



Title	膵管/胆管狭窄病変の診断ための膵液および胆汁中cell-free DNAを用いたliquid biopsyに関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	永井, 孝輔
Description	配架番号 : 2774
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15458号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90001
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NAGAI_Kosuke_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 永井 孝輔

学位論文題名

膵管/胆管狭窄病変の診断のための膵液および胆汁中 cell-free DNA を用いた liquid biopsy に関する研究
(Genetic analyses of cell-free DNA in pancreatic juice or bile for diagnosing pancreatic duct and biliary tract strictures)

【背景と目的】

膵臓癌および胆道癌の5年生存率は、30%以下と癌疾患の中で特に予後不良である。いずれも早期発見が困難であり、診断時には切除不能であることが多いため、有効な早期診断法の開発が急務である。膵・胆道癌はともに膵管狭窄や胆道狭窄を伴うことが多いが、それらをきたす良性疾患も存在し、時に良悪性の診断に難渋する。膵臓癌および胆道癌の診断法には、内視鏡的逆行性胆管膵管造影法 (ERCP) を用いた膵管や胆道狭窄部の鉗子生検、ブラシ擦過細胞診、膵液・胆汁の細胞診がある。しかし、いずれも感度は高くはなく、診断能の向上には遺伝子的・分子生物学的な補助診断ツールが不可欠である。近年、血漿中の cell-free DNA (cfDNA) や循環腫瘍 DNA を抽出し、高性能遺伝子解析装置を用いて遺伝子解析を行う liquid biopsy が広まり、臨床の現場でも用いられている。膵・胆道癌においては、腫瘍が直接暴露している膵液や胆汁中には血中よりも多くの腫瘍由来の cfDNA が含まれていることが予想される。本研究では、膵液および胆汁中の cfDNA を抽出、解析し、膵液および胆汁 liquid biopsy による膵・胆道癌の診断能を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

2020年10月から2022年2月の間、当院において膵管および胆管狭窄病変に対して診断・治療目的に ERCP を行った患者 50 人を対象とした。ERCP 時もしくは内視鏡的経鼻膵管・胆管ドレナージチューブを介して採取した膵液、胆汁から cfDNA を抽出し、適切な処理を行ったのちに、50 の癌遺伝子パネルと高性能遺伝子解析装置を用いて遺伝子解析を行った。本研究では外科的切除標本（非切除例では ERCP 時の病理学的診断、もしくは6ヶ月以上の臨床経過）による悪性診断を基準とした。膵液、胆汁中の cfDNA 解析により遺伝子パネル上の遺伝子変異が1つ以上検出された場合を膵液および胆汁 liquid biopsy 陽性と定義し、liquid biopsy の診断能（感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率）を評価した。また、膵液/胆汁/ブラシ擦過細胞診の診断能との比較を行った。

【結果】

膵液 cfDNA の解析群を膵液群、胆汁 cfDNA の解析群を胆汁群とし、膵液群は10例、胆汁群は40例であった。50例すべてで cfDNA 抽出に成功し、遺伝子解析が可能であった。

膵液群：年齢中央値は65.5歳、性別は男性7例、女性3例であった。膵疾患の内訳は膵臓癌1例、膵上皮内腫瘍2例、膵管内乳頭粘液性腫瘍2例、慢性膵炎4例、診断不能が1例であった。膵液中の cfDNA 濃度は0.8~37ng/μl で、膵臓癌、膵上皮内腫瘍、慢性膵炎症例よりも膵管内乳頭粘液性腫瘍例で cfDNA 濃度は高かった。遺伝子解析では膵臓癌の1例のみ *KRAS* 変異が同定された。膵液細胞診は8例で実施されたがいずれも陰性であった。膵液 liquid biopsy の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率はそれぞれ33%、100%、100%、71.4%、細胞診においてはそれぞれ0%、100%、0%、62.5%であった。感度および特異度は liquid biopsy と細胞診の間に有意な差はなかった。

胆汁群：年齢中央値は69.5歳で性別は男性28例、女性12例であった。疾患の内訳は、悪性：肝門

部胆管癌 16 例, 遠位胆管癌 8 例, 膵臓癌 5 例, 肝内胆管癌 2 例, 胆嚢癌 1 例, 良性: 総胆管結石 4 例, IgG4 関連硬化性胆管炎 2 例, 慢性膵炎 1 例, 診断不能が 1 例であった. 胆汁中 cfDNA は膵液中 cfDNA と比較して高濃度であったが, 胆汁群において各疾患毎の濃度比較では明らかな差はなかった($p = 0.419$). 遺伝子変異は 40 症例中 19 例で確認され, 悪性疾患 32 例中 17 例で確認できた. 悪性疾患で同定された遺伝子変異の内訳は *TP53* (9/32), *KRAS* (7/32), *CDKN2A* (4/32), *SMAD4* (2/32), *APC* (2/32), *BRAF* (1/32), *FGFR1* (1/32), *PTPN11* (1/32), *CDH1* (1/32), *MET* (1/32), *NRAS* (1/32), *PIC3CA* (1/32) であった. また良性疾患で 8 例中 2 例に遺伝子変異が認められ, *TP53* (2/8), *CDH1* (1/8) の変異が検出された. 胆汁 liquid biopsy の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率はそれぞれ 53%, 75%, 89.5%, 28.6% であり, 胆汁細胞診(30 例)のそれらは, 19%, 100%, 100%, 16% であった. 胆汁 liquid biopsy の感度は細胞診よりも有意に高かった($p = 0.016$)が, 特異度に有意差は認めなかった($p = 0.48$).

【考察】

膵液/胆汁からの cfDNA の抽出と cfDNA の profile 解析が可能であった. 主要評価項目である膵液/胆汁 liquid biopsy 診断能は, 細胞診と同等以上であり (膵液: 33% vs 0%, 胆汁: 53% vs 19%), 膵液/胆汁細胞診の補助的診断ツールとなりうることを実証された. 膵液群では膵臓癌の前癌病変である膵上皮内腫瘍で遺伝子変異を検出することができなかった. 膵上皮内腫瘍から膵臓癌への進行は, *KRAS* 遺伝子などが段階的に関与しているため, これらの遺伝子変異を含む cfDNA は膵液中に存在するはずであるが, 遺伝子解析装置の変異アレル頻度の検出限界が 2% であったことも一因と考えられる. 胆汁群においては, 良性疾患の 2 例において遺伝子変異が確認された. 初期の病理学的診断で良性でありながら遺伝子変異を認め, 長期経過後に悪性化した報告もあることから, 十分注意を払う必要があると共に, 良性疾患における遺伝子変異の有無は, 将来的な癌発症予測の一助となる可能性も示唆された. また, 胆汁群において, 肝内胆管癌および胆嚢癌では遺伝子変異を検出することができなかったが, こちらも変異アレル頻度の検出限界によるものと考えられる.

【結論】

膵管/胆管狭窄病変の診断において, 膵液および胆汁 liquid biopsy は細胞診の補助的診断ツールとなり, 診断能の向上に寄与する.