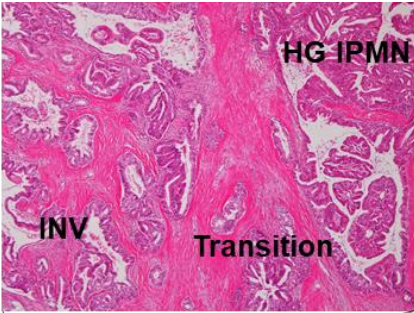
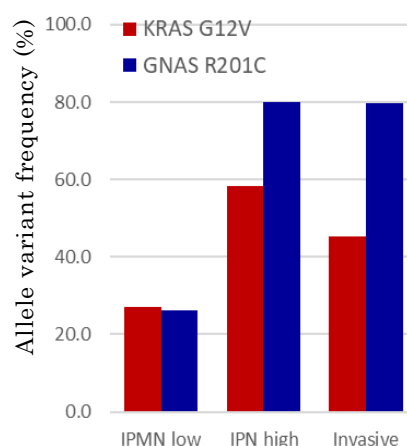


図 44 (前ページ) : **Case 30. Molecular subtype of PDA; Sequential. Epithelial type of co-existing IPMN; Pancreatobiliary with oncocytic feature.**

組織学的特徴：分枝型、胆膵型 IPMN から管状腺癌の形態で浸潤を来した例。LG IPMN に連続して発生した HG IPMN から浸潤癌へ組織学的移行像が認められた。IPMN には胆膵型形質に加えて好酸性細胞垂型の形態学的特徴が一部に認められた。癌腺管は *desmoplasia* の介在に乏しく篩状に浸潤し、膵管癌としては特異な形態を呈する管状腺癌であった。

遺伝学的特徴：LG IPMN(c)、HG IPMN(b)および浸潤癌(a)は共通の *KRAS* 変異と *GNAS* 変異を有し、同一クローンに由来する遺伝学的連続性が示された。LG IPMN(c)に同定された *RNF43* 変異は HG IPMN へ引き継がれなかった。HG IPMN(b)で獲得した p16 発現消失は浸潤癌(a)へ引き継がれ、さらに SMAD4 発現消失と RNF43 発現消失が蓄積されていた。各病変における *KRAS* と *GNAS* アレル変異頻度の推移を右図に示す。LG IPMN(c)から HG IPMN(b)へ進化する段階で *KRAS* と *GNAS* の変異頻度は上昇し、さらに *KRAS* と *GNAS* の変異頻度の比が 1:1 から 1:1.4 に上昇していた。*KRAS* と *GNAS* をヘテロ変異体として有した腫瘍細胞の中から、*GNAS* をホモ変異体で獲得したサブクローンが HG IPMN に進化した可能性がある。HG IPMN(b)と浸潤癌(a)では *KRAS* と *GNAS* の頻度や比率は近似していた。



3) カスタムパネルを用いた標的アンプリコンシーケンスにより同定された遺伝子変異と免疫組織化学染色による蛋白発現異常の相関性

NGS により同定された遺伝子変異と免疫組織化学染色による蛋白発現異常の比較を示す（表 7、表 8、表 9）。

表 7：浸潤癌における遺伝子変異と蛋白発現異常の比較

Case	TP53		SMAD4		CDKN2A/p16		CTNNB1		RNF43	
	NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC
1	<i>TP53 Y163C</i> <i>TP53 D281E</i>	 		 				 		 
2	<i>TP53 Y220S</i>	 		 				 		 
3	<i>TP53 R335C</i>	 	<i>SMAD4 R496H</i>	 						 
4			<i>SMAD4 G365V</i>	 						 
4									<i>RNF43 A365T</i>	 
5										 
6								 		 
6			<i>SMAD4 R361H</i>	 						 
7					<i>CDKN2A G111fs</i>	 				 
9	<i>TP53 K132N</i>	 						 		 
10										 
11	<i>TP53 splice site_5</i>	 	<i>SMAD4 A532fs†</i>	 						 
12			<i>SMAD4 S232fs†</i>	 						 
13	<i>TP53 I254N</i>	 								 
14	<i>TP53 R248W</i>	 		 						 
15			<i>TGFBR1 V115L</i> *	 						 
16	<i>TP53 Y205C</i>	 						 		 
17			<i>TGFBR2 R537C</i> *	 						 
18					<i>CDKN2A P114L</i>	 	<i>CTNNB1 S45del</i>	 		 
19	<i>TP53 R156fs†</i>	 			<i>CDKN2A splice site_5</i>	 				 
20										 
21										 
21										 
22	<i>TP53 R273C</i>	 		 						 
23	<i>TP53 R248Q</i>	 	<i>SMAD4 Q366*</i>	 						 
23	<i>TP53 R248Q</i>	 	<i>SMAD4 Q366*</i>	 						 
24	<i>TP53 Y220C</i>	 	<i>TGFBR1 T200fs</i> *	 						 
25			<i>TGFBR1 P436L†§</i> *	 					<i>RNF43 R330*</i>	 
26	<i>TP53 S234N</i>	 	<i>SMAD4 D351Y</i>	 						 
27			<i>SMAD4 H132R</i>	 						 
28	<i>TP53 R282W</i>	 								 
29			<i>SMAD4 Q534*</i>	 						 
30										 

NGS

 Missense
 Nonsense
 Frameshift (ins/del)
 Splicing
 Indeterminate

IHC

 Strong nuclear TP53 staining, strong nuclear and cytoplasmic p16 staining, and nuclear accumulation of β-catenin
 Loss of TP53, loss of smad4, loss of p16, and loss of RNF43
 Weak SMAD4 staining (suggestive of SMAD4 haploinsufficiency)
 Normal expression
 Indeterminate

NGS, mutation detected by targeted amplicon sequencing; IHC, protein expression examined by immunohistochemistry; fs, frameshift; del, deletion, †, variant unknown significance; §, variant predicted the functional significance by PROVEAN and/or SIFT; *, TGFβ pathway gene (TGFBR1 and TGFBR2) mutation.

表 8：IPMN における遺伝子変異と蛋白発現異常の比較 注釈は表 7 を参照。

Case	Grade	TP53		SMAD4		CDKN2A/p16		CTNNB1		RNF43	
		NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC
1	HG							<i>CTNNB1 G34V</i>		<i>RNF43 R371*</i>	
1	HG									<i>RNF43 E380*</i>	
2	HG	<i>TP53 Y220S</i>									
3	HG										
4	HG			<i>SMAD4 R361C</i>							
4	HG			<i>TGFBR2 S409fs**</i>							
5	HG									<i>RNF43 R454C</i>	
5	HG										
6	HG										
6	HG										
7	HG			<i>SMAD4 R361H</i>							
8	LG										
8	LG	<i>TP53 R342*</i>								<i>RNF43 R132*</i>	
9	HG									<i>RNF43 P154L</i>	
10	LG	<i>TP53 V173M</i>		<i>SMAD4 D493N</i>						<i>RNF43 P310R</i>	
11	LG										
12	LG										
12	LG										
13	LG					<i>CDKN2A splice site_5</i>					
13	LG									<i>RNF43 A767fs</i>	
13	LG									<i>RNF43 A767fs</i>	
14	LG										
14	LG										
15	LG										
16	LG										
17	LG										
18	LG										
18	LG										
19	LG										
20	HG									<i>RNF43 R371*</i>	
20	LG									<i>RNF43 L311fs</i>	
21	HG									<i>RNF43 H292L</i>	
21	HG										
21	HG										
22	LG										
23	HG	<i>TP53 R248Q[®]</i>		<i>SMAD4 Q366*[®]</i>				<i>CTNNB1 G34V</i>			
23	LG										
24	HG										
24	LG										
24	LG										
25	LG										
26	HG	<i>TP53 S234N</i>		<i>SMAD4 D351Y</i>							
26	LG			<i>TGFBR1 R82G[®]</i>							
27	HG									<i>RNF43 L82fs</i>	
27	HG									<i>RNF43 Q344*</i>	
27	HG									<i>RNF43 Q344*</i>	
28	LG									<i>RNF43 L82fs</i>	
29	HG			<i>SMAD4 Q534*</i>							
29	LG										
30	HG										
30	LG									<i>RNF43 Q333K</i>	
A1	HG									<i>RNF43 A46fs</i>	
A2	HG									<i>RNF43 Q44*</i>	
A3	HG									<i>RNF43 H295R†§</i>	
A4	HG									<i>RNF43 G207fs†</i>	
A5	HG										
A6	HG										
A7	HG										
A8	HG									<i>RNF43 D300Y</i>	
A9	HG							<i>CTNNB1 S45del†</i>			
A9	HG							<i>CTNNB1 S33P</i>			
A10	HG							<i>CTNNB1 S37L</i>			

表 9：MNL における遺伝子変異と蛋白発現異常の比較 注釈は表 7 を参照。

Case	TP53		SMAD4		CDKN2A/p16		CTNNB1		RNF43	
	NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC	NGS	IHC
4										
4										
5										
7										
7										
9										
9										
10										
10										
10										
11										
11										
11										
11										
12										
13										
13										
14										
14										
15										
15										
16										
16										
17										
17										
18										
19										
20										
20										
21										
21										
22										
22										
22										
24										
24										
25										
25										
27										
28										
28										
28										
28										
28										

TP53、*SMAD4*、*CTNNB1*、*RNF43* では NGS により同定された遺伝子変異と蛋白発現異常は有意に相関しており、カスタムパネル設計の妥当性が示された（表 10）。*CDKN2A/p16* および *SMAD4* は蛋白発現異常のみを呈する腫瘍が多く、これはホモ接合体欠失、ヘテロ接合性の喪失、遺伝子プロモータのメチル化などのエピジェネティックな異常を反映していると考えられる。

表 10：カスタムパネルを用いた標的アンプリコンシーケンスにより同定された遺伝子変異と蛋白発現異常の相関（Fisher の正確率検定）

	NGS	IHC											
		PDA			IPMN			PDA & IPMN			All tumor		
		Abe	Nor	p value	Abe	Nor	p value	Abe	Nor	p value	Abe	Nor	p value
<i>TP53</i>	Mutant	13	1	0.000248	3	2	0.00627	16	3	9.47E-10	18	5	1.76E-11
	WT	5	14		3	38		8	52		8	93	
<i>SMAD4</i>	Mutant	7	1	0.386	4	2	0.0621	11	3	0.00415	12	4	0.000473
	WT	16	8		8	31		24	39		29	74	
<i>CDKN2A/p16</i>	Mutant	3	0	0.555	0	1	1	3	1	0.31	3	1	0.306
	WT	21	8		8	33		29	41		36	53	
<i>CTNNB1</i>	Mutant	1	1	0.335	2	0	0.0000886	3	1	0.0000293	5	0	8.89E-06
	WT	5	26		4	40		9	66		9	110	
<i>RNF43</i>	Mutant	0	1	1	7	3	0.00162	7	4	0.00099	8	11	0.00214
	WT	2	29		4	31		6	60		11	92	

NGS, mutation detected by targeted amplicon sequencing; IHC, protein expression examined by immunohistochemistry; Abe, aberrant expression; Nor, normal expression; WT, wild type

TP53 と *RNF43* の遺伝子変異箇所と蛋白発現パターンの関連を示す（*TP53* : 図 45、*RNF43* : 図 46）。

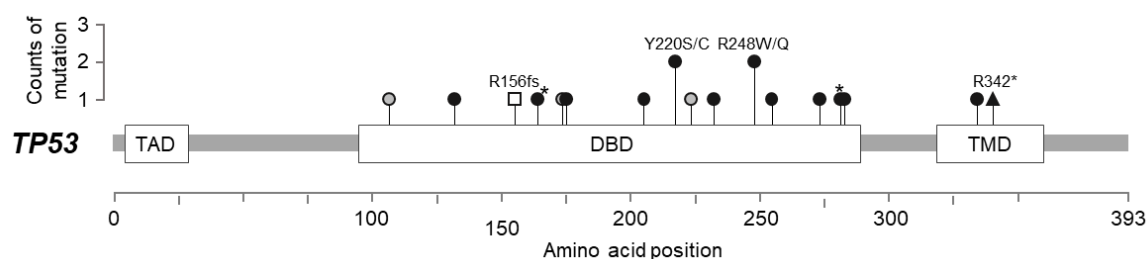


図 45：*TP53* の遺伝子変異箇所と蛋白発現パターン

蛋白ドメインの分布と同定された遺伝子変異箇所、個数を示す *TP53* 遺伝子のスキーム。図形により変異型を示し、色により蛋白発現パターンを示す。Circle, missense; triangle, nonsense; square, frameshift (ins/del). Black, nuclear over expression; gray, wild type pattern, white, loss of expression (complete absence). TAD, transactivation domain; DBD, DNA binding domain; TMD, tetramerization domain.

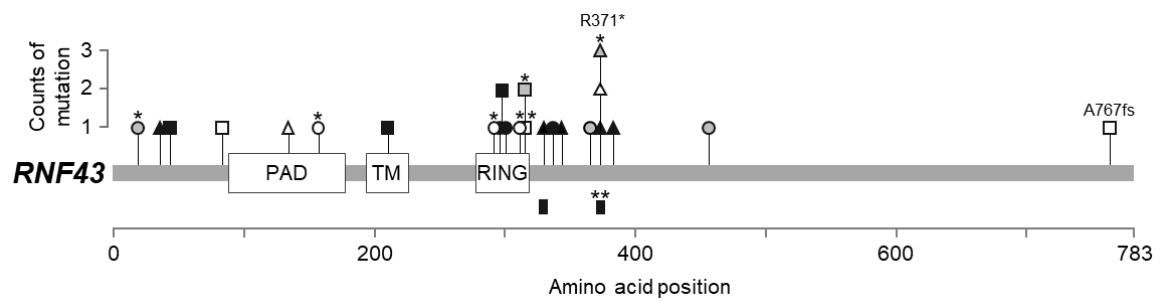


図 46 : *RNF43* の遺伝子変異箇所と蛋白発現パターン

蛋白ドメインの分布と同定された遺伝子変異箇所、個数を示す *RNF43* 遺伝子のスキーム。図形により変異型を示し、色により蛋白発現パターンを示す。下段の ■ は β -catenin の核内集積ありを示す。Circle, missense; triangle, nonsense; square, frameshift (ins/del). Black, retained; white, loss; gray, not determined. PAD, protease-associated domain; TM, transmembrane; RING, ring finger domain. *, Samples with multiple mutations, ** *CTNNB1 G34V* mutant.

4) IPMN 由来癌と併存癌の遺伝子変異および蛋白発現異常の比較検討

由来癌 (IPMN-derived PDA) と併存癌 (Concomitant PDA) における遺伝子変異および蛋白発現異常の比較を示す (表 11)。由来癌の *KRAS* 変異 (66.7%) は、併存癌 (95.2%) に比し少なかった ($p<0.05$)。 *GNAS* 変異は由来癌 (66.7%) にのみ認められ、併存癌には認められなかった ($p<0.05$)。 Co-existing IPMN における *GNAS* 変異の頻度に有意差は認められなかった。 *TP53*、 *SMAD4*、 *CDKN2A/p16*、 *CTNNB1/β-catenin*、 *RNF43* 変異率および蛋白発現の異常率では両者に有意差は認められなかった。他の 11 遺伝子変異率にも由来癌と併存癌に有意差は認められなかった。

表 11 : IPMN 関連癌の遺伝子変異および蛋白発現異常の比較

	all IPMN-related PDA	Morphological classification		p-value
		IPMN-derived PDA	Concomitant PDA	
<i>KRAS</i>	84.8 (28/33)	66.7 (8/12)	95.2 (20/21)	<0.05
<i>TP53</i>	42.4 (14/33)	33.3 (4/12)	47.6 (10/21)	0.486
<i>SMAD4</i>	24.2 (8/33)	33.3 (4/12)	19.0 (4/21)	0.420
<i>CDKN2A/p16</i>	9.1 (3/33)	0 (0/12)	14.3 (3/21)	0.284
<i>GNAS</i>	24.2 (8/33)	66.7 (8/12)	0 (0/21)	< 0.001
<i>RNF43</i>	6.1 (2/33)	8.3 (1/12)	4.8 (1/21)	1.000
<i>BRAF</i>	0 (0/33)	0 (0/12)	0 (0/21)	1.000
<i>PIK3CA</i>	3 (1/33)	8.3 (1/12)	0 (0/21)	0.364
<i>STK11</i>	0 (0/33)	0 (0/12)	0 (0/21)	1.000
<i>IDH1</i>	0 (0/33)	0 (0/12)	0 (0/21)	1.000
<i>CTNNB1</i>	3 (1/33)	0 (0/12)	4.8 (1/21)	1.000
<i>MAP2K4</i>	0 (0/33)	0 (0/12)	0 (0/21)	1.000
<i>TGFBR1</i>	9.1 (3/33)	0 (0/12)	14.3 (3/21)	0.536
<i>TGFBR2</i>	3 (1/33)	0 (0/12)	4.8 (1/21)	1.000
<i>ARID1A</i>	0 (0/33)	0 (0/12)	0 (0/21)	1.000
<i>SF3B1</i>	0 (0/33)	0 (0/12)	0 (0/21)	1.000
<i>RBM10</i>	3 (1/33)	0 (0/12)	4.8 (1/21)	1.000
<i>KDM6A</i>	0 (0/33)	0 (0/12)	0 (0/21)	1.000
TP53 IHC	57.6 (18/33)	33.3 (4/12)	71.4 (14/21)	0.083
Smad4 IHC	71.8 (23/32)	54.5 (6/11)	81.0 (17/21)	0.213
CDKN2A/p16 IHC	75 (24/32)	63.6 (7/11)	81.0 (17/21)	0.397
β-catenin IHC	18.2 (6/33)	16.7 (2/12)	19.0 (4/21)	1.000
RNF43 IHC	6.3 (2/32)	9.1 (1/11)	4.8 (1/21)	1.000

5) 高異型度 IPMN と低異型度 IPMN における病理組織学的特徴と遺伝子変異、蛋白発現異常の比較検討

30 症例において、多発する IPMN を含め 49 病変、内、高異型度 IPMN 22 病変、低異型度 27 病変を解析対象とした。高異型度 IPMN は胃型 8 病変、腸型 10 病変、胆膵型 4 病変、低異型度 IPMN は胃型 24 病変、腸型 3 病変、胆膵型 0 病変であり、低異型度 IPMN では胃型の頻度が高かった ($p < 0.001$)。

低異型度 IPMN では 1 切片上の系統的な膵管拡張病変を標的として組織を採取したが、27 例中 9 例 (33%) に複数の *KRAS* 変異バリエントが同定された。高異型度 IPMN においても同様に組織を採取したが、22 例すべて単一の *KRAS* 変異バリエントが同定された。Fisher の正確率検定および単変量解析において、高異型度 IPMN では、低異型度 IPMN に比較して、SMAD4 の発現消失および β -catenin の核内集積の頻度が高かった ($p < 0.05$ 、図 47)。多変量解析では、p53 の核内過剰発現、SMAD4 発現消失の頻度が有意に高かった (表 12)。

低異型度 IPMN では複数の腫瘍性クローンが共存しているが、その一部のクローンに遺伝子異常が蓄積することにより、選択的に高異型度 IPMN へ進化していくことが示唆される。

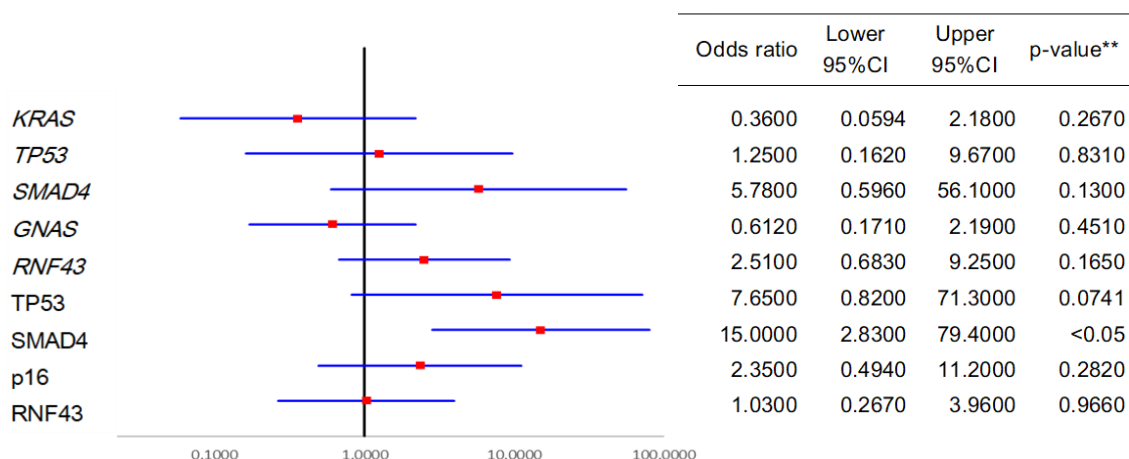


図 47：高異型度 IPMN のリスク因子 (単変量解析)

表 12：高異型度 IPMN のリスク因子 (多変量解析)

Multivariate logistic regression analysis				
	Odds ratio	Lower 95%CI	Upper 95%CI	p-value
TP53 positive	19.3000	1.5400	242.0000	0.0217
SMAD4 loss	25.3000	3.8300	167.0000	0.0008
p16 loss	0.6270	0.0722	5.4500	0.6720

6) MNL、低異型度 IPMN、高異型度 IPMN、浸潤癌における変異 *KRAS* および変異 *GNAS* アレル頻度の推移

変異 *KRAS* アレル頻度は、MNL、低異型度 IPMN、高異型度 IPMN において段階的に有意に増加したが、高異型度 IPMN と浸潤癌（invasive cancer, INV）に有意差は認めなかった（図 48-A）。変異 *GNAS* アレル頻度は低異型度 IPMN と高異型度 IPMN において有意に増加した。MNL と低異型度 IPMN、高異型度 IPMN と浸潤癌では有意差は認めなかった（図 48-B）。

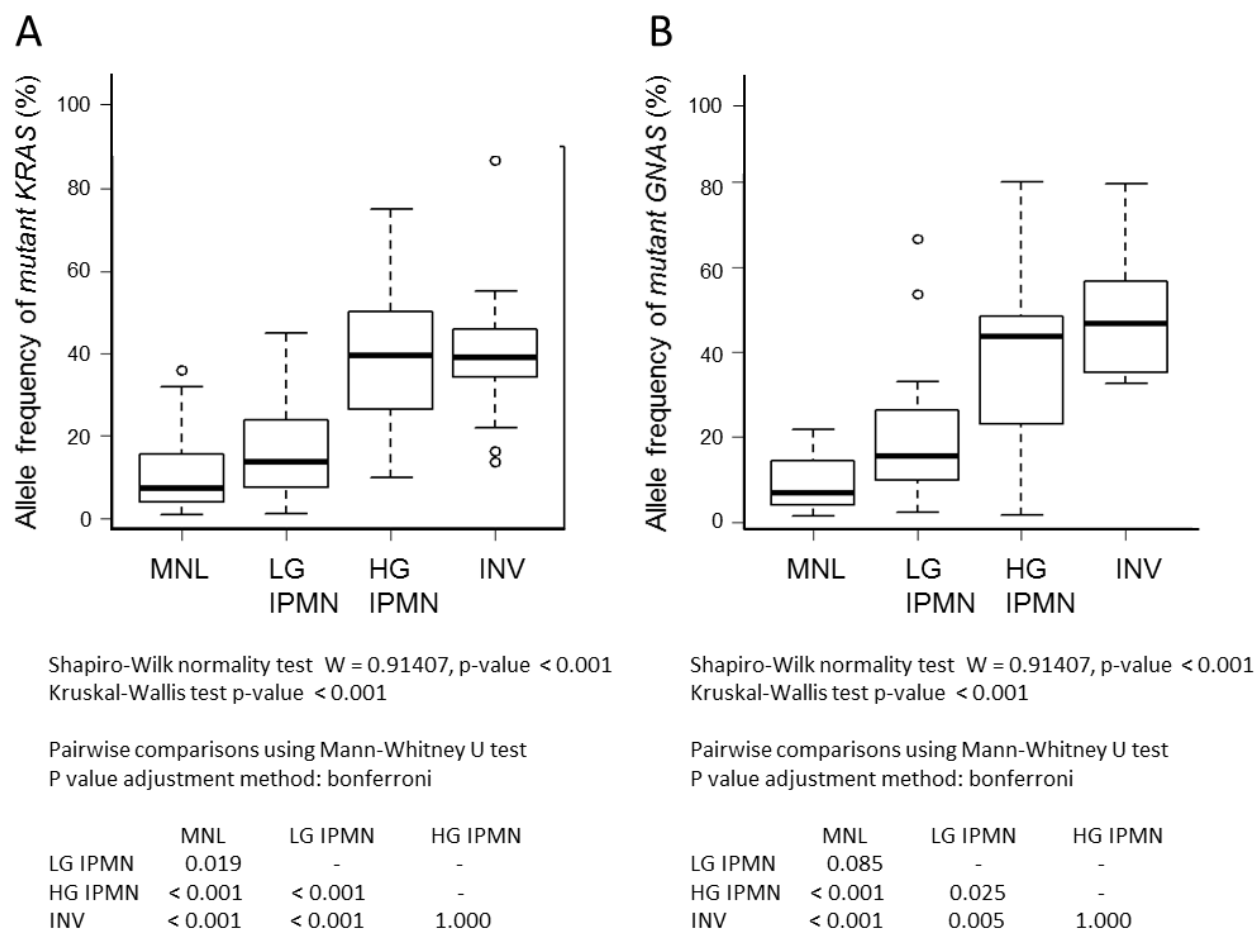


図 48：異型度別の変異 *KRAS* (A) および変異 *GNAS* (B) のアレル頻度の比較

7) 浸潤癌と IPMN 位置関係および分子プロファイルから見た新規分類

IPMN 関連癌 30 症例 33 病変において、浸潤癌 (PDA) と co-existing IPMN の位置関係および分子プロファイルに基づき新規の Molecular subtype 分類を提唱した (図 49、図 50、図 51)。

組織学的移行像を有した由来癌 12 病変は、全例ドライバー遺伝子である *KRAS*、*GNAS* 変異プロファイルが一致し、その連続的な進展過程が示唆された。この群を “Sequential subtype (以下、Sequential)” と命名した。

併存癌 21 例中、co-existing IPMN と浸潤癌間の距離が 5 mm 以下である隣接併存癌 (Adjacent) が 12 例、5 mm 以上離れた併存癌 (Distant) が 9 例であった。隣接併存癌のうち 3 例 (症例 12、症例 13、症例 18) は、IPMN と浸潤癌の間の主膵管を上皮置換性に連続的に進展する低異型度腫瘍性病変が認められた。この 3 例を含め、隣接併存癌 9 例 (75%)、離れた併存癌 2 例 (22%) で *KRAS* 変異プロファイルの一致が見られた。隣接併存癌では 3 例 (25%)、離れた併存癌では 7 例 (78%) で *KRAS* 変異プロファイルが異なっていた (図 49)。併存癌では *GNAS* 変異を有する症例は認められなかった。併存癌の発生した膵臓における全ての IPMN と浸潤癌の *KRAS* 変異プロファイルを比較すると、*KRAS* 一致例は有意に IPMN と浸潤癌の距離が近かった (図 50、 $p=0.0397$ 、図 51)。*KRAS* 変異プロファイルが異なる例は、IPMN と浸潤癌が異なるクローンからの発生と考えられ、“*de novo* subtype (以下、*de novo*)” と命名した。*KRAS* 変異プロファイルが一致した例は IPMN と浸潤癌が近接して発生する傾向が示されたことから、発生初期は同一のクローンに由来し、進化過程で表現型の異なる腫瘍に分かれた可能性が示唆され、“Branch-off subtype (以下、Branch-off)” と命名した。

Co-existing IPMN と浸潤癌における 18 分子のプロファイルの相違性を示す (図 51、図 52)。“Sequential” では、*KRAS* および *GNAS* 変異プロファイルの共通性と共に、SMAD4、TP53、p16 の異常も IPMN と癌で同一であり、さらに浸潤癌のみに蓄積が見られる分子が認められた。*KRAS* 変異プロファイルの違いを定義とした “*de novo*”、および *KRAS* 変異プロファイルの一致を定義とした “Branch-off” では、*GNAS* 変異は IPMN にのみ認められ、浸潤癌では認められなかった。隣接発生した併存癌を多く含む “Branch-off” において、*GNAS* 変異を有する例では、IPMN からの直接的連続性が示されない点で、“Sequential” と異なる。また、その他の遺伝子異常は浸潤癌での蓄積が進んでおり、*KRAS* 一致の点を除くと、“Branch-off” の遺伝学的プロファイルは “*de novo*” に類似していた (図 53)。

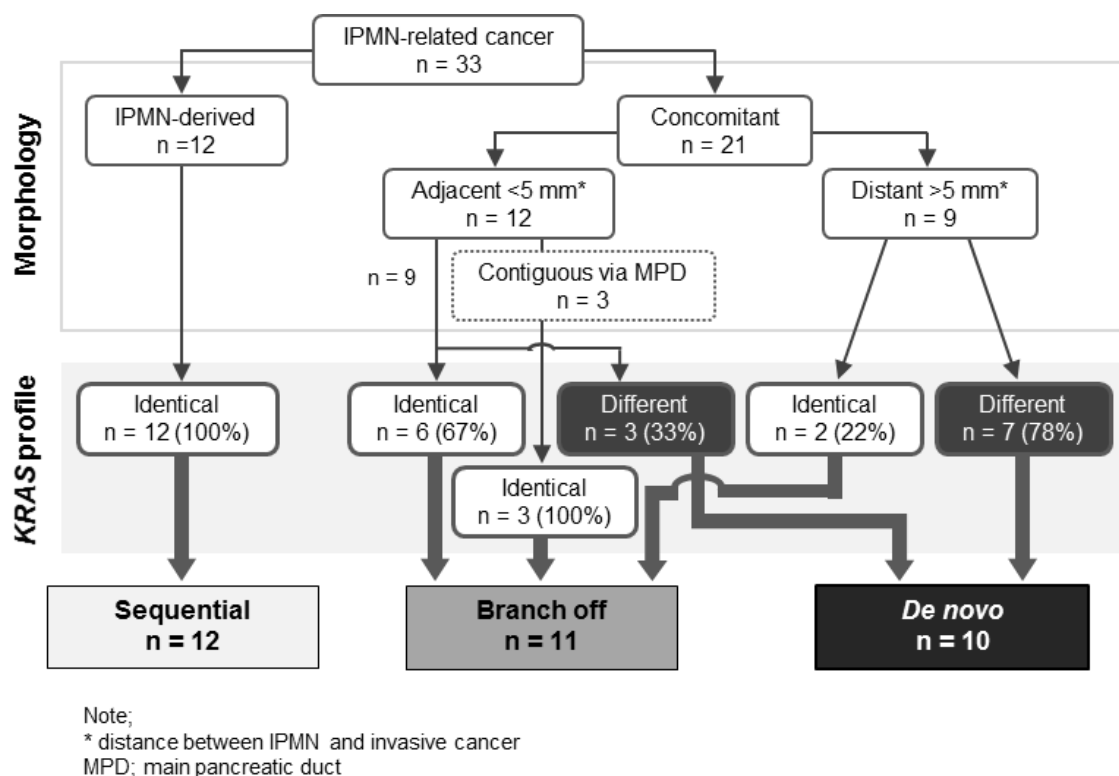


図 49：浸潤癌と IPMN の位置関係および分子プロファイルから見た新規分類
(Molecular subtype 分類)

IPMN と浸潤癌の組織学的移行像の有無、病変間の距離、*KRAS* 変異プロファイルに基づき、IPMN 関連膵癌 33 病変を 3 群に分類した。

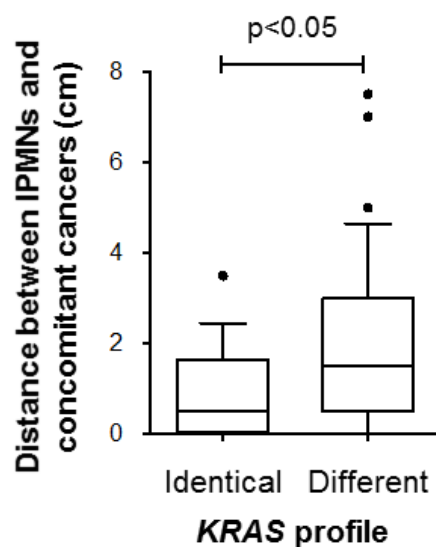


図 50：併存癌における IPMN と浸潤癌の *KRAS* プロファイル相違性と位置関係

Histology of the carcinoma

Invasive carcinoma

Sequential

Branch-off

De novo

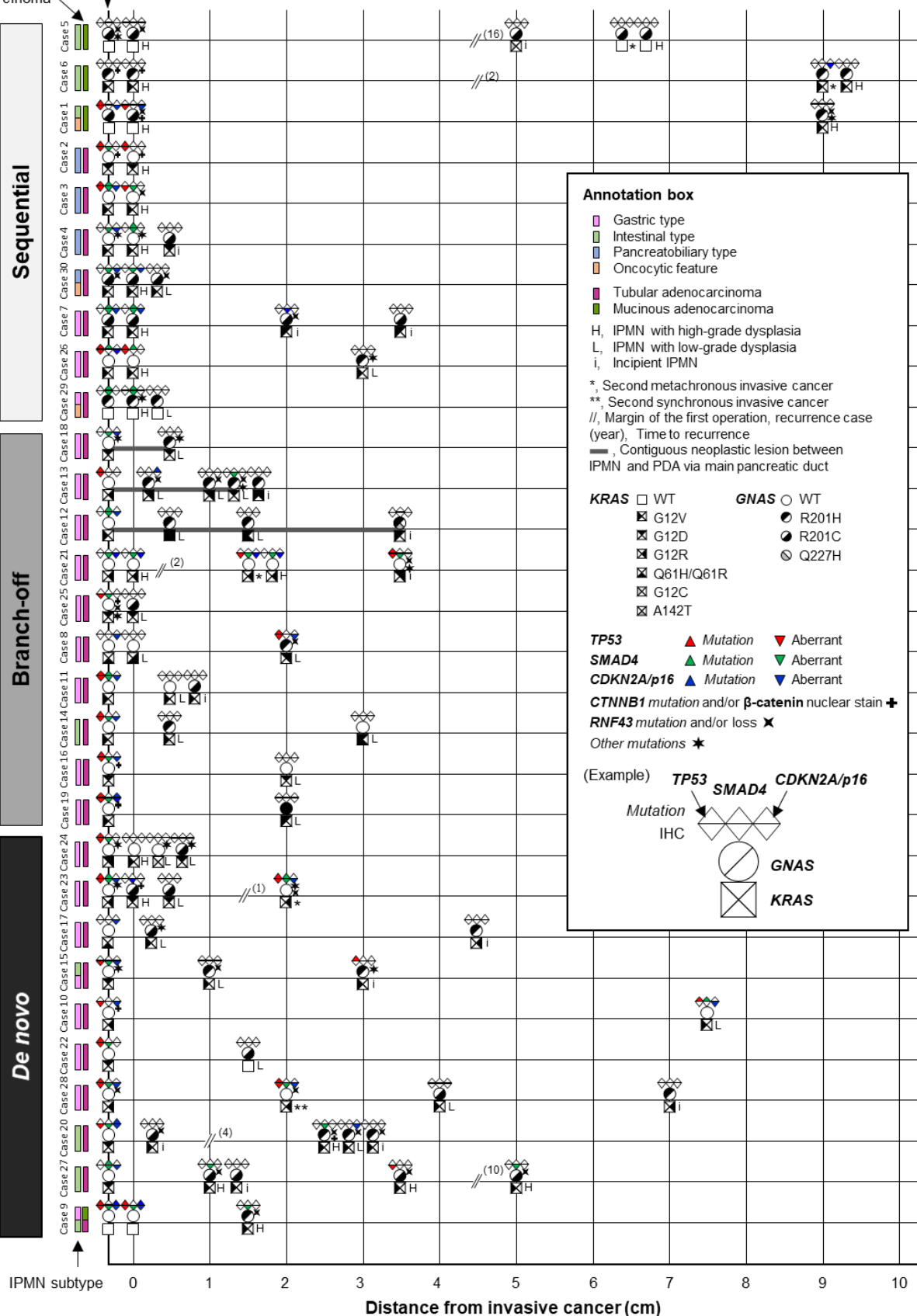


図 51 (前ページ) : Molecular subtype 分類による “Sequential”、“Branch-off”、及び “*de novo*” 膵癌と、併存する IPMN における組織型、病変間距離、分子プロファイルの一覧

注釈の如く分子プロファイルを模式化した。縦軸に 30 症例の膵癌の分子プロファイルを配列した。横軸を浸潤癌と IPMN 間の距離 (cm) とし、IPMN の分子プロファイルを配置した。

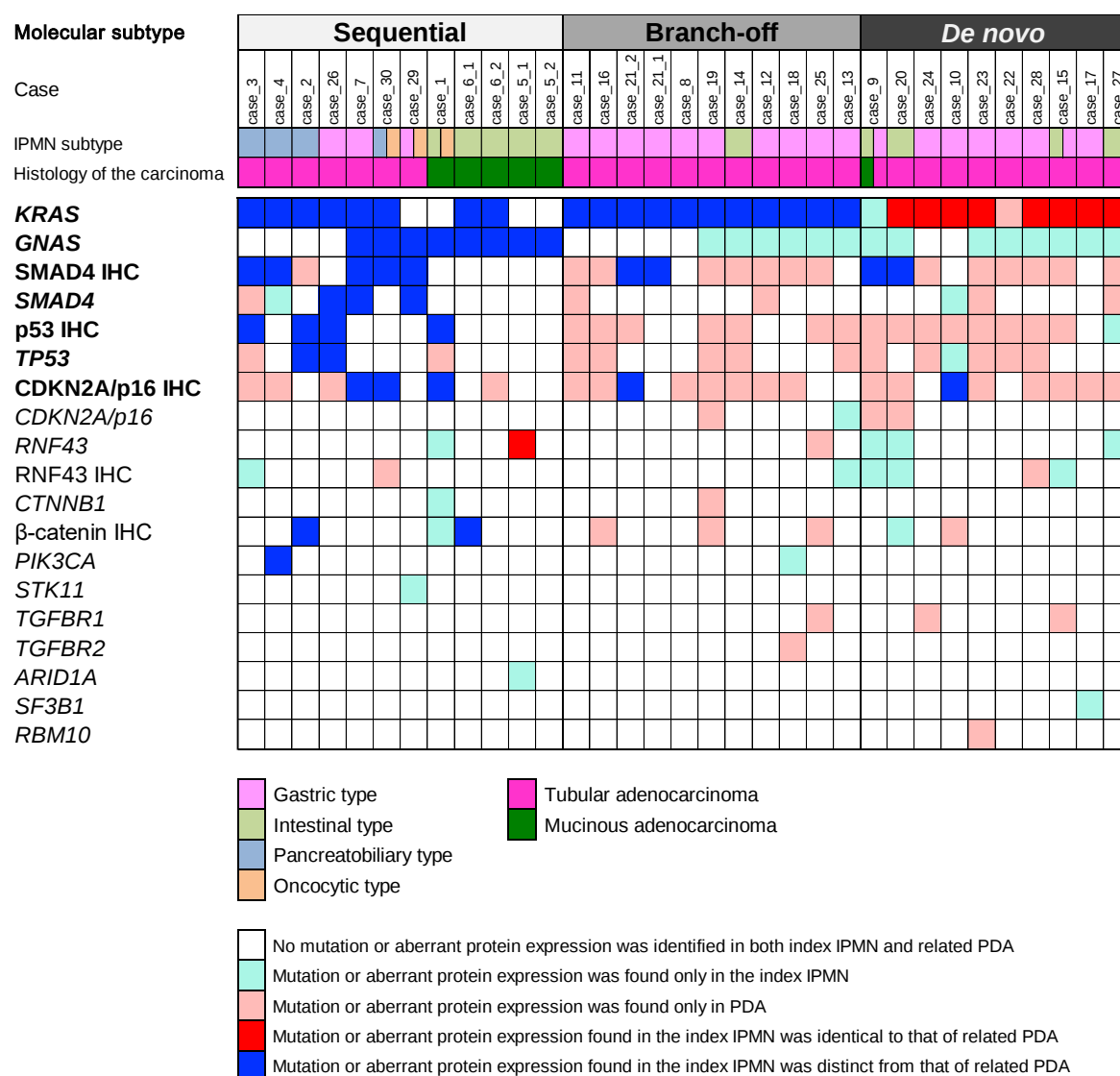


図 52 : Molecular subtype 分類による “Sequential”、“Branch-off”、及び “*de novo*” 膵癌と、その co-existing IPMN における遺伝子変異の相違性の比較

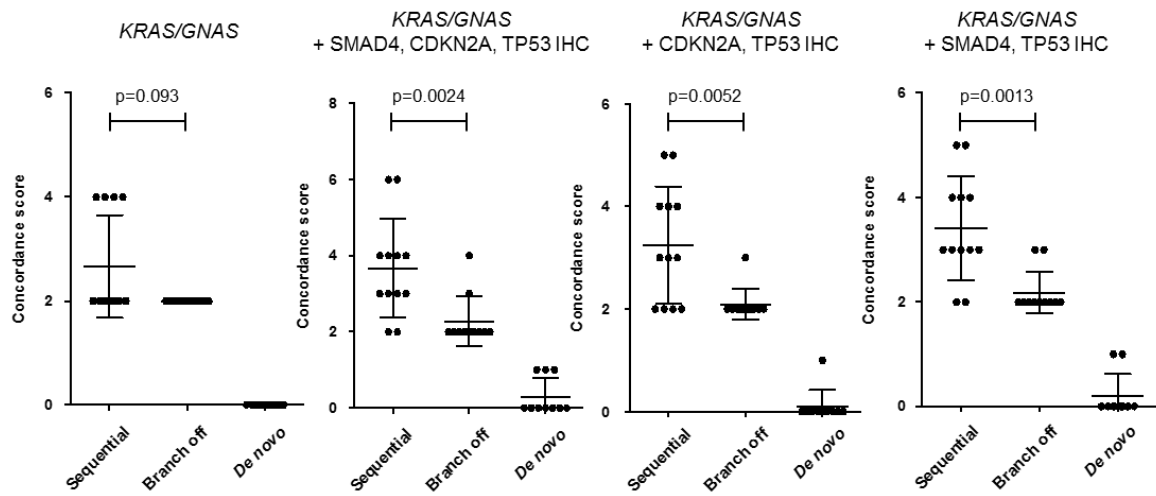


図 53 : Molecular subtype 分類における分子プロファイルの比較

“Sequential”、“Branch-off”、および “*de novo*” 膵癌とその co-existing IPMN における *KRAS/GNAS* 変異と SMAD4、CDKN2A/p16、p53 の蛋白発現異常の一致性を比較検討した。

8) Sequential subtype の遺伝学的特徴

組織学的移行像を有し由来癌と組織学的に診断された 12 例は全例、co-existing IPMN と浸潤癌の *KRAS* と *GNAS* 変異プロファイルが一致し、遺伝学的連続性が証明された (図 54、図 56)。IPMN から浸潤癌への変異の連続性は、*KRAS*、*GNAS* 共に 100%であった (表 13)。

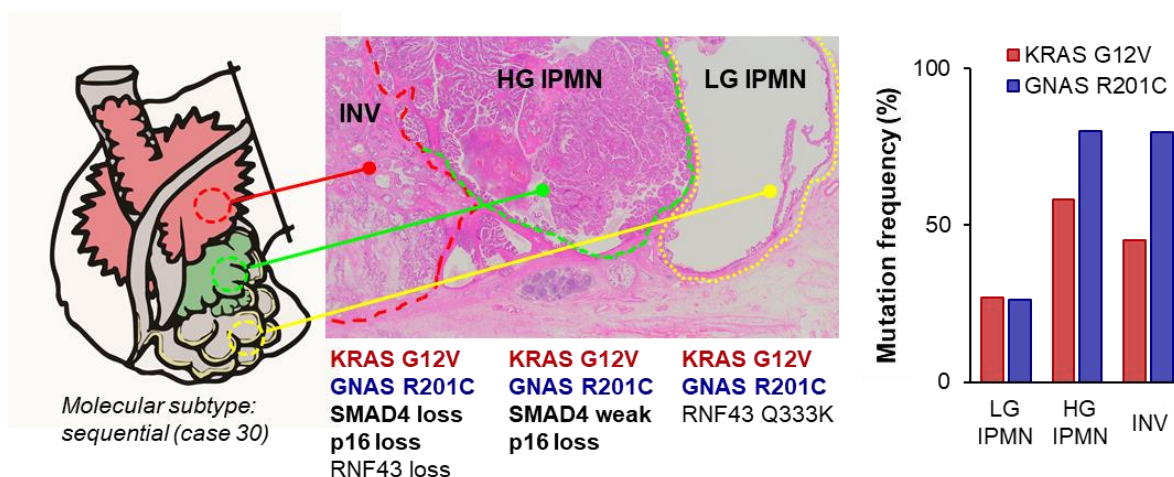


図 54 : Sequential subtype の代表例 (Case 30)

(左) スキーム、(中) 組織像、(右) アレル変異頻度の推移。

IPMN の *TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A/p16* 異常は、その多くが浸潤癌へ引き継がれ、かつ浸潤癌においてより高い異常の集積が見られた (表 13)。*RNF43* は、IPMN に検出された変異および蛋白発現異常が浸潤癌には引き継がれていなかった (0%、表 13)。*CTNNB1/β-catenin* は変異と蛋白発現異常を併せると 50%が、IPMN から浸潤癌へ引き継がれていなかった。*RNF43* と *CTNNB1/β-catenin* は IPMN の発生、高異型度化には関与するが、浸潤の過程には関与しない可能性が示唆された。

Case 1 を用い、IPMN と浸潤癌に同定された変異アレル頻度と蛋白発現異常を示した腫瘍細胞率から、“Sequential”におけるクローンの変遷を模式化した (図 55)。IPMN 内では、GNAS に規定される初期クローンの共通は見られるが、そこから p16、*RNF43*、*CTNNB1/β-catenin*、*TP53* の蓄積パターンが異なるサブクローンの不均一性が見られる。その中から、浸潤癌化につながる p16、*TP53* が蓄積したサブクローンが選択的に浸潤へ至る過程が示された。

Sequential subtype の段階的発育をスキームで示す (図 56)。

表 13 : Sequential subtype における co-existing IPMN と浸潤癌の遺伝子変異および蛋白発現異常の比較と連続性

Mutation	IPMN	INV	Inherited mutation from IPMN
<i>KRAS</i>	66.7 (8/12)	66.7 (8/12)	100 (8/8)
<i>GNAS</i>	66.7 (8/12)	66.7 (8/12)	100 (8/8)
<i>TP53</i>	13.7 (2/12)	33.3 (4/12)	100 (2/2)
<i>SMAD4</i>	33.3 (4/12)	33.3 (4/12)	75.0 (3/4)
<i>CDKN2A/p16</i>	0 (0/12)	0 (0/12)	0 (0/0)
<i>CTNNB1</i>	8.3 (1/12)	0 (0/12)	0 (0/1)
<i>RNF43</i>	33.3 (4/12)	8.3 (1/12)	0 (0/4)
<i>STK11</i>	8.3 (1/12)	0 (0/12)	0 (0/1)
<i>ARID1A</i>	8.3 (1/12)	0 (0/12)	0 (0/1)
<i>PIK3CA</i>	8.3 (1/12)	8.3 (1/12)	100 (1/1)

Aberrant protein expression	IPMN	INV	Inherited abnormality from IPMN
TP53	33.3 (4/12)	33.3 (4/12)	100 (4/4)
SMAD4	41.7 (5/12)	50.0 (6/12)	100 (5/5)
CDKN2A/p16	33.3 (4/12)	58.3 (7/12)	100 (4/4)
β -catenin	25.0 (3/12)	16.7 (2/12)	66.7 (2/3)
RNF43	8.3 (1/12)	8.3 (1/12)	0 (0/1)

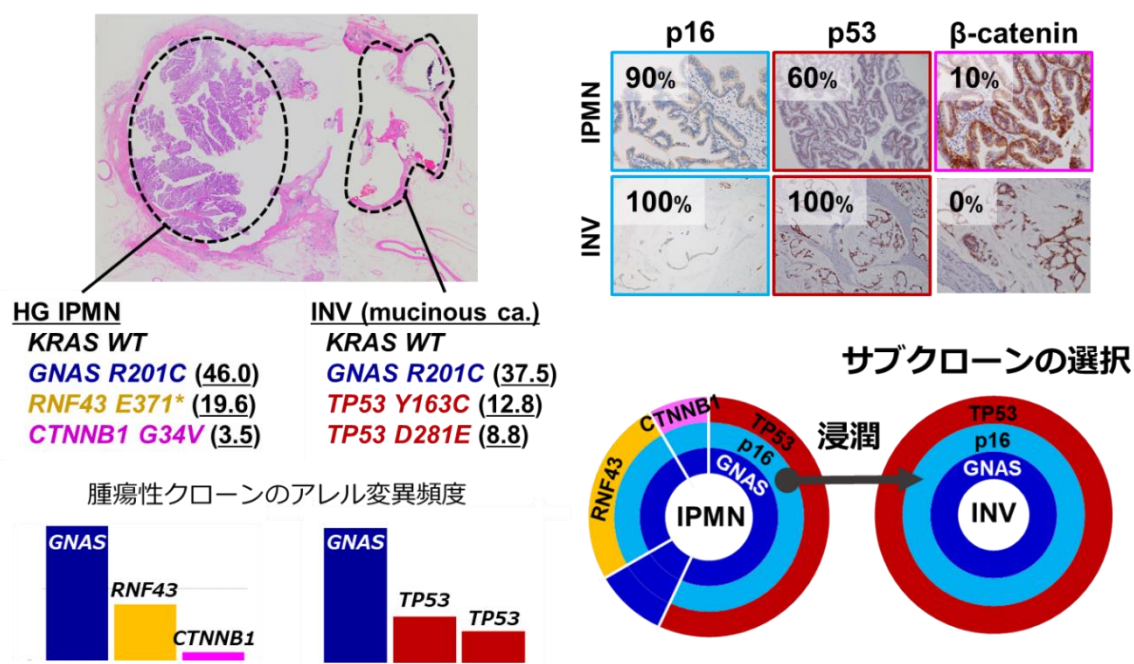


図 55: Case 1 の分子プロファイルから導いた浸潤過程でのサブクローン選択 INV, invasive cancer component.

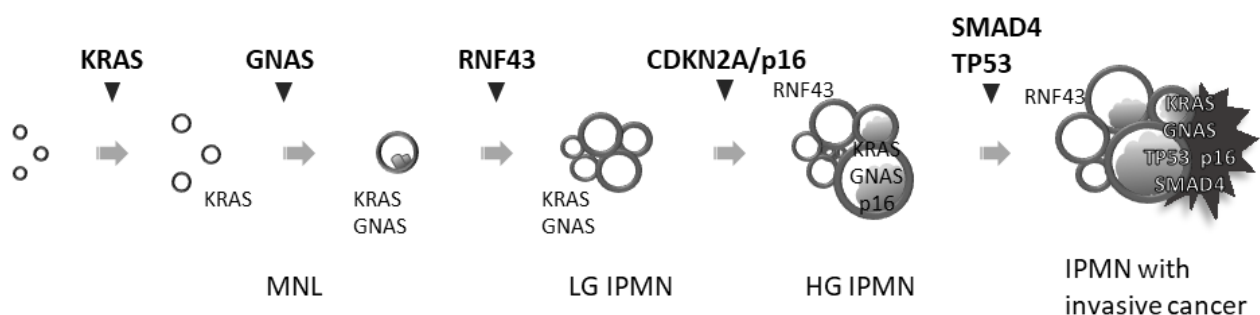


図 56: Sequential subtype の発育スキーム

同一症例内での co-existing IPMN と浸潤癌での *KRAS* および *GNAS* のアレル変異頻度の推移を示す (図 57)。高異型度 IPMN から浸潤癌への進展過程で、その変異頻度が 25%以上増加、25%以上減少、および変化がなかったのは *KRAS* でそれぞれ 2 例、3 例、7 例 ($p=0.376$)、*GNAS* でそれぞれ 1 例、2 例、9 例 ($p=0.328$) であった。低異型度 IPMN から浸潤癌までの進展を評価できたのは *KRAS*、*GNAS* 各 1 例で、低異型度から高異型度 IPMN への進展時に 25%以上の変異頻度の上昇が見られたが、PDA では変異頻度の上昇は認めなかった (図 57、green line)。

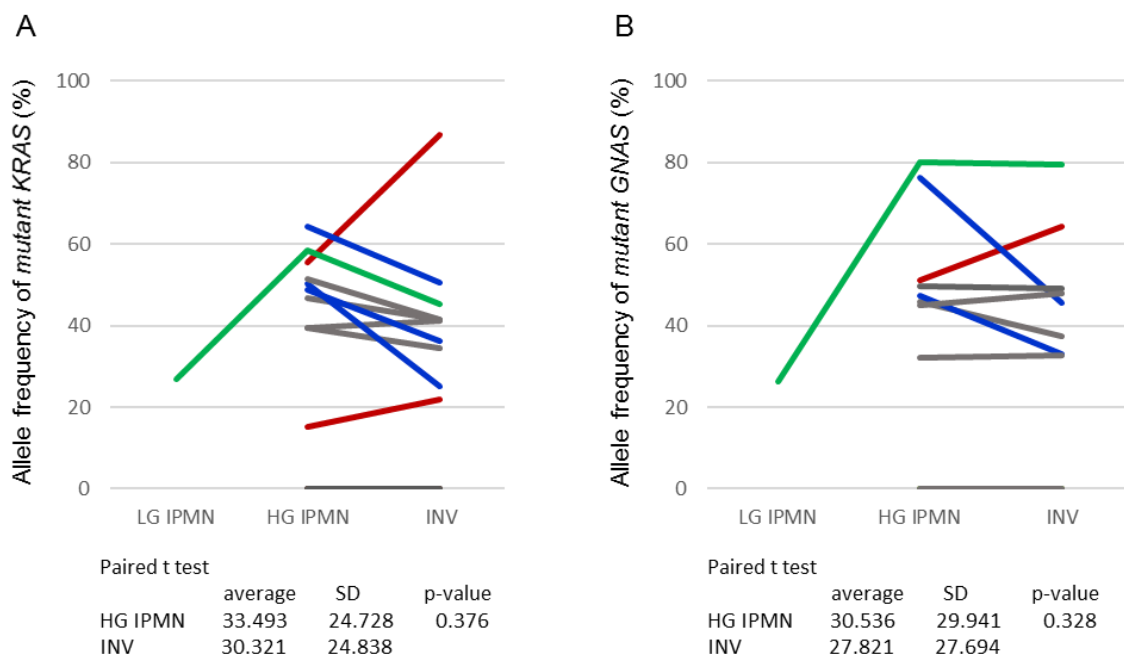


図 57: Co-existing IPMN と浸潤癌でのアレル変異頻度の比較

(A) *KRAS*、(B) *GNAS*。Red : 25%以上増加、blue : 25%以上減少、gray : 変化なし、green : 低異型度 IPMN から浸潤癌まで評価できた症例。

Sequential subtype PDA を発生する IPMN の特徴を示す。全例高異型度で、Sequential subtype PDA へ進展しなかった IPMN に比較（図 58）して、胃型 IPMN の頻度が少なかった（ $p < 0.05$ ）。*KRAS* 野生型症例の割合が多く、*SMAD4* 変異及び p53 過剰発現の頻度が高かった（ $p < 0.05$ ）。この統計学的有意差は多変量解析でも示された（表 14）。

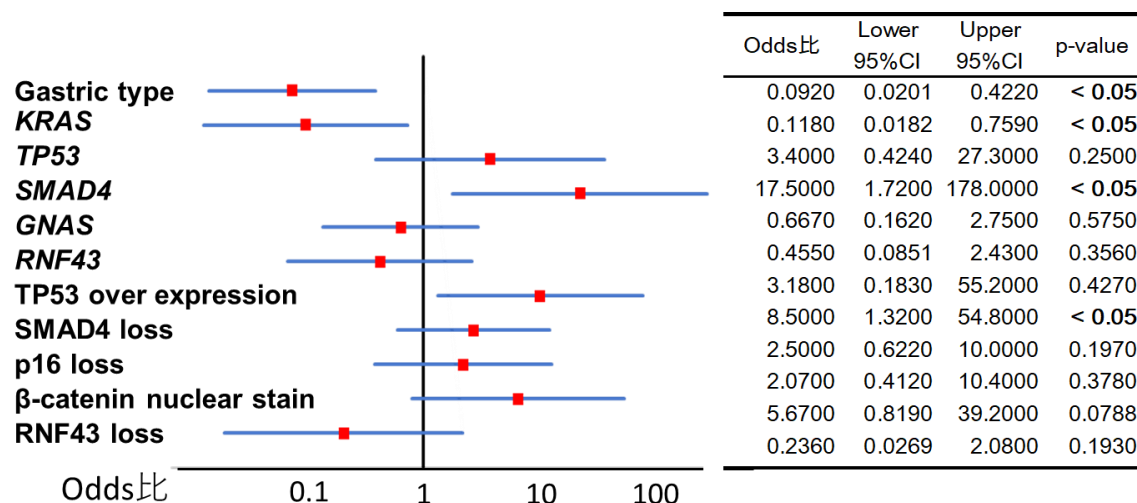


図 58 : Sequential subtype PDA へ進展した IPMN と進展しなかった IPMN の分子異常の比較（単変量解析）

表 14 : Sequential subtype PDA へ進展した IPMN と進展しなかった IPMN の分子異常の比較（多変量解析）

Multivariate logistic regression analysis				
	Odds ratio	Lower 95%CI	Upper 95%CI	p-value
<i>KRAS</i> mutation	0.0804	0.0092	0.7050	<0.05
<i>SMAD4</i> mutation	25.0000	1.9100	326.0000	<0.05
TP53 positive	12.4000	1.4200	109.0000	<0.05

9) *De novo* subtype の遺伝学的特徴

Co-existing IPMN と浸潤癌は異なる *KRAS* 変異を有し、遺伝学的にそれぞれ異なるクローンに由来していると判断できる。浸潤癌では通常型膵管癌と同様に *CDKN2A/p16* や *SMAD4*、*TP53* などの癌抑制遺伝子異常が蓄積し、癌化へ至っていた。背景膵には多彩な *KRAS* 変異を有する腫瘍性クローンの発生が認められ、IPMN 患者の膵臓における多様なクローンに由来する多中心性発生と判断される subtype である。*De novo* subtype の代表例（図 59）と発生経路のスキーム（図 60）を示す。

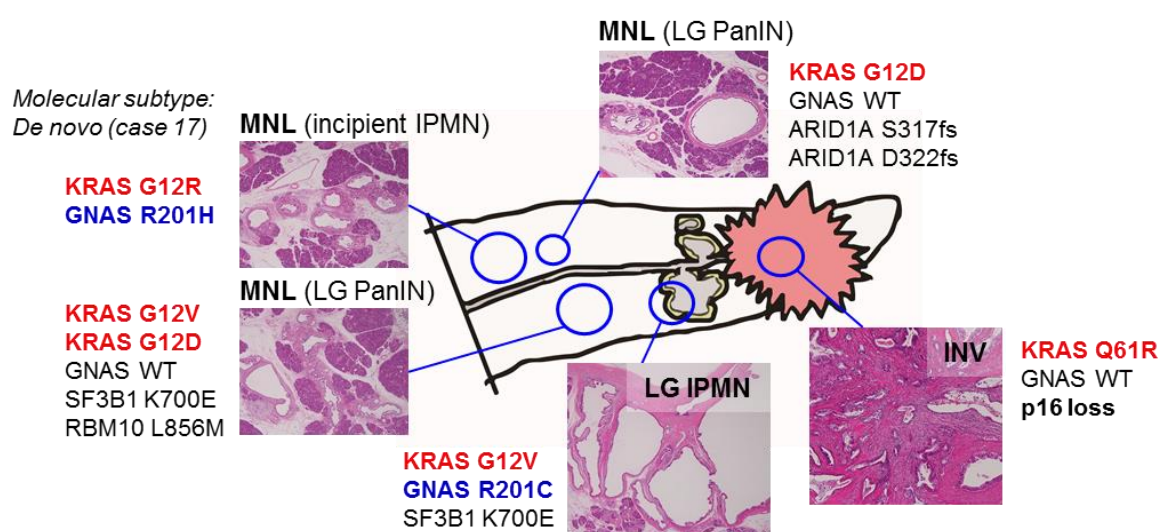


図 59 : *De novo* subtype の代表例 (Case 17)

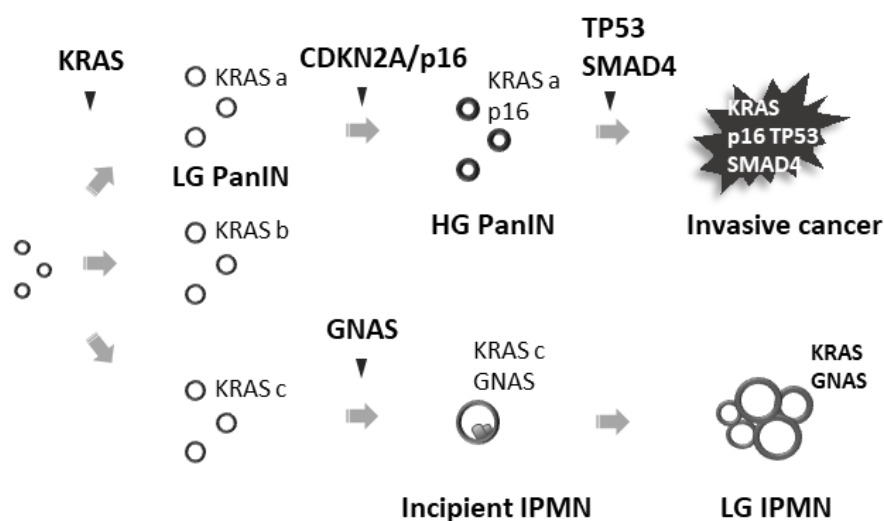


図 60: *De novo* subtype の発育スキーム

10) Branch-off subtype の遺伝学的特徴

Co-existing IPMN と浸潤癌が同一の *KRAS* 変異を有し、IPMN に隣接した発生が多いことを特徴とする。IPMN に *GNAS* 変異やその他の遺伝子変異が認められた症例においても、浸潤癌においてそれらは野生型であり、IPMN そのものからの浸潤癌への連続的進展性は認められない点で、従来の由来癌に相当する Sequential subtype と異なっている。

Case 12 (図 26)、case 13 (図 27)、case 18 (図 32) では、IPMN と浸潤癌の間の主膵管に低異型度 PanIN に相当する腫瘍性異型上皮の連続した上皮置換性進展が認められた。これらの所見から、同一の初期クローンから、進化の或る過程で *GNAS* 変異を獲得したサブクローンが IPMN へ、*CDKN2A/p16* や *SMAD4*、*TP53* などの癌抑制遺伝子異常を獲得したサブクローンが浸潤癌へという、2つの異なる表現型の腫瘍へ「枝分かれ」して发育していく可能性が示唆された。Branch-off subtype の代表例 (図 61、図 62) と発生経路のスキーム (図 63) を示す。

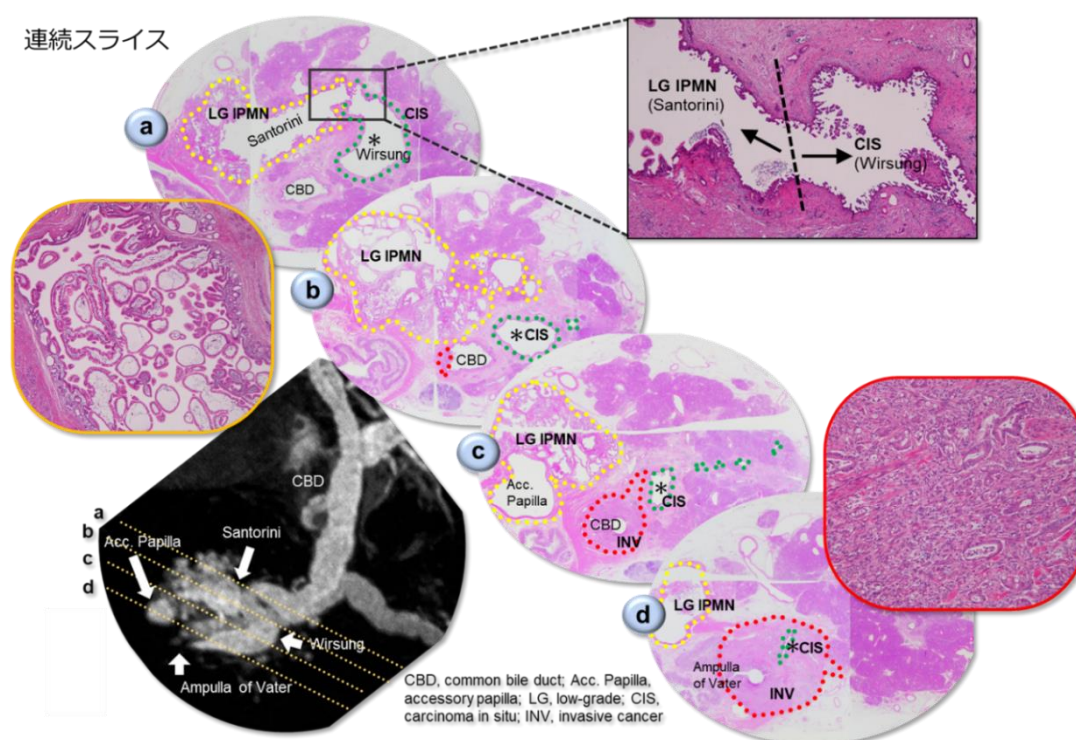


図 61 : Branch-off subtype の代表例 (Case 18)

Santorini 管から Wirsung 管に膵管内腫瘍性上皮が連続していた。赤線、浸潤癌；黄線、低異型度 IPMN；緑線、上皮内癌。

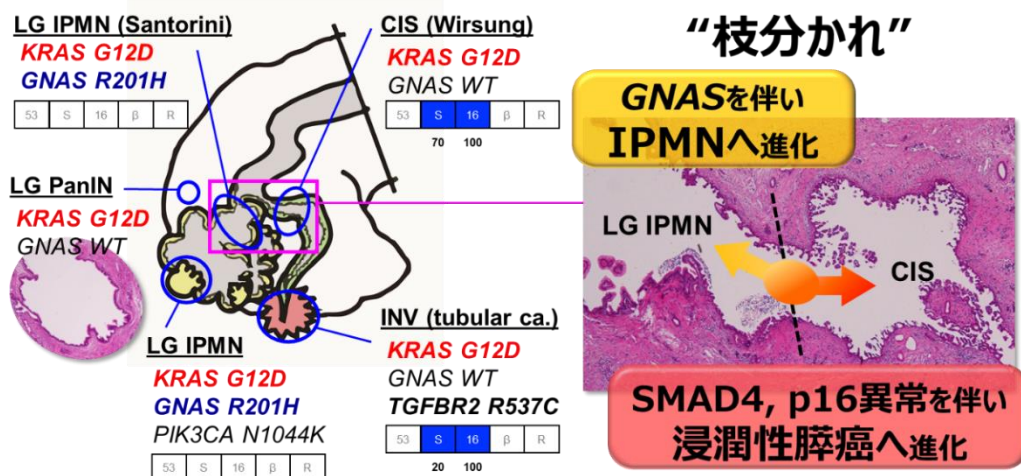


図 62 : Branch-off subtype の代表例、症例 18 の分子プロフィール

共通の初期クローンの広がりから、*GNAS* 変異を伴い IPMN へ進化する経路と癌抑制遺伝子異常を伴い浸潤性膵癌へ進化する経路が、形態学的、遺伝学的にも枝分かれを示していた。

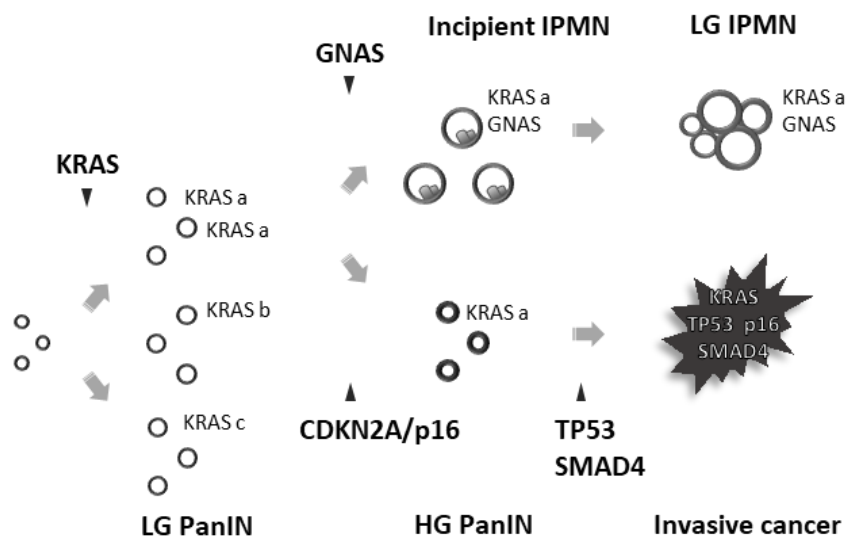


図 63: Branch-off subtype の発育スキーム

但し、*KRAS* 変異バリエーションの一致性から“branch-off subtype”とした群には、病変間の距離が 2 cm 程度離れている症例 (case 16、図 30、case 19、図 33) や、アレル変異頻度の低い変異バリエーションでの一致である症例 (case 14、図 28、case 19、図 33) も含まれる。*KRAS* の hot spot 変異での一致のみでは、多発性に発生した腫瘍性クローンにおける偶然の一致の可能性もあり、“Branch-off subtype”には、遺伝学的には多様な症例が混在していると考えられる。

11) 癌化 module 蓄積の検討

IPMN 関連膵癌の癌化に参与した経路（癌化 module）の蓄積の検討を行った。遺伝子変異と蛋白異常発現のいずれかがあれば「異常あり」と判定した。関連膵癌 33 病変では、通常型膵癌における癌化 module と同様に、*KRAS* 変異 84.8%、TGF- β シグナル経路（*SMAD4*、*TGFBR1*、*TGFBR2*）異常 72.7%、*CDKN2A/p16* 異常 72.7%、*TP53* 異常 54.5%が同定された。このうち *CDKN2A/p16* 異常と *TP53* 異常は G1/S checkpoint 異常として統合し検討した（図 64）。IPMN 関連膵癌 33 病変中、22 病変（66.7%）では、*KRAS*、G1/S checkpoint 機構、TGF- β シグナル経路の全てに異常が認められた。IPMN に特異的な遺伝子異常として *GNAS* 変異と WNT 経路（RNF43、 β -catenin）異常を検討した。*GNAS* 変異を有した Sequential subtype 9 病変中 4 病変（44.4%）では、WNT 経路異常が認められた。粘液癌 5 病変は、全例 2 module 未満の蓄積しか見られず、管状腺癌よりも異常の蓄積数が少ない傾向が見られた。

Molecular subtype 別に見ると（図 65）、Branch-off subtype と *de novo* subtype は同等の癌化 module の蓄積が認められた。また、両者は Sequential subtype よりも蓄積した module 数が多い傾向があったが、統計学的有意差は認めなかった（図 65 右、 $p=0.123$ ）。*De novo* subtype では、Sequential subtype に比して、有意に *TP53* 異常が高頻度であった（図 65 左、 $p<0.05$ ）。Subtype による WNT 経路の蓄積に差は見られなかった。

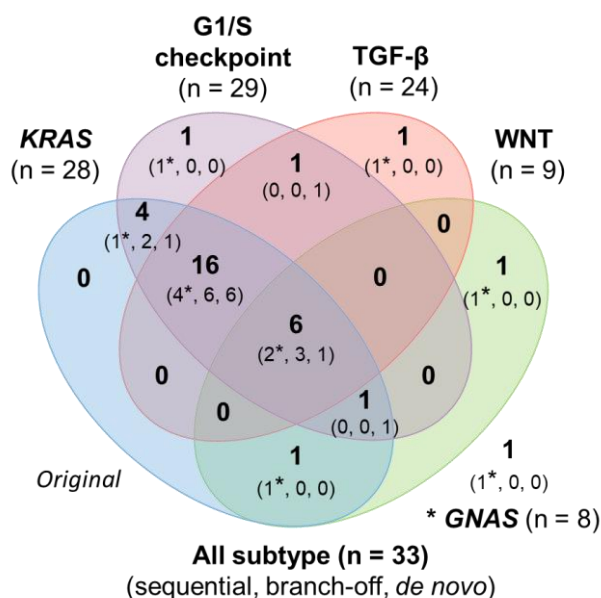


図 64 : IPMN 関連膵癌における癌化 module の蓄積パターン

Venn diagram を用いて、IPMN 関連膵癌 33 例における *KRAS* 変異、G1/S checkpoint 機構、TGF- β シグナル経路 WNT 経路異常の蓄積を示す。

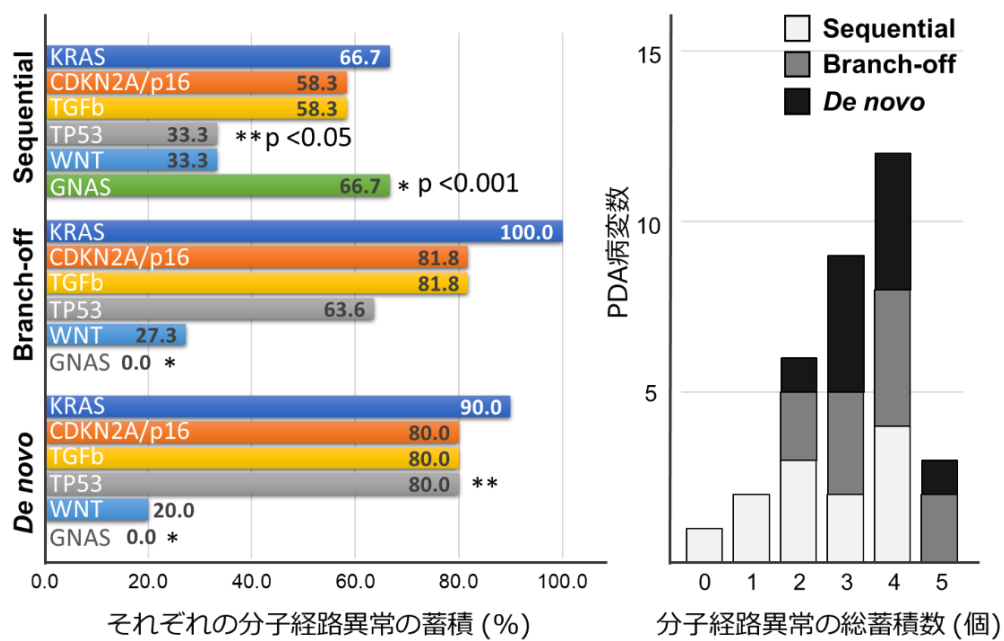


図 65 : Molecular subtype 別にみた癌化 module の蓄積パターンと蓄積数

12) Molecular subtype の予後解析

Molecular subtype 別の Kaplan-Meier 曲線を示す (図 66)。無再発生存率では、Branch-off において、*de novo* よりも有意に無再発生存期間が長く ($p=0.04376$ 、ハザード比 4.056)、Sequential よりも長い傾向 ($p=0.12370$ 、ハザード比 2.990) があつた。全生存率に有意差は認められなかった。

Molecular subtype 別にみた再発形式の比較を示す (表 14)。Sequential では残臍再発が他の 2 群に比較し多く、*de novo* では遠隔転移再発が多かったが、いずれも 3 群間では統計学的有意差は見られなかった。

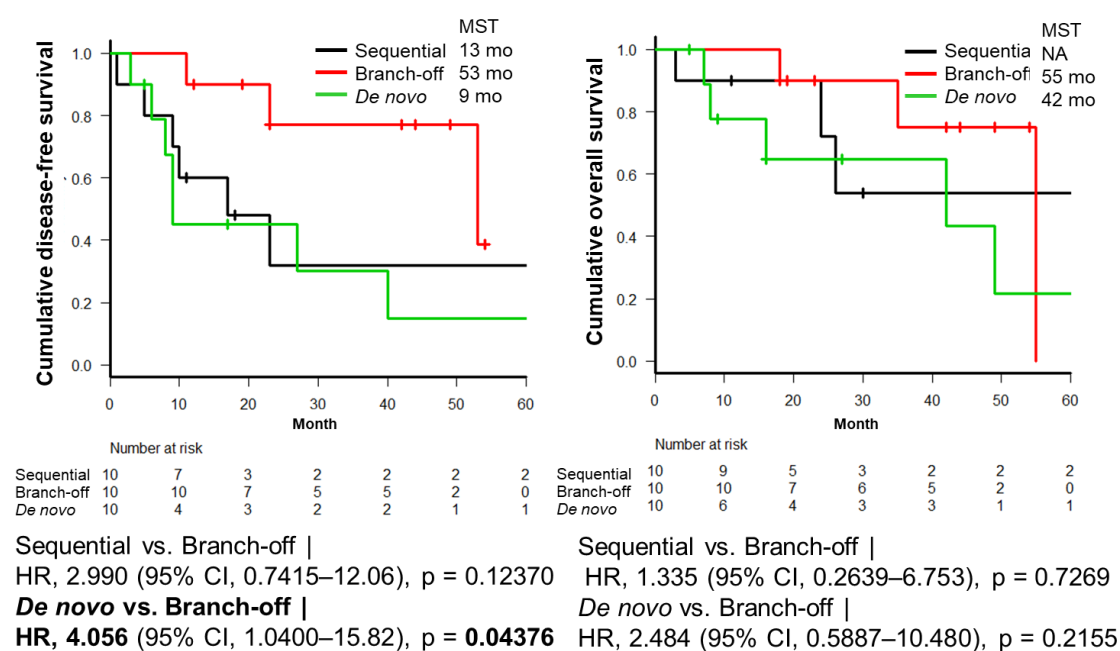


図 66 : Molecular subtype 別にみた Kaplan-Meier 曲線

(A) Disease-free survival、(B) Overall survival。

表 14 : Molecular subtype 別にみた再発形式の比較

	Sequential	Branch-off	De novo	p-value
追跡可能な患者数	9	9	8	
再発形式*				
残臍	3	1	1	0.567
局所	2	0	2	0.499
遠隔転移	3	1	5	0.0949
腹膜播種	0	2	1	0.502
無再発	2	6	1	0.0678

* 症例により再発形式の重複あり

13) Molecular subtype 別にみた背景膵の顕微鏡的腫瘍性病変の解析

背景膵を含めて同時に発生した初期クローンの遺伝学的多様性を検証した。Microscopic neoplastic lesion (MNL) を PanIN もしくは incipient IPMN を含んだ顕微鏡的な膵管内腫瘍性病変と定義し、背景膵における MNL 数を計数した。Sequential subtype PDA (以下、Sequential) が発生した膵臓に比較して、Branch-off subtype PDA (以下、Branch-off、 $p=0.0232$) と *de novo* subtype PDA (以下、*de novo*、 $p=0.0147$) が発生した膵臓では MNL 数が有意に多く認められた (図 67-A)。MNL における *KRAS* 変異率は 3 群で有意差を認めなかったが、*GNAS* 変異率は Sequential において、Branch-off ($p=0.015$) および *de novo* ($p=0.036$) よりも高頻度に認められた (図 67-B)。

KRAS 変異プロファイルによる初期クローンの多様性の検討では、Sequential が発生した膵臓に比して、Branch off ($p=0.0046$) と *de novo* ($p=0.0018$) が発生した膵臓では、有意に多様な *KRAS* 変異が認められた (図 68、図 69)。

また、*KRAS*、*GNAS* に加えて、微小な膵管内病変の段階においても、*TP53* や *SMAD4* を含む、様々な遺伝子異常の蓄積が開始されていた (図 70)。これは、画像的に明らかな IPMN の背景に、将来癌化するであろう微小な膵管内病変が同時に多発していることを示している。ドライバー遺伝子変異パターン別 (*KRAS*/*GNAS* 変異あり、*KRAS* 変異のみあり、いずれも野生型) にみた遺伝子異常の蓄積割合を示す (表 15)。各群間に統計学的有意差は見られなかった。

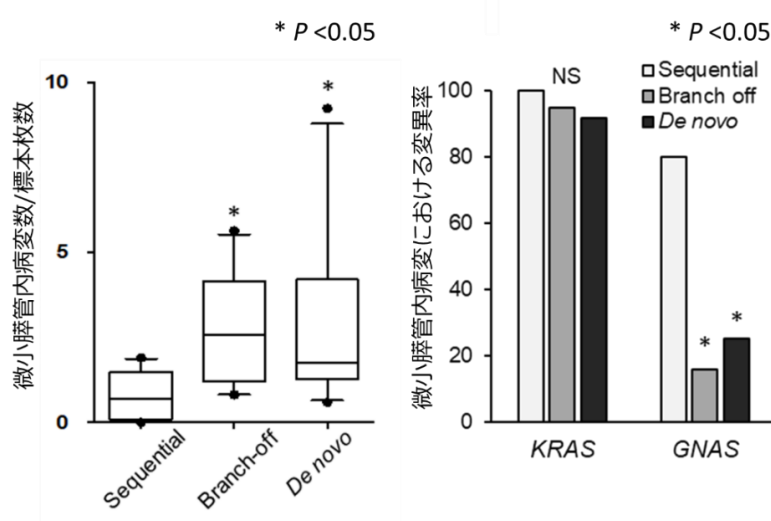


図 67 : (A) Molecular subtype 別にみた MNL 数の比較、(B) 3 群での MNL における *KRAS* 変異率および *GNAS* 変異率の比較。

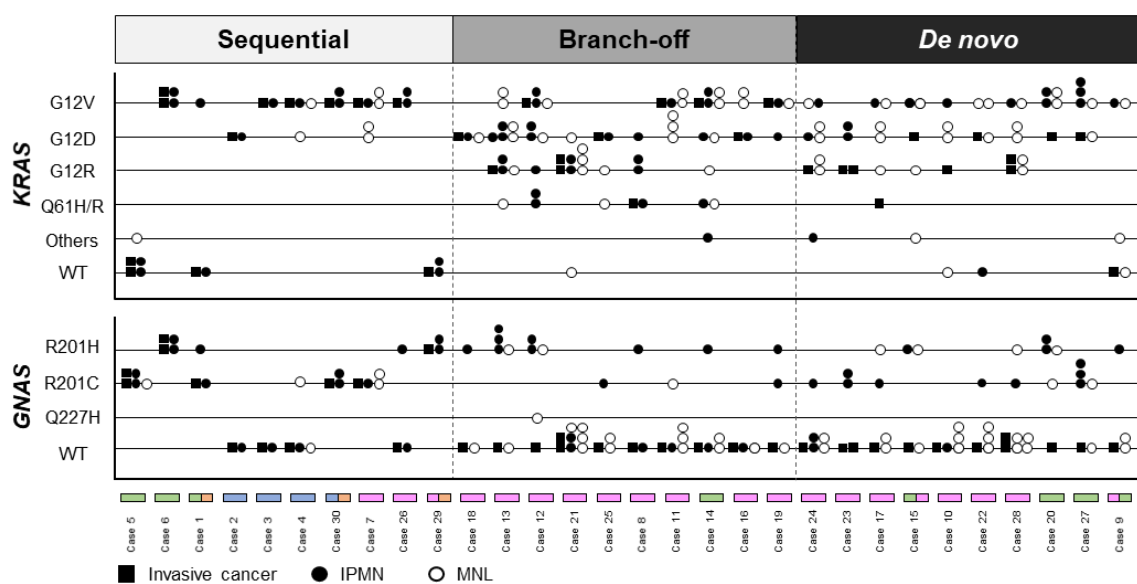


図 68: 同一腺の MNL、IPMN、浸潤癌で同定された *KRAS* 変異バリエントと *GNAS* 変異バリエントの分布

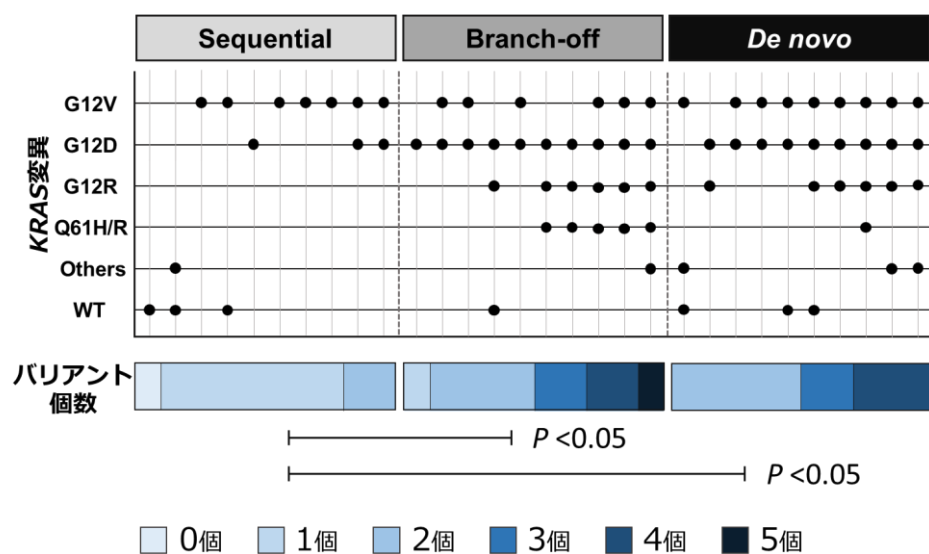


図 69 : 同一腺で同定された *KRAS* 変異バリエントの分布と数の比較

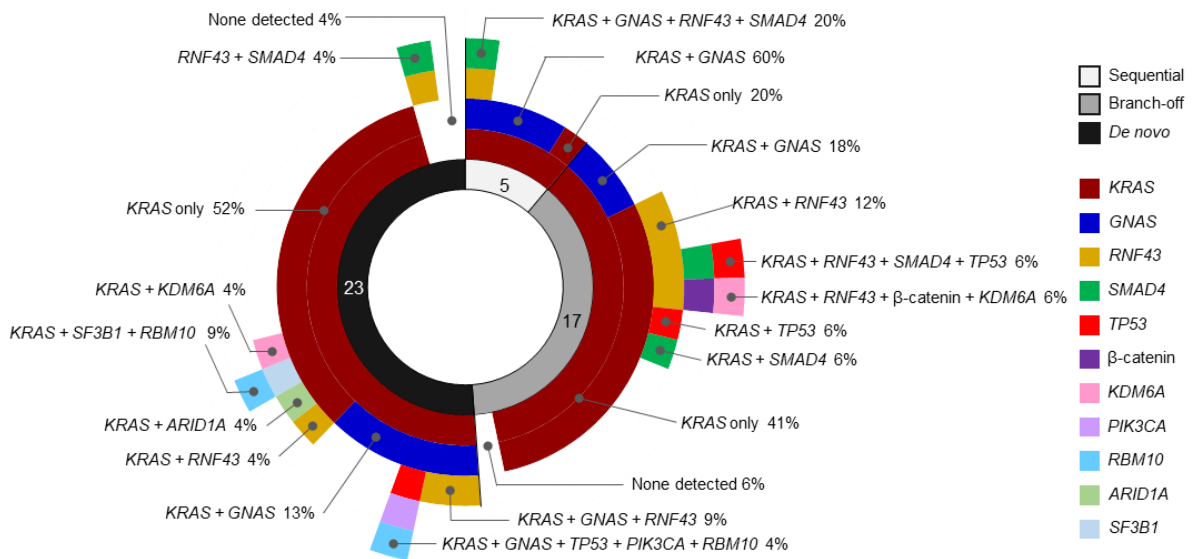


図 70 : MNL における遺伝子異常の蓄積

表 15 : ドライバー遺伝子変異パターン別に見た MNL の遺伝子異常蓄積の割合

	Number of MNL	<i>RNF43</i>	<i>TP53</i>	<i>SMAD4</i>	Other	All abnormality
<i>KRAS</i> / <i>GNAS</i> mutant	13	3 (23.1%)	1 (7.7%)	1 (7.7%)	1 (7.7%)	4 (30.8%)
<i>KRAS</i> mutant	29	5 (17.2%)	2 (6.9%)	2 (6.9%)	4 (13.8%)	10 (34.5%)
<i>KRAS</i> / <i>GNAS</i> wild type	3	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)

【考察】

IPMN を含む膵嚢胞性疾患は、最も予後不良な悪性腫瘍の一つである浸潤性膵管癌の発生リスクが健常者の 19.6-22.5 倍とされる^{11, 45}。しかし、どのような IPMN 患者が由来癌へ進展するリスクが高いのかはこれまで明らかになっていない。また、IPMN 患者の慎重な追跡観察中であっても、併存膵癌の早期発見はしばしば困難なのが現状である。国際診療ガイドライン (Fukuoka Criteria)⁸に加え、IPMN 関連膵癌の早期発見を目指したリスク層別化アルゴリズムの策定が急務である。そのためには IPMN 関連膵癌の腫瘍進化経路を分子病理学的に解明する必要があると考え、本研究を行った。我々は、IPMN 関連膵癌患者の膵切除検体を、膵癌発生モデルと捉え、MNL、低異型度 IPMN、高異型度 IPMN、浸潤癌の各病変の徹底的な遺伝子変異マッピングと病理組織学的解析を基に、IPMN の多段階的癌化の特徴や、併存膵癌発生経路を癌細胞の clonal evolution の観点から追跡した。

30 症例 33 病変における分子病理学的検討から、IPMN 患者における膵癌の発生経路は 3 つの Molecular subtype に分類された (図 71、図 72)。IPMN と関連した浸潤癌における *KRAS* 変異と *GNAS* 変異の比較検討については、すでにいくつかの報告がなされ^{47, 48, 49, 57}、異型度別に分子病理学的特徴を検討した知見も蓄積されている^{34, 39, 58}。しかし、これまでの報告では、臨床的に指摘可能であった IPMN 病変および浸潤癌病変に焦点が当てられており、病変の相互位置関係や、背景膵にしばしば観察される顕微鏡的な膵管内腫瘍性病変を包括し、それらの遺伝学的特徴の関連付けを試みた検討はこれまでない。

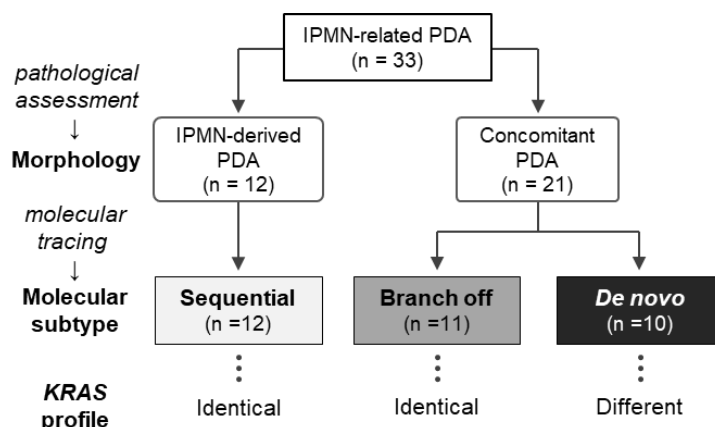


図 71 : IPMN 関連膵癌における Molecular subtype 分類の提唱

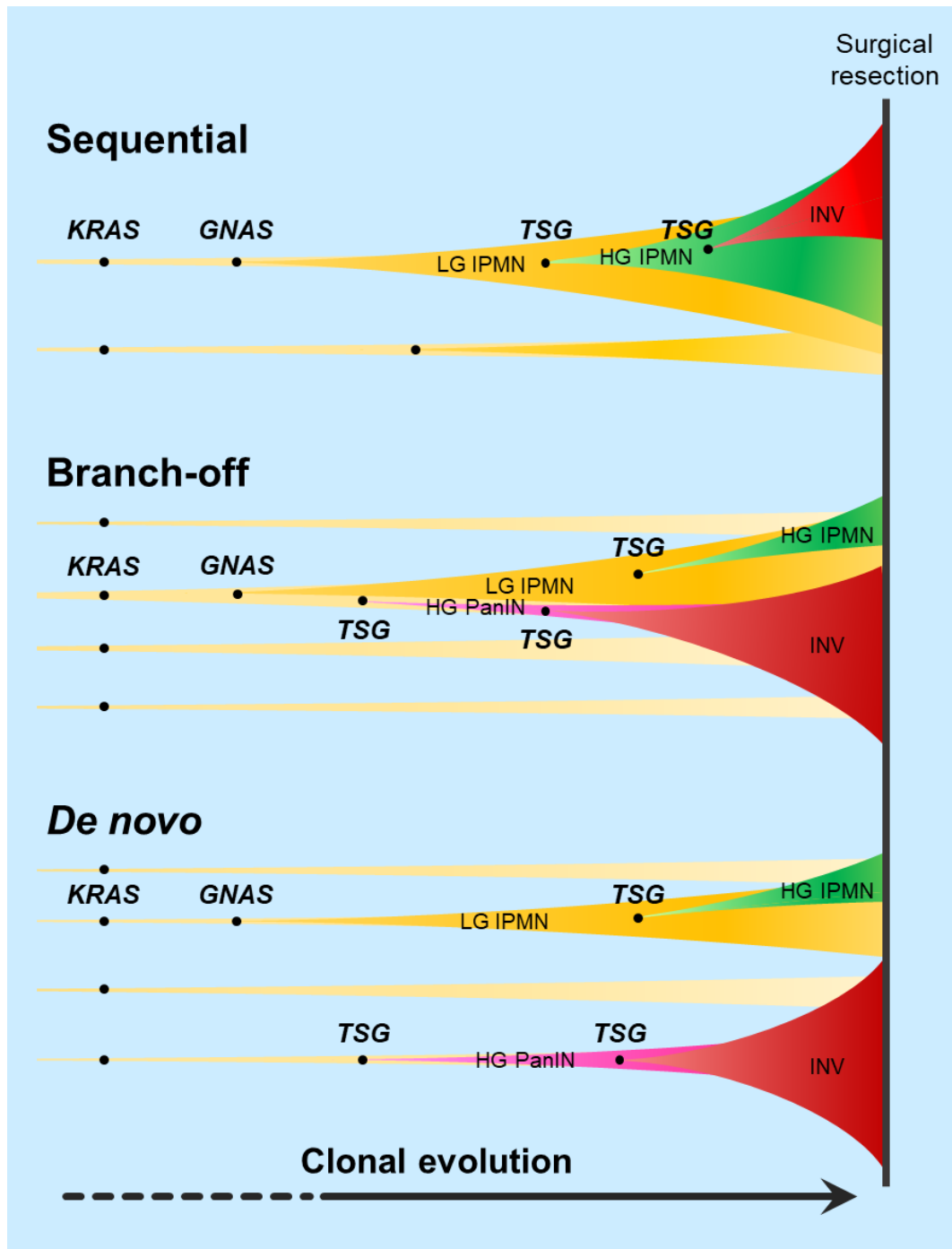


図 72 : Molecular subtype 分類におけるクローン進化経路の模式図
 一つのストリームは異なるドライバー遺伝子 (*KRAS*、*GNAS*) 変異に規定される多様なクローンを表し、赤が浸潤癌、緑が高異型度 IPMN、濃黄が低異型度 IPMN、桃が高異型度 PanIN、薄黄が低異型度 PanIN を表す。横軸はクローン進化の時間軸を表し、縦軸はクローンの広がり、すなわち腫瘍の大きさや進展度を表す。加速度は腫瘍の悪性度を表す。LG, low-grade; HG, high-grade; INV, invasive cancer; TSG, tumor suppressor gene.

一つ目の Molecular subtype 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（図 71、図 72）。全例で 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^{49, 50}、高異型度 IPMN の段階もしくは浸潤の過程で、*SMAD4*、*TP53*、*CDKN2A/p16*、*CTNNB1* 異常の蓄積が見られた。Sequential subtype PDA 発生に至った co-existing IPMN の分子病理学的特徴は、全例高異型度で、Sequential subtype PDA へ進展しなかった IPMN に比較し、有意に、胃型 IPMN よりも腸型・胆膵型の頻度が多く、*KRAS* 野生型の割合が多く、*SMAD4* 変異および p53 過剰発現の頻度が高かった。この知見は、Sequential subtype PDA 発生の高リスク群の同定に、国際ガイドラインに示される画像所見のアルゴリズム⁸に加え、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 発現の評価、膵液や十二指腸液を用いた遺伝子解析^{61, 65}の有用性を示唆するものである。

一方、国際ガイドライン⁸は高異型度 IPMN の同定に主眼を置いたものであることから、由来癌のリスク評価には有用であるが、併存癌の発生を予測することはできなかった。今回遺伝子解析を行った 30 症例を含め、手稲溪仁会病院にて 1997 年 4 月から 2017 年 3 月までに診断された IPMN 全症例において、IPMN 由来浸潤癌（= “Sequential subtype”）は、IPMN 関連膵癌の 1/3 を占めるに過ぎず、残り 2/3 を併存癌が占めた（表 16）。慎重な追跡観察中においても、しばしば進行膵癌として発見される併存癌の発生メカニズムの解析が重要と考えられた。

表 16：手稲溪仁会病院における IPMN 関連膵癌の発生数

IPMN全症例数 (n=1187)

	発生数	発生率(%)
IPMN由来浸潤癌	32	2.7
IPMN併存膵癌	73	6.1
離れて存在	41	3.4
隣接して存在	32	2.7
鑑別困難	5	0.4

手稲溪仁会病院 消化器病センター (1997.4-2017.3)

本研究により、従来の併存癌とされた IPMN と浸潤癌に組織学的移行像を有さない群は、分子病理学的に 2 つの molecular subtype に分類することが可能であった。IPMN と浸潤癌が異なる *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 と浸潤癌で共通の *KRAS* 変異を有し、有意に位置的に近接して発生することが示され、初期クローンを共有した母地から、或る段階で 2 つの異なる表現型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（図 71、図 72）。前者は IPMN から離れて発生した併存癌に多い傾向があったが、隣接して発生した症例も含まれた。後者は IPMN で *GNAS* 変異が同定された症例でも、浸潤癌は全例 *GNAS* 野生型であった。近接して発生しながらも組織学的移行像を欠如し、遺伝学的連続性が示されない点で“*Sequential subtype*”とは異なっている。有意に IPMN に隣接して発生し、3 例においては組織学的にも IPMN と浸潤癌の間をつなぐ大型膵管（主膵管および Santorini 管）を低異型度腫瘍性上皮が連続していることが確認された。一連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る。“*Branch-off subtype*”が独立した発生経路であることを証明するため、今後、全エクソームシーケンスと Methylation 解析を行い、初期クローンの共通性を裏付ける *KRAS* 変異以外の共通した遺伝学的異常の探索を予定している。

膵癌では、*KRAS*、*CDKN2A/p16*、*SMAD4*、*TP53* の異常の蓄積が多いほど、予後が不良と報告されている^{43, 64}。興味深いことに、*Branch-off subtype* では癌化 module の蓄積は、*de novo subtype* と同等に認められたにも関わらず、*de novo subtype* に比較し、有意に無再発生存期間が長く、*Sequential subtype* と比較しても良好の傾向が見られた。しかしながら、全生存率では 3 群に有意差は認められなかった。従来、IPMN 由来癌および併存癌は IPMN 非関連の通常型膵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であると考察されてきた¹⁹。しかし、今回の検討では病期および癌化 module の蓄積数によらず、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る。今回検討した 18 遺伝子では 3 群間で *KRAS* 変異パターンおよび *GNAS* 変異率以外に遺伝学的な差は見い出せなかった。*Branch-off subtype* の発生メカニズムを司る分子異常は不明であり、その探索は今

後の検討課題と考える。また、各群 10 例での予後解析であり、サンプリングバイアスの可能性は除外できない。症例を蓄積しての検討が今後の課題と考える。

Sequential subtype PDA の背景膵に分布する顕微鏡的な膵管内腫瘍性病変は *KRAS* 変異とともに *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。遺伝学的多様性が乏しいことと、5 mm 以下の微小病変の段階からすでに *GNAS* 変異が加わっていることが特徴と考えられる。*De novo* subtype と Branch-off subtype が発生した背景膵には、多数の顕微鏡的な膵管内腫瘍性病変が認められ、高率（90%以上）に *KRAS* 変異が同定された。同一膵内での *KRAS* 変異バリエントが多彩であることから、初期クローンの多様性が示された。IPMN 患者の膵臓では多中心発生的な腫瘍化が同時性に生じており、その一部に *GNAS* および *TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A/p16* 異常が蓄積されることにより、IPMN の発生・進展と、浸潤癌の発生に至ると考えられる。この *KRAS* 変異の多様性は併存癌が発生しやすい IPMN 患者の膵臓の特徴の一つと考えられる。

背景膵の顕微鏡的な膵管内腫瘍性病変においては、高い *GNAS* 変異率は Sequential subtype が発生する膵臓の特徴で、*de novo* subtype と Branch-off subtype では有意に低率であったが、臨床画像により捉えられる co-existing IPMN における *GNAS* 変異率は Sequential subtype で 60% (6/10 症例)、Branch-off subtype で 70% (7/10 症例)、*de novo* subtype で 90% (9/10 症例) であった。*GNAS* 変異のない胃型 IPMN が併存癌発生のリスクとする報告があるが^{51, 52}、本研究の結果を含め、議論を要する。

IPMN 患者における悪性化リスクの層別化を目的とした時、*KRAS* 変異および *GNAS* 変異の検討には、その変異バリエントの多様性を含めた質的評価が重要であると考えられた。また異型度別に見た腫瘍内の *KRAS* アレル変異頻度は、微小膵管病変から低異型度 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、検出される変異の量的評価も悪性度評価につながると考えられた。高異型度 IPMN から浸潤癌の過程では *KRAS* アレル変異頻度の増加は見られなかったが、膵切除の対象となる「悪性」の評価として、変異検出率が高い場合には同様に留意点となるであろう。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。十二指腸液^{60, 61, 65}や膵液、血液^{62, 66}を用いた liquid biopsy 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、膵癌発生を予測する有用な手法と考えられる。

本研究の限界は 18 遺伝子に限定した解析であり、100 例を超える膵癌のゲノム研究^{37, 50, 59}に示された膵癌関連遺伝子をすべて網羅したわけではないことである。しかし、本研究は 30 例と少数例での検討であるが、IPMN 関連膵癌の切除材料における詳細な腫瘍形態・位置情報と膨大な量のゲノム遺伝子情報を連結し、IPMN 関連膵癌の発育過程を分子病理学的に解析しえた。従って本研究は、これまでの報告にはない IPMN 関連膵癌の発症機序に関わる基盤的情報を示したものである。

【総括および結論】

本研究では、IPMN 関連膵癌の全割切片に詳細な病理学的マッピングを行い、浸潤癌と IPMN、さらに肉眼的正常膵にみられる顕微鏡的な膵管内腫瘍性病変の分布と遺伝子異常を詳細に評価し、以下に述べる新知見を得た。

- 1) IPMN 関連膵癌は形態ならびに遺伝子変異様式から、Sequential subtype、Branch-off subtype、*de novo* subtype の 3 つの亜型に分類することができる。
- 2) Sequential subtype、Branch-off subtype、*de novo* subtype では、それぞれ背景膵および臨床経過に異なった特徴を有する。すなわち、Sequential subtype では背景膵に微小な膵管内病変が少なく、*GNAS* 変異を有する割合が多い一方で、Branch-off および *de novo* subtype では、多彩な *KRAS* 変異パターンを有する膵管内病変を多く伴う。
- 3) Branch-off subtype では、無再発生存期間が他の 2 群に比較して長い。

本分類は、IPMN を母地とした膵発癌のサーベイランスにおいて、分子病理学的な多様性を念頭においた新たなリスク予測アルゴリズムを構築するうえでの基盤となりうる。今後、提唱した 3 つの亜型の症例集積を行い、臨床像、画像診断との対比、術後再発を含む予後調査を体系的に行うことで、IPMN 患者の悪性化リスクの層別化を実現したい。

【謝辞】

本研究の機会を与えて頂きました、北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室 田中伸哉教授に深く感謝致します。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました同教室 谷野美智枝講師、旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野准教授、兼札幌東徳洲会病院医学研究所がん研究部部門長 水上裕輔先生、札幌東徳洲会病院医学研究所臨床生体情報解析部部門長 小野裕介先生、札幌東徳洲会病院臨床試験センター センター長 唐崎秀則先生、元北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座特任教授、現慶應義塾大学医学部特任教授 西原広史先生に心より感謝申し上げます。病理学的な御指導を承りました東北大学大学院医学系研究科病理形態学分野教授 古川徹先生、東京医科大学人体病理学分野准教授 山口浩先生に深謝いたします。

そして、手稲溪仁会病院消化器病センターにて蓄積された貴重な IPMN 関連膵癌切除検体と臨床的知見を惜しみなく本研究に御提供頂きました、手稲溪仁会病院消化器病センター センター長 真口宏介先生に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究に当たってご指導・ご協力を頂きました、北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室、手稲溪仁会病院病理部、同院消化器病センター、同院外科、札幌東徳洲会病院医学研究所の全ての皆様に、心より御礼申し上げます。

【引用文献】

1. 平成 26 年(2014) 人口動態統計(確定数)の概況, 厚生労働省. 国立がん研究センター情報サービス: がん登録・統計. <http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/dl/index.html>
2. Katanoda, K, Hori, M, Matsuda, T., Shibata, A., Nishino, Y., Hattori, M., Soda, M., Ioka, A., Sobue, T. & Nishimoto, H. An updated report on the trends in cancer incidence and mortality in Japan, 1958-2013. *Jpn Clin Oncol.* **5**, 390-401 (2015).
3. Egawa, S., Toma, H., Ohigashi, H., Okusaka, T., Nakao, A., Hatori, T., Maguchi, H., Yanagisawa, A. & Tanaka, M. Japan Pancreatic Cancer Registry: 30th year anniversary: Japan Pancreas Society. *Pancreas.* **41**, 985-992 (2012).
4. Suzuki, Y., Atomi, Y., Sugiyama, M., Isaji, S., Inui, K., Kimura, W., Sunamura, M., Furukawa, T., Yanagisawa, A., Ariyama, J., Takada, T., Watanabe, H. & Suda, K. Cystic neoplasm of the pancreas: a Japanese multiinstitutional study of intraductal papillary mucinous tumor and mucinous cystic tumor. *Pancreas.* **28**, 241-246 (2004).
5. Maguchi, H., Tanno, S., Mizuno, N., Hanada, K., Kobayashi, G., Hatori, T., Sadakari, Y., Yamaguchi, T., Tobita, K., Doi, R., Yanagisawa, A. & Tanaka, M. Natural history of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: a multicenter study in Japan. *Pancreas.* **40**, 364-370 (2011).
6. Fernandez-del Castillo, C. & Adsay, V. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterol.* **139**, 708-713 (2011).
7. Mino-Kenudson, M., Fernandez-del Castillo, C., Baba, Y., Valsangler, N. P., Liss, A. S., Hsu, M., Correa-Sahani, D. V., Brugge, W. R., Ogino, S., Pitman, M. B., Warshaw, A. L. & Thayer, S. P. Prognosis of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm depends on histological and precursor epithelial subtypes. *Gut.* **60**, 1712-1720 (2011).
8. Tanaka, M., Fernandez-del Castillo, C., Adsay, V., Chari, S., Falconi, M., Jang, J. Y., Kimura, W., Levy, P., Pitman, M.B., Schmidt C. N., Shimizu, M., Wolfgang, C. L., Yamaguchi, K. & Yamao, K. International consensus guidelines 2012 for the management of IPMN and MCN of the pancreas. *Pancreatol.* **12**, 183-97 (2012).

9. Tanaka, M., Chari, S., Adsay, V., Fernandez-del Castillo, C., Falconi, M., Shimizu, M., Yamaguchi, K., Yamao, K. & Matsuno, S. International Association of Pancreatology. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology*. **6**, 17-32 (2006).
10. Yamaguchi, K., Ohuchida, J., Ohtsuka, T., Nakano, K., & Tanaka, M. Intraductal papillary-mucinous tumor of the pancreas concomitant with ductal carcinoma of the pancreas. *Pancreatology*. **2**, 484-90 (2002).
11. Tada, M., Kawabe, T., Arizumi, M., Togawa, O., Matsubara, S., Yamamoto, N., Nakai, Y., Sasahira, N., Hirano, K., Tsujino, T., Tateishi, K., Isayama, H., Toda, N., Yoshida, H. & Ohmata, M. Pancreatic cancer in patients with pancreatic cystic lesions: a prospective study in 197 patients. *Clin Gastroenterol Hepatol*. **4**, 1265-70 (2006).
12. Uehara, H., Nakaizumi, A., Ishikawa, O., Iishi, H., Tatsumi, K., Takakura, R., Ishida, T., Takano, Y., Tanaka, S. & Takenaka, A. Development of ductal carcinoma of the pancreas during follow-up of branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Gut*. **57**, 1561-1565 (2008).
13. Ohno, E., Hirooka, Y., Itoh, A., Ishigami, M., Katano, Y., Ohmiya, N., Niwa, Y. & Goto, H. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: differentiation of malignancy and benign tumors by endoscopic ultrasound findings of mural nodule. *Ann Surg*. **249**, 628-634 (2009).
14. Ingkakul, T., Sadakari, Y., Ienaga, J., Satoh, N., Takahata, S. & Tanaka, M. Predictors of the presence of concomitant invasive ductal carcinoma in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Ann Surg*. **251**, 70-75 (2010).
15. Kanno, A., Satoh, K., Hirota, M., Hamada S., Umino, J., Itoh, H., Masamune, A., Asakura, T. & Shimosegawa, T. Prediction of invasive carcinoma in branch type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *J Gastroenterol*. **45**, 952-959 (2010).
16. Tanno, S., Nakano, Y., Sugiyama, Y., Nakamura, K., Sasahima, J., Koizumi, K., Yamazaki, M., Nishikawa, T., Mizukaim, Y., Yanagawa, N., Fujii, T., Obara, T., Okumura, T. & Kohgo, Y. Incidence of synchronous and metachronous pancreatic carcinoma in 168 patients with branch duct intraductal papillary mucinous neoplasm. *Pancreatology*. **10**, 173-178

(2010).

17. Ikeuchi, N., Itoi, T., Sofuni, A., Itokawa, F., Tsuchiya, T., Kurihara, T., Ishii, K., Tsuji, S., Umeda, J., Moriyasu, F., Tsuchida A. & Kasuya, K. Prognosis of cancer with branch duct type IPMN of the pancreas. *World J Gastroenterol.* **16**, 1890-1895 (2010).
18. Sawai, Y., Yamao, K., Bhatia, V., Chiba, T., Mizuno, N., Sawaki, A., Takahashi, K., Tajika, M., Shimizu, Y., Yatabe, Y. & Yanagisawa, A. Development of pancreatic cancers during long-term follow-up side-branch intraductal papillary mucinous neoplasms. *Endpscopy.* **42**, 1077-1084 (2010).
19. Yamaguchi, K., Kanemitsu, S., Hatori, T., Maguchi, H., Shimizu, Y., Tada, M., Nakagohri, T., Hanada, K., Osanai, M., Noda, Y., Nakaizumi, A., Furukawa, T., Ban, S., Nobukawa, B., Kato, Y. & Tanaka, M. Pancreatic ductal adenocarcinoma derived from IPMN and pancreatic ductal adenocarcinoma concomitant with IPMN. *Pancreas.* **40**, 571-80 (2011).
20. Ohtsuka, T., Kono, H., Tanabe, R., Nagayoshi, Y., Mori, Y., Sadakari, Y., Takahata, S., Oda, Y., Aishima, S., Igarashi, H., Ito, T., Ishigami, K., Nakamura, M., Mizumoto, K. & Tanaka, M. Follow-up study after resection of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: special references to the multifocal lesions and development of ductal carcinoma in the remnant pancreas. *Am J Surg.* **204**, 44-48 (2012).
21. Khannoussi, W., Vullierme, M. P., Rebours, V., Maire, F., Hentic, O., Aubert, A., Sauvanet, A., Dokmak, S., Couverlard, A., Hammel. P., Ruszniewski, P. & Levy, P. The long term risk of malignancy in patients with branch duct intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Pancreatology.* **23**, 198-202 (2012).
22. Ohno, E., Itoh, A., Kawashima, H., Ishikawa, T., Matsubara, H., Itoh, Y., Nakamura, T., Hiramatsu, T., Nakamura, M., Miyahara, R., Ohmiya, N., Ishigami, M., Katano, Y., Goto, H. & Hirooka, Y. Malignant transformation of branch duct-type intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas based on contrast-enhanced endoscopic ultrasonography morphological changes: focus on malignant transformation of intraductal papillary mucinous neoplasm itself. *Pancreas.* **41**: 855-862 (2012).
23. Sahora, K., Mino-Kenudson, M., Brugge, W., Thayer, S. P., Ferrone, C. R.,

- Sahani, D., Pitman, M. B., Warshaw, A. L., Lillemoe, K. D. & Fernandez-del Castillo, C. Branch duct intraductal papillary mucinous neoplasms: does cyst size change the tip of the scale? A critical analysis of the revised international consensus guidelines in a large single-institutional series. *Ann Surg.* **258**, 466-475 (2013).
24. He, J., Cameron, J. L., Ahuja, N., Makary, M. A., Hirose, K., Choti, M. A., Schulick, R. D., Hruban, R. H., Pawlik, T. M. & Wolfgang, C. L. Is it necessary to follow patients after resection of a benign pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasm? *J Am Coll Surg.* **216**, 657-665 (2013).
 25. Ohtsuka, T., Ideno, N., Aso, T., Nagayoshi, Y., Kono, H., Mori, Y., Takahata, S., Oda, Y., Aishima, S., Igarashi, H., Ito, T., Ishigami, K., Nakamura, M., Mizumoto, K. & Tanaka, M. Role of endoscopic retrograde pancreatography for early detection of pancreatic ductal adenocarcinoma concomitant with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* **20**, 356-361 (2013).
 26. Tanno, S., Nakano, Y., Koizumi, K., Sugiyama, Y., Nakamura, K., Sasazima, J., Nishikawa, T., Mizukami, Y., Yanagawa, N., Fujii, T., Okumura, T., Obara, T. & Kohgo, Y. Pancreatic ductal adenocarcinomas in long-term follow up patients with branch duct intraductal papillary mucinous neoplasms. *Pancreas.* **39**, 36-40 (2010).
 27. Vege, S. S., Ziring, B., Jain, R. & Moayyedi, P. Clinical Guidelines Committee : American Gastroenterology Association. American gastroenterological association insititute guideline in the diagnosis and management of asymptomatic neoplastic pancreatic cysts. *Gastroenterology.* **148**, 819-822 (2015).
 28. Adsay V, *et al.* Intraductal neoplasms of the pancreas, in Bosman FT, Carnerio F, Hruban RH, et al (eds). "WHO classification of Tumours of the Digestive system", Internationa Agency for Reserech on Cancer, Lyon, 2010, pp394-313.
 29. Adsay, V., Mino-Kenudson, M., Furukawa, T., Bastruk, O., Zamboni, G., Marchegiani, G., Bassi, C., Salvia, R., Malleo, G., Paiella, S., Wolfgang, C. L., Mattaei, H., Offerhaus, G. J., Adham, M., Bruno, M. J., Reid, M. D., Krasinskas, A., Kloppel, G., Ohike, N., Tajiri, T., Jang, K. T., Roa, J. C., Allen, P., Fernandez-del Castillo, C., Jang, J. Y., Klimstra, D. S. &

- Hruban, R. H. Pathologic evaluation and reporting of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and other tumoral intraepithelial neoplasms of pancreatobiliary tract: Recommendations of Verona Consensus Meeting. *Ann Surg.* **263**, 162-77 (2016).
30. Furukawa, T., Takahashi, T., Kobari, M. & Matsuno, S. The mucus-hypersecreting tumor of the pancreas. Development and extension visualized by three-dimensional computerized mapping. *Cancer.* **70**, 1505-1513 (1992).
 31. 山口 浩, 永田耕治, 清水道生. 膵粘液産生性腫瘍の病理診断. *病理と臨床* Vol.27 No.6 (2009).
 32. Patra, K. C., Bardeesy, N. & Mizukami, Y. Diversity of Precursor Lesions For Pancreatic Cancer: The Genetics and Biology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm. *Clin Transl Gastroenterol.* **8**: e86 (2017).
 33. Furukawa, T., Kuboki, Y., Tanji, E., Yoshida, S., Hatori, T., Yamamoto, M., Shibata, N., Shimizu, K., Kamatani, N. & Shiratori, K. Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep.* **1**, 161 (2011).
 34. Kuboki, Y., Shimizu, K., Hatori, T., Yamamoto, M., Shibata, N., Shiratori, K. & Furukawa, T. Molecular biomarkers for progression of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas.* **44**, 227-235 (2015).
 35. Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S. M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R. H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B. & Goggins, M. Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology.* **142**, 730-333 (2012).
 36. Taki, K., Ohmuraya, M., Tajiri, E., Komatsu, H., Hashimoto, D., Semba, K., Araki, K., Kawaguchi, Y., Baba, H. & Furukawa, T. GNAS and Kras cooperate to promote murine pancreatic tumorigenesis recapitulating human intraductal papillary mucinous neoplasm. *Oncogene.* **35**, 2407-2412 (2016).
 37. Waddell, N. *et al.* Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.* **518**, 495-501 (2015).
 38. Furukawa, T., Fujisaki, R., Yoshida, Y., Kanai, N., Sunamura, M., Abe, T., Takeda, K., Matsuno, S. & Horii, A. Distinct progression pathways

- involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol.* **18**, 1034-1042 (2005).
39. Amato, E., Molin, M. D., Mafficini, A., Yu, J., Malleo, G., Rusev, B., Fassan, M., Antonello, D., Sadakari, Y., Castelli, P., Zamboni, G., Maitra, A., Salvia, R., Hruban, R. H., Bassi, C., Capelli, P., Lawlor, R. T., Goggins, M. & Scarpa, A. Targeted next-generation sequencing of cancer genes dissects the molecular profiles of intraductal papillary neoplasms of the pancreas. *J Pathol.* **233**, 217-227 (2014).
 40. Jiang, X., Hao, H. X., Growney, J. D., Woolfenden, S., Bottigilo, C., Ng, N., Lu, B., Hsieh, M. H., Bagdasarian, L., Meyer, R., Smith, T. R., Avello, M., Charlat, O., Xie, Y., Porter, J. A., Pan, S., Liu, J., McLaughlin, M. E. & Cong, F. Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**, 12649-12654 (2013).
 41. Sakamoto, H., Kuboki, Y., Hatori, T., Yamamoto, M., Sugiyama, M., Shibata, N., Shimizu, K., Shiratori, K. & Furukawa, T. Clinicopathological significance of somatic RNF43 mutation and aberrant expression of ring finger protein 43 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol.* **28**, 261-267 (2015).
 42. Basturk, O., Hong, S. M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L. A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Kloppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D.S., Matthaei, H., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., Takatori, K., Terris, B., Yachida, S., Esposito, I. & Furukawa, T. A revised classification system and recommendations from the Baltimore Consensus Meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *Am J Surg Pathol.* **39**, 1730-1741 (2015).
 43. Oshima, M., Okano, K., Muraki, S., Haba, R., Maeba, T., Suzuki, Y. & Yachida, S. Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer. *Ann Surg.* **258**, 336-346 (2013).
 44. Furukawa, T., Kloppel, G., Adsay, V. N., Albores-Saavedra, J., Fukushima, N., Horii, A., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Longnecker, D. S., Luttges, J., Offerhaus, G. J., Shimizu, M., Sunamura,

- M., Suriawinata, A., Takaori, K. & Yonezawa, S. Classification of types of intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas: a consensus study. *Virchows Archiv.* **447**, 794-799 (2005).
45. Munigala, S., Gelrud, A. & Agarwal, B. Risk of pancreatic cancer in patients with pancreatic cyst. *Gastrointest Endosc.* **84**, 81-86 (2016).
 46. Wu, J., Matthaei, H., Maitra, A., Dal Mollin, M., Wood, L. D., Esheman, J. R., Goggins, M., Canto, M. I., Schulick, R. D., Edil, B. H., Wolfgang, C. L., Klein, A. P., Diaz, L. A. Jr, Allen, P. J., Schmidt, C. M., Kinzler, K. W., Papadopoulos, N., Hruban, R. H. & Vogelstein, B. Recurrent GNAS mutations define an unexpected pathway for pancreatic cyst development. *Sci Transl Med.* **3**, 92ra66 (2011).
 47. Tan, M. C., Basturk, O., Brannon, A. R., Bhanot, U., Scott, S. N., Bouvier, N., LeFemina, J., Jarnagin, W. R., Berger, M. F., Klimstra, S. D. & Allen, P. J. GNAS and KRAS mutations define separate progression pathways in intraductal papillary mucinous neoplasm-associated carcinoma. *J Am Coll Surg.* **220**, 845-54 e1 (2015).
 48. Hosoda, W., Sasaki, E., Murakami, Y., Yamao, K., Shimizu, Y. & Yatabe, Y. GNAS mutation is a frequent event in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms and associated adenocarcinomas. *Virchows Arch.* **466**, 665-674 (2015).
 49. Tamura, K., Ohtsuka, T., Date, K., Fujimoto, T., Matsunaga, T., Kimura, H., Watanabe, Y., Miyazaki, T., Ohuchida, K., Takahata, S., Ishigami, I., Oda, Y., Mizumoto, K., Nakamura, M. & Tanaka, M. Distinction of invasive carcinoma derived from intraductal papillary mucinous neoplasms from concomitant ductal adenocarcinoma of the pancreas using molecular biomarkers. *Pancreas.* **45**, 826-835 (2015).
 50. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature.* **531**, 47-52 (2016).
 51. Ideno, N., Ohtsuka, T., Matsunaga, T., Kimura, H., Watanabe, Y., Tamura, K., Aso, T., Aishima, S., Miyasaka, Y., Ohuchida, K., Ueda, J., Takahata, S., Oda, Y., Mizumoto, K. & Tanaka, M. Clinical significance of GNAS mutation in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas with concomitant pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas.* **44**, 311-320 (2015).
 52. Tampakis, A., Tampaki, E. C., Posabella, A., Zettl, A., Kourakilis, G., von

- Flue, M. & Guenin, M. O. KRAS Mutations with no GNAS mutations in an intraductal papillary mucinous neoplasm: are there common pathways with pancreatic ductal adenocarcinoma? Lessons from an extended IPMN, covering the entire pancreas. *Pancreas*. **46**, e5-e7 (2017).
53. Furukawa, T., Hatori, T., Fujita, I., Yamamoto, M., Kobayasi, M., Ohike, N., Morohoshi, T., Egawa, S., Unno, M., Takao, S., Osako, M., Yonezawa, S., Mino-Kenudson, M., Lauwers, G. Y., Yamaguchi, H., Ban, S. & Shimizu, M. Prognostic relevance of morphological types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gut*. **60**, 509-516 (2011).
 54. Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., Yeo, C. J. & Hruban, R. H. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol*. **16**, 902-912 (2003).
 55. Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., Rustgi, A. K., Chang, S. & Tuveson, D. A. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*. **7**, 469-483 (2005).
 56. Karasaki, H., Mizukami, Y., Tokusashi, Y., Koizumi, K., Ishizaki, A., Imai, K., Yoshikawa, D., Kino, S., Sasazima, J., Tanno, S., Matsumoto, K., Miyokawa, N., Kono, T., Kohgo, Y. & Furukawa, H. Localization of the most severely dysplastic/invasive lesions and mucin phenotypes in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas*. **40**, 588-594 (2011).
 57. Pea, A., Yu, J., Rezaee, N., Luchini, C., He, J., Dal Molin, M., Griffin, J. F., Fedor, H., Fesharakizadeh, S., Salvia, R., Weiss, M. J., Bassi, C., Cameron, J. L., Zheng, L., Scarpa, A., Hruban, R. H., Lennon, A. M., Goggins, M., Wolfgang, C. L. & Wood, L. D. Targeted DNA sequencing reveals patterns of local progression in the pancreatic remnant following resection of intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas. *Ann Surg*. **266**, 133-141 (2017).
 58. Matthaei, H., Wu, J., Dal Molin, M., Shi, C., Perner, S., Kristiansen, G., Lingohr, P., Kalff, J. C., Wolfgang, C. L., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Maitra, A. & Hruban, R. H. GNAS sequencing identifies IPMN-specific

- mutations in a subgroup of diminutive pancreatic cysts referred to as "incipient IPMNs". *Am J Surg Pathol.* **38**, 360-363 (2014).
59. Notta, F. *et al.* A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature.* **538**, 378-82 (2016).
 60. Kanda, M., Knight, S., Topazian, M., Syngal, S., Farrell, J., Lee, J., Kamel, I., Lennon, A. M., Borges, M., Young, A., Fujiwara, S., Sekine, J., Eshleman, J., Hruban, R. H., Canto, M. I. & Goggins, M. Mutant GNAS detected in duodenal collections of secretin-stimulated pancreatic juice indicates the presence or emergence of pancreatic cysts. *Gut.* **62**, 1024-1033 (2013).
 61. Kanda, M., Sadakary, Y., Borges, M., Topazian, M., Farrell, J., Syngal, S., Kamel, I., Lennon, A. M., Knight, S., Fujiwara, S., Hruban, R. H., Canto, M. I. & Goggins, M. Mutant TP53 in duodenal samples of pancreatic juice from patients with pancreatic cancer or high-grade dysplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* **11**, 719-730 (2013).
 62. Berger, A.W., Schwerdel, D., Costa, I. G., Hackert, T., Strobel, O., Lam, S., Barth, T. F., Schroppel, B., Meining, A., Buchler, M. W., Zenke, M., Hermann, P. C., Seufferlein, T. & Kleger, A. Detection of hot-spot mutations in circulating cell-free DNA from patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gastroenterology.* **151**, 267-270 (2016).
 63. Lakatos, E. Sample sizes based on the log-rank statistic in complex clinical trials. *Biometrics.* **44**, 229-241 (1988).
 64. Hayashi, H., Kohno, T., Ueno, H., Hiraoka, N., Kondo, S., Saito, M., Shimada, Y., Ichikawa, H., Kato, M., Shibata, T., Morizane, C., Sakamoto, Y., Shimada, K., Komatsu, Y., Sakamoto, N. & Okusaka, T. Utility of Assessing the Number of Mutated KRAS, CDKN2A, TP53, and SMAD4 Genes Using a Targeted Deep Sequencing Assay as a Prognostic Biomarker for Pancreatic Cancer. *Pancreas.* **46**, 335-340 (2017).
 65. Yu, J., Sadakari, Y., Shindo, K., Suenaga, M., Brant, A., Alejandro, J., Almario, N., Borges, M., Barkley, T., Fesharakizadeh, S., Ford, M., Hruban, R. H., Shin, E. J., Lennon, A. M., Canto, M. I. & Michael 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**, 1677–1687 (2017).
66. Ono, Y., Sugitani, A., Karasaki, H., Ogata, M., Nozaki, R., Sasajima, J., Yokochi, T., Asahara, S., Koizumi, K., Ando, K., Hironaka, K., Daito, T. & Mizukami, Y. An improved digital polymerase chain reaction protocol to capture low-copy KRAS mutations in plasma cell-free DNA by resolving 'subsampling' issues. *Mol Oncol*. **11**, 1448-1458 (2017).
67. Kobel, M., Piskorz, A. M., Lee, S., Lui, S., LePage, C., Marass, F., Rosenfeld, N., Mes Masson, A. M. & Brenton, J. D. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Path Clin Res*. **2**, 247–258 (2016).