



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
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15458">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15458</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/90043">https://hdl.handle.net/2115/90043</a>
Type	doctoral thesis
File Information	NAGAI_Kosuke.pdf



# 学位論文

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)

2023 年 3 月

北海道大学

永井 孝輔



# 学位論文

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

(Genetic analyses of cell-free DNA in pancreatic  
juice or bile for diagnosing pancreatic duct and  
biliary tract strictures)

2023 年 3 月

北海道大学

永井 孝輔

# 目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	4 頁
緒言	5 頁
方法	8 頁
結果	13 頁
考察	26 頁
結論	29 頁
謝辞	30 頁
利益相反	31 頁
引用文献	32 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Kosuke Nagai, Masaki Kuwatani, Koji Hirata, Goki Suda, Hajime Hirata,  
Yunosuke Takishin, Ryutaro Furukawa, Kazuma Kishi, Hiroki Yonemura,  
Shunichiro Nozawa, Ryo Sugiura, Kazumichi Kawakubo and Naoya  
Sakamoto

Genetic analyses of cell-free DNA in pancreatic juice or bile for diagnosing  
pancreatic duct and biliary tract strictures.

Diagnostics, 12(11), 2704 (2022 年 11 月 5 日 掲載)

## 要旨

### 【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 33.3%，100%，100%，77.8%，細胞診においてはそれぞれ 0%，100%，0%，62.5%であった。

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 53.1%，75%，89.5%，28.6%であり，胆汁細胞診 (30 例)のそれらは，19.2%，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が一因と考えられる。

#### 【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。

## 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.

CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonic antigen
cfDNA	Cell-free deoxyribonucleic acid
CP	Chronic pancreatitis
CT	Computed tomography
Chr	Chromosome
DNA	Deoxyribonucleic acid
dEHCC	Distal extrahepatic cholangiocarcinoma
ENPD/ENBD	Endoscopic nasal pancreatic/biliary drainage tube
ERCP	Endoscopic retrograde cholangiopancreatography
EUS-FNA	Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration
GBC	Gallbladder carcinoma
gDNA	Genomic DNA
IHCC	Intrahepatic cholangiocarcinoma
INDEL	Insertion & Deletion
IPMN	Intraductal papillary mucinous neoplasm
IgG4-SC	IgG4-related sclerosing cholangitis
MAF	Mutant allele frequency
MRCP	Magnetic resonance cholangiopancreatography
MRI	Magnetic resonance imaging
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasm
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
pEHCC	Perihilar extrahepatic cholangiocarcinoma
SNV	Single nucleotide variant
stone	Bile duct stone
UICC	Union for International Cancer Control

## 緒言

膵臓癌および乳頭部癌，胆管癌，胆嚢癌を含む胆道癌は悪性度が高く，その5年生存率は30%以下で他の癌種と比較して極めて低い (Mizrahi et al., 2020; Valle et al., 2021). 外科的切除が唯一根治のための治療法であるが，膵・胆道癌の患者の多くは診断時にはすでに切除不能な状態であることが多い (Groot et al., 2017; Endo et al., 2008). この原因は，生物学的な浸潤性の高さだけでなく，臨床症状の乏しさや有用な早期診断法の欠如が挙げられる (Kleeff et al., 2016; Khan et al., 2012). 膵・胆道癌ともに膵管狭窄，胆管狭窄を伴うことが多いが，IgG4 関連硬化性胆管炎や自己免疫性膵炎，慢性膵炎，胆石性胆管炎などの良性疾患も同様の狭窄を引き起こすため，時に良悪性の診断に難渋する。

腫瘍を形成する膵胆道疾患に対しては，超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引法 (endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration: EUS-FNA) が行われ，感度，特異度ともに90%以上と良好な診断能が報告されている (Eloubeidi et al., 2003). 一方，腫瘍形成を伴わない膵管や胆管の狭窄のみを示す膵胆道疾患の診断は，従来，内視鏡的逆行性胆管膵管造影法 (endoscopic retrograde cholangiopancreatography: ERCP) 下で鉗子生検と胆汁・膵液・ブラシ擦過細胞診が行われてきた。しかし，ERCPによる悪性腫瘍の検出感度は30%~70%で，診断能は十分ではない (Burnett et al., 2013; Navaneethan et al., 2015; Hatfield et al., 1976; Kameya et al., 1981; Goodale et al., 1981; Nakaizumi et al., 1992). そのため，確定診断のために ERCP を繰り返し行うことによる治療の遅れや，良悪性の診断がつかないまま不必要な手術を行ってしまうことも生じる。

近年，血液などの体液中に遊離した細胞の DNA (cell-free DNA: cfDNA) を解析する，liquid biopsy と呼ばれる新しい診断法 (Gormally et al., 2007; Ignatiadis et al., 2021) の開発が進んでいる。特に癌領域においては，腫瘍細胞のアポトーシスやネクローシスを通じて体液中に流出した腫瘍由来の DNA を解析し，この cfDNA をバイオマーカーとして利用する動きが広がっている (Schwarzenbach et al., 2011). これは腫瘍由来の cfDNA は半減期が1時間程度と非常に短いため，腫瘍マーカーと比較して腫瘍の短時間の状況を鋭敏に反映していると考えられているためである (Lo et al., 2021). 現に非小細胞肺癌における *EGFR T790M* 変異検査では，liquid biopsy による感度が組織検体の感度に比べて高いことが報告されており (Mok et al., 2017)，今後，肺癌領域では血漿サンプルによる遺伝子変異検査が実用化されていくことが予想される。さらに唾液，胸水，尿などの液性検体を使用した liquid biopsy も行われつつある。このようにあらゆる分野で liquid biopsy による cfDNA の遺伝子異常の解析が

進み、手術検体や生検検体の代用となることが期待されているが、膵・胆道癌領域における血中 cfDNA の有用性の報告は限られている (Molina et al., 2015; Hadano et al., 2016).

ERCP は膵・胆道癌に対する診断のためだけではなく、膵管、胆道閉塞に対する治療のためにも行われ、術中に膵液や胆汁を容易に採取することが可能である(図 1). 理論的には、膵・胆道癌の症例では腫瘍細胞が膵液や胆汁に直接暴露しているため、cfDNA, エクソソーム, メタボロームなどの腫瘍由来の物質が豊富に存在すると考えられる. したがって、膵液および胆汁は liquid biopsy の材料として有用であり、膵液および胆汁中 cfDNA 解析は膵・胆道癌の新たな診断ツールとなりうると考えた.

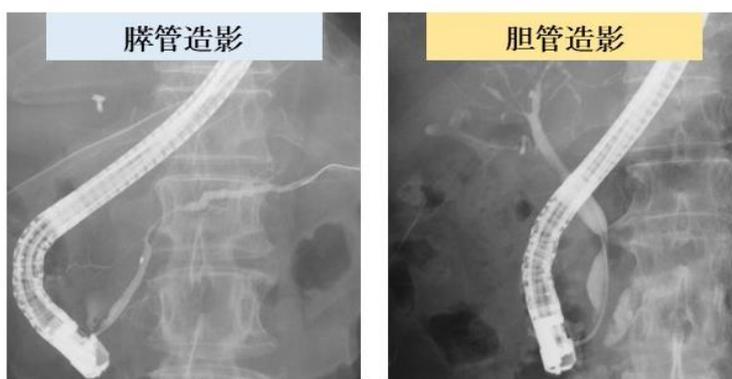


図 1. ERCP における膵管造影および胆管造影

ERCP における膵管造影および胆管造影.

診断だけでなく閉塞に対するドレナージ目的にも行い、処置中に膵液や胆汁を回収することができる.

膵臓癌や胆道癌の手術検体を用いた遺伝子変異のプロファイリングについては、多くの先行研究があり、膵臓癌では *KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*, 胆道癌では *TP53*, *KRAS*, *SMAD4*, *EGFR*, *ARID1* などが重要なドライバー遺伝子であることが知られている (Waddell et al., 2015; Nakamura et al., 2015). 膵・胆道癌において、膵液および胆汁中に含まれる cfDNA の診断能・予後との関連性を評価した研究は極めて少ないが、それらの先行研究では悪性疾患の診断向上の可能性が報告された (Mateos et al., 2019; Okada et al., 2018; Kinugasa et al., 2018; Shen et al., 2019; Driescher et al., 2019; Han et al., 2021; Arechederra et al., 2022). Mateos らは、膵管内乳頭粘液性腫瘍に由来す

る膵臓癌患者の膵液中 cfDNA を用いて、*TP53/KRAS* 変異を検出できることを報告した (Mateos et al., 2019). Arechederra らは、次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) による胆汁中 cfDNA 解析で悪性腫瘍の検出感度が 96.4%であったことを報告した. さらに初期病理診断で良性胆管狭窄とされた症例中、胆汁中 cfDNA の遺伝子変異を認めた症例すべてが、長期経過観察中に悪性の病理診断 (感度 100%) となったことを示した (Arechederra et al., 2022).

以上より、膵・胆道癌において膵液および胆汁中の cfDNA はより鋭敏に腫瘍の状態を反映していると考えられる. 本研究では、膵・胆管狭窄病変を有する症例において、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.

## 方法

### 1. 試験デザイン

単施設による前向き観察研究であり、UMIN 臨床試験登録システムに登録を行った(UMIN000044036).

### 2. 対象患者

2020年10月から2022年2月までの間に、北海道大学病院消化器内科を受診した患者のうち膵管狭窄もしくは胆道狭窄を認め、ERCPによる診療を必要とする者を対象とした。適格基準は、1) 腹部超音波検査や腹部CT検査、磁気共鳴胆管膵管造影法(magnetic resonance cholangiopancreatography: MRCP)などの画像検査から膵管、胆道狭窄を有する、2) 20歳以上、3) 本研究の趣旨について同意が得られていること、とした。除外基準は、1)解析のための十分な膵液、あるいは胆汁サンプル量が得られない、2)「東京ガイドライン 2018: 急性胆管炎・胆嚢炎診療ガイドライン 2018」における急性胆管炎診断基準で確診と診断されたもの、3) 研究担当者が研究対象者として不相当と判断した者、とした。

なお、本研究は「ヘルシンキ宣言 (2013年10月修正版)」及び「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針 (平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)」を遵守して実施された。また、あらかじめ臨床研究実施計画書と患者説明同意文書を北海道大学病院長へ提出し、研究の実施に関して自主臨床研究審査委員会による承認および研究機関の長の許可を得て行われた(自主臨床研究番号: 自020-0133)。研究担当者は、審査委員会で承認の得られた同意説明文書を研究対象者に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、研究対象者の自由意思による同意を文書で取得した。

### 3. ERCPから解析までの work flow

解析までの work flow を図2に示す。本研究では生殖細胞変異を除外するため、コントロールとして同一患者から末梢血も採取し genomic DNA (gDNA) の解析も同時に行った。

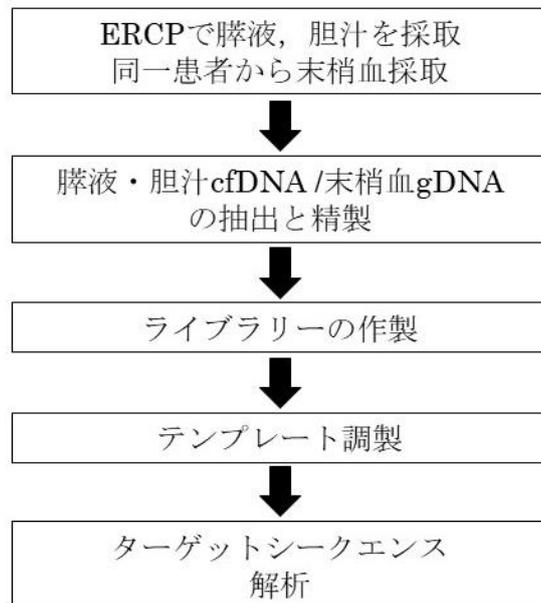


図 2. 本研究の work flow.

### 3.1. ERCP の手順とサンプルの回収

ERCP は十二指腸用スコープである後方斜視鏡 (TJF260V, Olympus Medical Systems, Tokyo, Japan) を用いて, ミダゾラムによる鎮静とフェンタニルによる鎮痛の下に行った. ERCP 用の造影カテーテル (MTW Endoskopie Manufaktur, Germany) と任意の 0.025 inch もしくは 0.035 inch のガイドワイヤーを用いて病変のある膵管もしくは胆管に挿管し, カテーテルを挿入した. カテーテル挿入後に 2ml 以上の膵液または胆汁をカテーテルを介して 10ml シリンジで吸引し, 直ちに cfDNA 抽出用スピッツ (Roche Diagnostics K.K., Basel, Switzerland) に入れて冷蔵保存 (4°C) した. また, 細胞診用にも数 ml 回収し, 滅菌コニカルチューブ (MIC SCIENCE Ltd., Sapporo, Japan) に保存し, 病理検査に提出した. サンプルを回収したのちに専用の造影剤(ウログラフィン®, BAYER, Germany)を用いて膵管, あるいは胆管造影を行い目的の処置を遂行した. 最終的に内視鏡的経鼻膵管・胆道ドレナージチューブ (endoscopic nasal pancreatic/biliary drainage tube: ENPD/ENBD) を留置した症例ではそのチューブを介して 10ml シリンジで膵液, 胆汁の回収を行った.

### 3.2. cfDNA/gDNA の抽出と精製

cfDNA 抽出用スピッツに保存した膵液, 胆汁は検体採取後 2 時間以内に消化器内科学研究室にある遠心分離機で 1,600×g, 室温 (22–24°C) の設定で 15 分

間遠心分離を行った。15分後に上清 1.5ml を 2ml チューブ (Eppendorf) に移し、さらに 16,000×g、室温 (22–24°C) の設定で 10 分間遠心分離を行った。遠心分離後、すべてのサンプルは抽出までの間–80°C で保存した。cfDNA の抽出は Cobas<sup>®</sup> cfDNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics K.K.) を用いて抽出し、cfDNA の濃度は Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay kit (Life Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) で測定し、cfDNA の断片長は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) を用いて分析した。精製は AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) と 70% エタノールで行った。血漿 gDNA は All-Prep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて末梢血サンプルから抽出し、同様に精製した。

### 3.3 cfDNA/gDNA ライブラリーの作製

上記にて精製した DNA を単離、断片化および終端修復を行い、テンプレート調製、シーケンシングに使用するアダプターと共有結合させ、最適なサイズの DNA 断片を選択する工程としてライブラリー調製を行った。ライブラリーは Ion AmpliSeq<sup>™</sup> Library Kit 2.0 (Life Technologies) および癌体細胞変異データベースにおいて、癌との関連性が特定されている 50 個のホットスポット領域中の癌関連遺伝子の変異約 2,800 箇所を標的とした Ion Ampliseq<sup>™</sup> Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies) を用いて調製した。その 50 個の関連遺伝子を以下に示す。

*KRAS, NRAS, TP53, BRAF, FGFR1, FGFR2, FGFR3, IDH1, IDH2, SMAD4, EGFR, PIK3CA, CDKN2A, HRAS, ATM, RET, PTEN, PTPN11, HNF1A, FLT3, RB1, AKT1, CDH1, ERBB2, ERBB4, STK11, JAK2, JAK3, ALK, SRC, GNAS, SMARCB1, VHL, MLH1, CTNNB1, PDGFRA, KIT, KDR, FBXW7, APC, CSF1R, NPM1, MPL, MET, SMO, ABL1, NOTCH1, EZH2, GNA11, GNAQ.*

### 3.4 テンプレート調製

調製したライブラリーをサンプル毎に 100pmol/L に調製し、Ion Personal Genome Machine<sup>™</sup> Template OT2 200kit (Life Technologies) を使用して、エマルジョン PCR を行い、DNA サンプルの増幅を行った。その後、Ion OneTouch<sup>™</sup> ES (Life Technologies) を用いて濃縮した。

### 3.5 ターゲットシーケンスおよび解析

濃縮したテンプレートを Ion 318<sup>™</sup> Chip Kit V2 BC にローディングし、Ion

Personal Genome Machine System™ (Life Technologies) を用いて、メーカーのプロトコールに従ってターゲットシーケンスを行った。ターゲットシーケンスを行うために、ヒトゲノムリファレンス配列である human genome build 19 を使用した。Ion Torrent Suite v5.6 Software (Life Technologies) でシーケンスした配列を並べ (アライメント)、リファレンスと異なる配列部分を検索 (バリエーションコール) し、遺伝子変異のある部分の意義付けをおよび評価 (アノテーション) を行った。癌体細胞変異の解析には、AmpliSeq target-blood pair workflow を使用した。この AmpliSeq target-blood pair workflow は、シーケンスノイズを最小限に抑え、より正確に病原性の遺伝子変異を同定するために有用とされており、遺伝子に体細胞性もしくは生殖細胞性の変化があるかどうかを識別するのにも有効である (Saunders et al., 2012)。本研究では体細胞変異として一塩基変異 (single nucleotide variant: SNV) と塩基配列の挿入もしくは欠失 (INDEL: insertion & delete) を検索した。一般的な一塩基多型やリファレンスアレルなど表現型に意義のないもの、変異アレル頻度が 2%未満のもの (Life Technologies のプロトコールで推奨) は検索フィルターであらかじめ設定し、除外した。フィルターの閾値は、検索領域の 99%をカバーしているとされている。

#### 4. 悪性腫瘍/良性疾患の定義

最終診断は、病理専門医による EUS-FNA、鉗子生検検体を用いた病理学的評価、切除標本の病理学的評価に基づいた悪性所見、または 6 ヶ月以上の観察期間中における CT や腹部超音波検査などの画像所見と臨床経過による明らかな増悪、とした。良性疾患は病理学的評価および「慢性膵炎診断基準 2019」, 「IgG4 関連硬化性胆管炎臨床診断基準 2020」等、最新のガイドラインに従い、診断記事準を満たしたものを最終診断とした。膵臓癌では、*KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A* の変異が高率に発生する (Waddell et al., 2015) ため、膵液/胆汁中 cfDNA 解析でこれらの 4 つの遺伝子変異を 1 つ以上認めた場合を悪性腫瘍(膵液/胆汁 liquid biopsy 陽性)と定義した。胆道癌では胆道部位ごとに *EGFR2*, *IDH1/2*, *PRKACA/PRKACB*, *EGFR*, *PTEN* など多くのドライバー遺伝子が報告されている (Nakamura et al., 2015)。そこで、上述の 50 の遺伝子パネルのうち 1 つ以上の遺伝子変異がある場合を悪性腫瘍 (膵液/胆汁 liquid biopsy 陽性)とした。遺伝子変異が検出されない場合は良性 (膵液/胆汁 liquid biopsy 陰性)と定義した。また、膵液および胆汁細胞診の評価は病理専門医によって行った。

#### 5. 評価項目

主要評価項目は悪性腫瘍における膵液、胆汁 liquid biopsy の感度、特異度、

陽性的中率, 陰性的中率とした. 副次評価項目は, 疾患別の膵液, 胆汁中 cfDNA の profile, 膵液/胆汁 liquid biopsy と膵液/胆汁細胞診の成績の比較, 遺伝子変異の内訳とした.

## 6. 症例設定数

当院の年間の新規の膵管および胆道疾患に対する ERCP の件数はそれぞれ平均 10 例, 40 例であるため, 解析期間も含め解析可能症例数として合計 50 例と設定した.

## 7. 統計解析

統計解析にはフリーソフト EZR (<https://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html>) (Ver1.40 May 1, 2019) (Kanda et al., 2012)を用いた. 2 群間の中央値の比較に Mann - Whitney U test, 3 群以上の中央値の比較に Kruskal Wallis test, 感度と特異度の比較には McNemar's test を用いた.  $P$ 値が 0.05 未満の場合に統計学的に有意であると判断した.

## 結果

### 1. 患者背景

膵液 cfDNA 解析群を膵液群, 胆汁 cfDNA 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.

#### 1.1. 患者背景 (膵液群 10 例)

膵液群の患者背景を表 1 に示す. 年齢中央値は 65.5 歳 (範囲 47-80 歳), 男性 7 例 (70%), 女性 3 例 (30%) であった. 膵疾患の最終診断の内訳は, 膵臓癌 1 例 (10%), high grade の膵上皮内腫瘍 2 例 (20%), low grade の膵管内乳頭粘液性腫瘍 2 例 (20%), 慢性膵炎 4 例 (40%), 診断不能が 1 例 (10%) であった. 診断不能の症例は細胞診でも診断がつかず, CT や MRI といった画像での経過観察でも変化がないものであったため診断不能とした. 10 例のうち悪性腫瘍は 3 例 (30%; 膵臓癌 1 例, 膵上皮内腫瘍 2 例) であり, The Union for International Cancer Control (UICC) 第 8 版による病期分類では膵臓癌は I 期, 膵上皮内腫瘍は 2 例とも 0 期であった. ERCP 施行時の腫瘍マーカーは CEA 中央値 2.9 ng/ml (範囲 1.8-3.5 ng/ml), CA19-9 中央値 5.5 U/ml (範囲 2.9-37.4 U/ml) であった.

表 1. 患者背景 (膵液群)

患者背景	対象患者 10 例
年齢, 中央値 (範囲)	65.5 歳 (47-80)
性別, n (%)	
男性	7 例 (70%)
女性	3 例 (30%)
膵疾患内訳, n (%)	
<b>悪性疾患</b>	
膵臓癌	1 例 (10%)
膵上皮内腫瘍 (high grade)	2 例 (20%)
<b>良性疾患</b>	
膵管内乳頭粘液性腫瘍 (low grade)	2 例 (20%)
慢性膵炎	4 例 (40%)
診断不能	1 例 (10%)
悪性腫瘍における UICC 病期分類, n (%)	
0	2 例 (67%)
I	1 例 (33%)

ERCP 施行時の腫瘍マーカー中央値 CEA,中央値 (範囲) CA19-9, 中央値 (範囲)	2.9 ng/mL (1.8–3.5) 5.5 U/mL (2.9–37.4)
--	--

## 1.2 患者背景 (胆汁群 40 例)

胆汁群の患者背景を表 2 に示す. 年齢中央値は 69.5 歳 (範囲 35-85 歳), 男性 28 例 (70%), 女性 12 例 (30%) であった. 膵胆道疾患の最終診断の内訳は, 悪性疾患が肝門部胆管癌 16 例 (40%), 遠位胆管癌 8 例 (20%), 膵臓癌 5 例 (20%), 肝内胆管癌 2 例 (5%), 胆嚢癌 1 例 (2.5%), 良性胆道疾患が総胆管結石 4 例 (10%), IgG4 関連硬化性胆管炎 2 例, 慢性膵炎による胆管狭窄 1 例 (2.5%), 診断不能が 1 例 (2.5%) であった. 膵臓癌は胆道狭窄を来した症例であった. 診断不能症例は生検や細胞診でも診断つかず, CT や MRI といった画像での経過観察でも変化がないものであったため診断不能とした. 悪性疾患は 32 例であり, UICC 第 8 版の病期分類は I 期 5 例 (15.6%), II 期 14 例 (43.7%), III 期 6 例 (18.8%), IV 期 7 例 (21.9%) であった. また, 黄疸 (総ビリルビン値が 2mg/dl 以上)を認めたものは 19 例 (48%)であった. ERCP 施行時の腫瘍マーカーは CEA 中央値 3.1 ng/ml (範囲 1.8-541.2 ng/ml), CA19-9 中央値 53.8 U/ml (範囲 2.9-70,632 U/ml) であった.

表 2. 患者背景 (胆汁群)

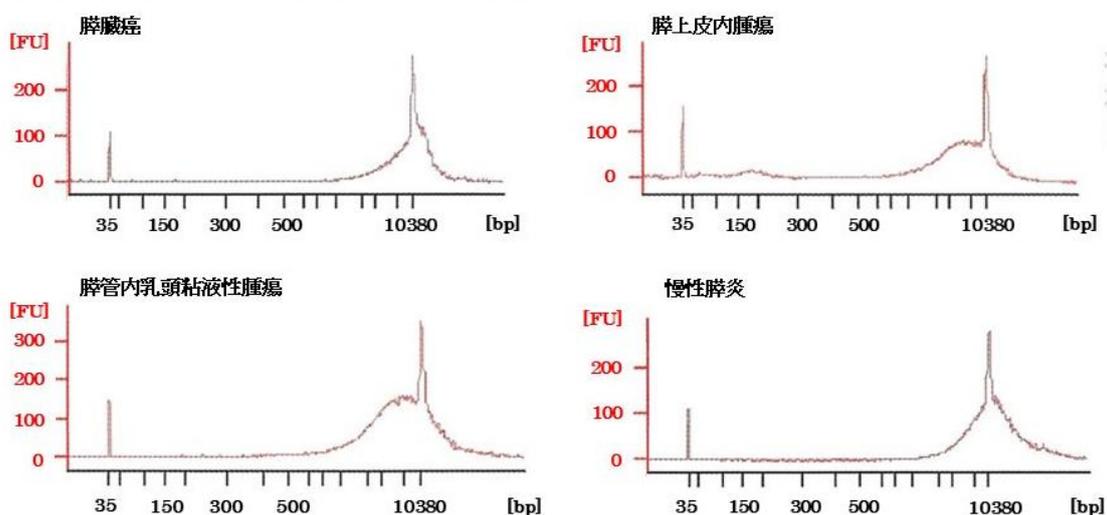
患者背景	対象患者 40 例
年齢, 中央値(範囲)	69.5 歳 (35–85)
性別, n(%)	
男性	28 例 (70%)
女性	12 例 (30%)
膵胆道疾患内訳, n (%)	
<b>悪性疾患</b>	
肝門部胆管癌	16 例 (40%)
遠位胆管癌	8 例 (20%)
膵臓癌	5 例 (13%)
肝内胆管癌	2 例 (5%)
胆嚢癌	1 例 (2.5%)
<b>良性疾患</b>	
総胆管結石	4 例 (10%)
IgG4 関連硬化性胆管炎	2 例 (5%)
慢性膵炎	1 例 (2.5%)
診断不能	

	1例 (2.5%)
悪性腫瘍における UICC 病期分類, n (%)	
I	5例 (15.6%)
II	14例 (43.7%)
III	6例 (18.8%)
IV	7例 (21.9%)
黄疸(総ビリルビン > 2 mg/dl), n (%)	
あり	19例 (48%)
なし	21例 (52%)
ERCP 施行時の腫瘍マーカー中央値	
CEA, 中央値 (範囲)	3.1 ng/mL (1.8–541.2)
CA19-9, 中央値 (範囲)	53.8 U/mL (2.4–70,632)

## 2. 膵液と胆汁中の cfDNA 断片長分布と cfDNA 濃度

図 3 に各疾患ごとの代表的な cfDNA 断片長のエレクトロフェログラムを示す。本研究では良悪性を問わずにどの疾患のサンプルも同様の cfDNA 断片長分布を示し、約 8000-10000 bp の断片長を有していた (図 1)。

膵液群：各疾患における cfDNA断片長



胆汁群：各疾患におけるcfDNA断片長

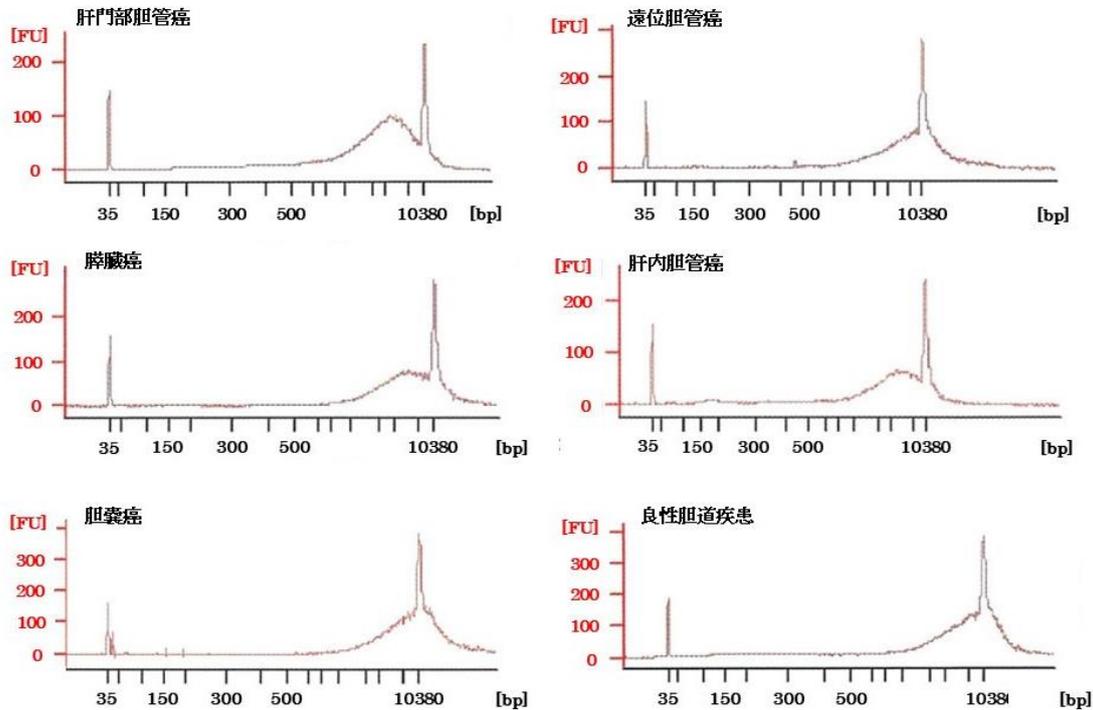


図 3. 膵液および胆汁 cfDNA のエレクトロフェログラム.

良悪性いずれの疾患においても cfDNA の断片長は約 8000-10000 bp であった.

膵液 cfDNA 群および胆汁 cfDNA 群の cfDNA 濃度について下記に詳細を示す (表 3, 4). 膵液の cfDNA 濃度は全体で 0.8~37 ng/μl であり, 各疾患別にみると, 膵臓癌 (3.7 ng/μl), 膵上皮内腫瘍 (中央値 3.93 ng/μl), 慢性膵炎群 (中央値 4.29 ng/μl) よりも膵管内乳頭粘液性腫瘍群 (中央値 29.9 ng/μl) で高かった (図 4). また良悪性における比較では, 悪性疾患で cfDNA 濃度中央値 3.7 ng/μl (3.3-4.6 ng/μl), 良性疾患で 10.9 ng/μl (0.81-37 ng/μl) と両群で濃度の差は認められなかった ( $p=0.38$ ). 一方, 胆汁の cfDNA 濃度は全体で 1.4~715 ng/μl であり, 膵液 cfDNA 濃度よりも高値であったが, 各疾患ごとの比較では明らかな差はみられなかった ( $p=0.419$ ) (図 4). 良悪性における比較では悪性疾患で中央値 7.8 ng/μl (1.4-715 ng/μl), 良性疾患で中央値 9.6 ng/μl (1.4-45 ng/μl) であり, こちらも両群で差は認められなかった ( $p=0.99$ ). また黄疸の有無での cfDNA 濃度は, 黄疸有りで中央値 6.4 ng/μl (1.4-715 ng/μl), 黄疸無しで中央値 20 ng/μl (1.4-744 ng/μl) と差は認められなかったが ( $p=0.065$ ), 黄疸無しで cfDNA 濃度が高い傾向にあった. さらに UICC 病期分類における胆汁 cfDNA

濃度 (中央値)は, I 期 6.4 ng/μl, II 期 7.0 ng/μl, III 期 17.0 ng/μl, IV 期 9.0 ng/μl でいずれも差は認められなかった ( $p = 0.90$ ).

表 3. 膵液群の各疾患における cfDNA 濃度と血中 gDNA 濃度および library 作製後の濃度.

No	疾患	cfDNA 濃度 (ng/μl)	gDNA 濃度 (ng/μl)	Library 濃度 cfDNA (pM)	Library 濃度 gDNA (pM)	UICC 病期
1	PDAC	3.7	28.59	1995.8	360.6	I
2	PanIN	4.6	31.264	1681.5	1538.7	0
3	PanIN	3.26	16.494	494.9	1413.5	0
4	IPMN	22.8	53.829	952.6	2969.2	
5	IPMN	37	17.299	856.6	1163.9	
6	CP	2.3	46.752	1002.2	569.7	
7	CP	6.28	19.365	1148.2	1213.4	
8	CP	0.814	17.122	643.1	4742	
9	CP	16.4	35.254	913.9	806.5	
10	診断不能	10.9	34.723	1821.7	11,473.3	

膵臓癌 (PDAC: pancreatic ductal adenocarcinoma), 膵上皮内腫瘍(PanIN: pancreatic intraepithelial neoplasm), 膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN: intraductal papillary mucinous neoplasm), 慢性膵炎(CP: chronic pancreatitis)

表 4. 胆汁群の各疾患における cfDNA 濃度と血中 gDNA 濃度および library 作製後の濃度.

No	疾患	黄疸	cfDNA 濃度 (ng/μl)	gDNA 濃度 (ng/μl)	Library 濃度 cfDNA (pM)	Library 濃度 gDNA (pM)	UICC 病期
1	dEHCC	—	2.44	11.896	392.7	3884.2	II
2	dEHCC	+	6.52	53.224	2802.5	967.6	II
3	dEHCC	—	72.8	27.75	444.9	5141	II
4	dEHCC	+	13.4	21.273	1111.6	1365.8	II
5	dEHCC	—	182.4	40.905	389.7	360.6	I
6	dEHCC	—	19.7	24.143	1668	365.1	I
7	dEHCC	+	9	17.537	2822.5	1333.4	IV
8	dEHCC	+	6.36	30.25	2019.4	1104.1	I
9	pEHCC	—	20	37.624	635.9	928.4	III
10	pEHCC	—	8.02	39.199	1115.1	639	II
11	pEHCC	+	13.9	18.688	2752.8	1576	III
12	pEHCC	+	5.06	42.843	712.8	584	IV

13	pEHCC	—	4.42	24.224	843.9	354.2	II
14	pEHCC	+	715.2	80.663	1387.1	2874.2	II
15	pEHCC	—	4.26	29.95	1729.2	912.3	II
16	pEHCC	+	1.74	38.77	2260.8	851	IV
17	pEHCC	—	35	37.49	882.3	775.4	II
18	pEHCC	—	744	44.423	717.6	1048.8	IV
19	pEHCC	+	2.92	48.875	1066.4	1455.4	III
20	pEHCC	+	6.08	33.725	1190.3	840.8	III
21	pEHCC	+	13.5	36.009	536.2	860.6	IV
22	pEHCC	—	25	23.852	1204.6	4742	II
23	pEHCC	—	3.52	22.667	2780.8	604.8	II
24	pEHCC	+	4.22	46.813	1579.2	2050.1	IV
25	IHCC	—	33.8	32.329	377.4	847.8	III
26	IHCC	+	5.5	24.225	759.5	603.4	II
27	GBC	—	93.4	32.078	742.9	1358.3	IV
28	PDAC	+	4.88	38.456	977.8	2215.8	II
29	PDAC	+	4.18	29.496	1616.1	1343.1	II
30	PDAC	+	7.64	24.75	1128.4	887.3	II
31	PDAC	+	1.4	22.868	2161.1	185.2	II
32	PDAC	—	36.4	30.669	2002.7	905.2	III
33	Stone	+	14.3	25.403	940.6	412.1	
34	Stone	—	6.34	28.962	2190.8	2267.7	
35	Stone	—	3.88	20.325	1009.5	339.4	
36	Stone	—	1.36	29.85	2134.7	345	
37	IgG4-SC	+	11.4	26.902	293.6	1811.9	
38	IgG4-SC	—	45	50.492	863.6	1474.7	
39	CP	—	44.4	46.752	923.4	569.7	
40	診断不能	—	7.72	30.351	4930.9	2875.6	

遠位胆管癌(dEHCC: distal extrahepatic cholangiocarcinoma), 肝門部胆管癌 (pEHCC: perihilar extrahepatic cholangiocarcinoma), 肝内胆管癌(IHCC: intrahepatic cholangiocarcinoma), 胆嚢癌(GBC: gallbladder carcinoma), 膵臓癌 (PDAC: pancreatic ductal adenocarcinoma), 総胆管結石(Stone: bile duct stone), 慢性膵炎(CP: chronic pancreatitis), IgG4 関連硬化性胆管炎(IgG4-SC: IgG4-related sclerosing cholangitis).

+ : 黄疸あり, — : 黄疸なし.

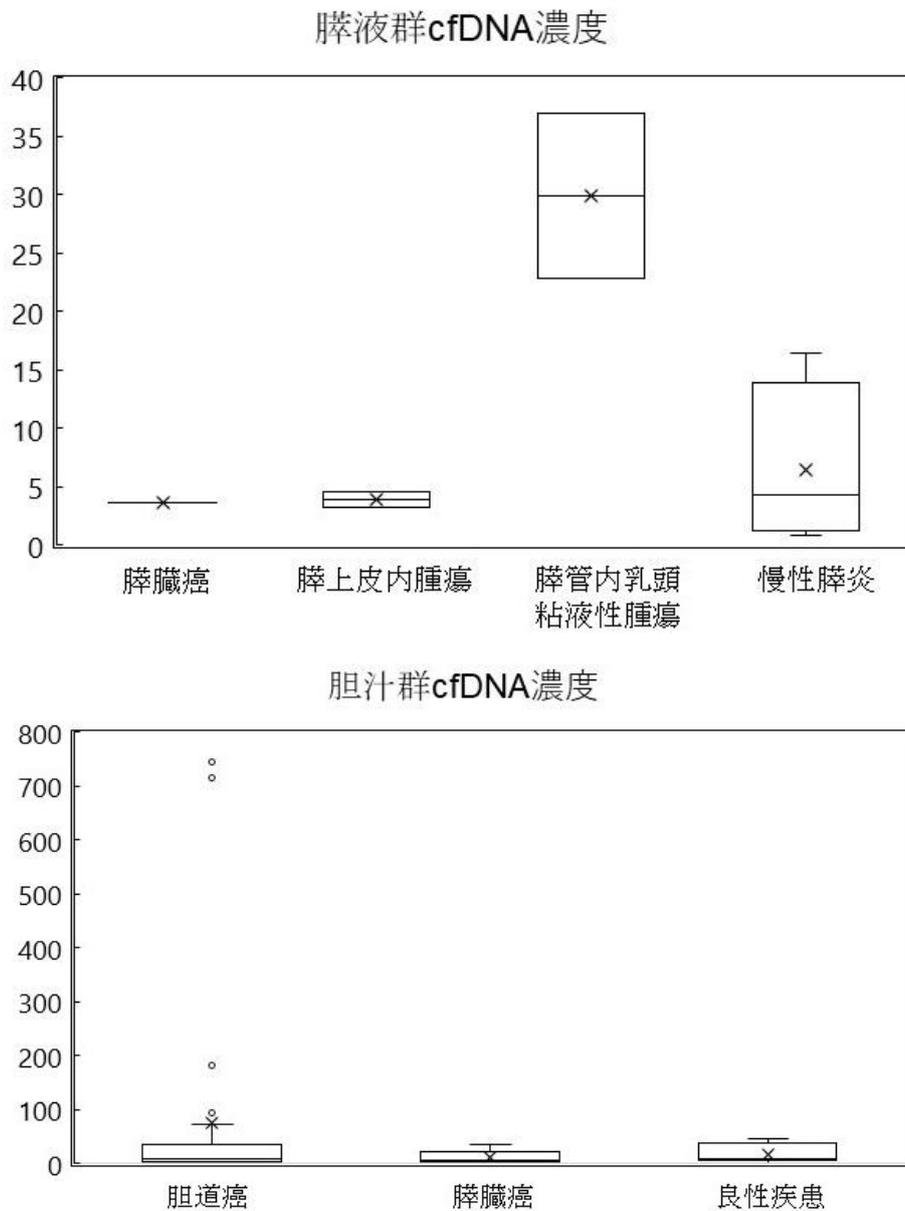


図 4. 膵液および胆汁中の cfDNA 濃度.

膵液中の cfDNA 濃度は膵管内乳頭粘液性腫瘍で他の疾患（膵臓癌，膵上皮内腫瘍，慢性膵炎）よりも高かった．一方，胆汁中の cfDNA 濃度は全体的に膵液よりも高かったが，各疾患ごとの差はみられなかった．

### 3. 膵液/胆汁 cfDNA 変異解析結果および膵液/胆汁細胞診結果

#### 3.1. 膵液群

平均リード長は 602,158 リードで平均カバレッジは 2322×であった．10 人の患者のうち膵臓癌 (stage I) 患者 1 例 (10%) で SNV が同定され，遺伝子解

析では *KRAS* 変異が明らかとなった (図 5). 膵臓癌 1 例を含む 8 例で実施された膵液細胞診はいずれも陰性であった. 上記結果より膵液 liquid biopsy の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率はそれぞれ 33.3%, 100%, 100%, 77.8% であった. 膵液細胞診のそれらはそれぞれ 0%, 100%, 0%, 62.5% であった (表 5).



図 5. 膵液群の遺伝子変異プロファイル  
Stage I 膵臓癌患者において *KRAS* 変異が認められた.

表 5. 膵液群の liquid biopsy および細胞診の成績 (感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率).

		疾患 (n=10)		感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
		悪性	良性				
Liquid biopsy	陽性	1	0	33.3%	100%	100%	77.8%
	悪性	2	7				

		疾患 (n=8)		感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
		悪性	良性				
細胞診	陽性	0	0	0%	100%	0%	62.5%
	悪性	3	5				

### 3.2. 胆汁群

平均リード長は 550,497 リードで平均カバレッジは 2335×であった。12 個の遺伝子で 32 個の SNV と 2 個の INDEL が同定された (表 6, 図 6 および図 7)。遺伝子変異は 40 人の患者のうち 19 人 (47.5%) で確認され, 悪性疾患 32 人中 17 人 (53.1%) で同定された。悪性疾患で同定された遺伝子変異の内訳は *TP53* (9/32, 28.1%), *KRAS* (7/32, 21.9%), *CDKN2A* (4/32, 12.5%), *SMAD4* (2/32, 6.3%), *APC* (2/32, 6.3%), *BRAF* (1/32, 3.2%), *FGFR1* (1/32, 3.2%), *PTPN11* (1/32, 3.2%), *CDH1* (1/32, 3.2%), *MET* (1/32, 3.2%), *NRAS* (1/32, 3.2%), *PIC3CA* (1/32, 3.2%) 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, 25%), *CDH1* (1/8, 12.5%) の変異が検出された。これらはそれぞれ診断不能症例 (*TP53/CDH1*), 慢性膵炎症例 (*TP53*) であり, いずれも観察期間内で明らかな悪性化を示唆する所見は認められなかった。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 53.1%, 75%, 89.5%, 28.6% であった。胆汁細胞診は 30 例で実施し, 細胞診においてはそれぞれ 19.2%, 100%, 100%, 16% であった (表 7)。胆汁 liquid biopsy の感度は胆汁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 ( $p = 0.48$ )。UICC 病期分類別の遺伝子変異検出率は I 期 40%, II 期 64%, III 期 66%, IV 期 43% であった。

表 6. 胆汁群の遺伝子変異一覧

No	疾患	細胞診	遺伝子変異	バリエントタイプ	遺伝子座
1	dEHCC	—	<i>BRAF</i> <i>CDH1</i>	SNV SNV	chr7:140453149 chr16:68847276"
2	dEHCC	N	<i>TP53</i>	SNV	chr17:7574017
3	dEHCC	N	×	×	×
4	dEHCC	—	<i>KRAS</i>	SNV	chr12:25398280
5	dEHCC	N	×	×	×
6	dEHCC	N	<i>KRAS</i> <i>APC</i>	SNV SNV	chr12:25398280 chr5:112175951
7	dEHCC	—	×	×	×
8	dEHCC	A	<i>NRAS</i>	SNV	chr1:115256528
9	pEHCC	—	<i>TP53</i> <i>PTPN11</i> <i>CDKN2A</i> <i>APC</i>	SNV SNV INDEL SNV	chr17:7578256 chr12:112888210 chr9:21971168 chr5:112175639

10	pEHCC	N	×	×	×
11	pEHCC	A	<i>KRAS</i>	SNV	chr12:25398280
12	pEHCC	N	<i>TP53</i> <i>SMAD4</i>	SNV SNV	chr17:7578526 chr18:48591821
13	pEHCC	A	×	×	×
14	pEHCC	—	×	×	×
15	pEHCC	—	<i>CDKN2A</i>	SNV	chr9:21971209
16	pEHCC	N	×	×	×
17	pEHCC	N	×	×	×
18	pEHCC	N	<i>FGFR1</i> <i>CDKN2A</i>	SNV SNV	chr8:38282147 chr9:21971036
19	pEHCC	N	<i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>MET</i>	SNV SNV SNV	chr12:25380275 chr17:7578368 chr7:116340262
20	pEHCC	N	<i>KRAS</i> <i>TP53</i>	SNV SNV	chr12:25380275 chr17:7578368
21	pEHCC	A	<i>PIC3CA</i>	SNV	chr3:178952074
22	pEHCC	A	<i>TP53</i> <i>SMAD4</i>	SNV SNV	chr17:7577557 chr18:48591931
23	pEHCC	N	<i>TP53</i>	SNV	chr17:7577528
24	pEHCC	N	×	×	×
25	IHCC	N	×	×	×
26	IHCC	N	×	×	×
27	GBC	N	×	×	×
28	PDAC	N	×	×	×
29	PDAC	N	<i>KRAS</i> <i>TP53</i> <i>CDKN2A</i>	SNV INDEL SNV	chr12:25398280 chr17:7577553 chr9:21971101
30	PDAC	N	×	×	×
31	PDAC	N	<i>KRAS</i> <i>TP53</i>	SNV SNV	chr12:25398280 chr17:7574002
32	PDAC	N	×	×	×
33	Stone	—	×	×	×
34	Stone	N	×	×	×
35	Stone	N	×	×	×

36	Stone	—	×	×	×
37	IgG4-SC	—	×	×	×
38	IgG4-SC	N	×	×	×
39	CP	N	TP53	SNV	chr17:7577100
40	診断不能	—	TP53	SNV	chr17:7578475
			CDH1	SNV	chr16:68847240

遠位胆管癌(dEHCC: distal extrahepatic cholangiocarcinoma), 肝門部胆管癌(pEHCC: perihilar extrahepatic cholangiocarcinoma), 肝内胆管癌(IHCC: intrahepatic cholangiocarcinoma), 胆嚢癌(GBC: gallbladder carcinoma), 膵臓癌(PDAC: pancreatic ductal adenocarcinoma), 総胆管結石(Stone: bile duct stone), 慢性膵炎(CP: chronic pancreatitis), IgG4 関連硬化性胆管炎(IgG4-SC: IgG4-related sclerosing cholangitis).

N: 陰性, A: Adenocarcinoma(腺癌), —: 未検査, ×: 未検出

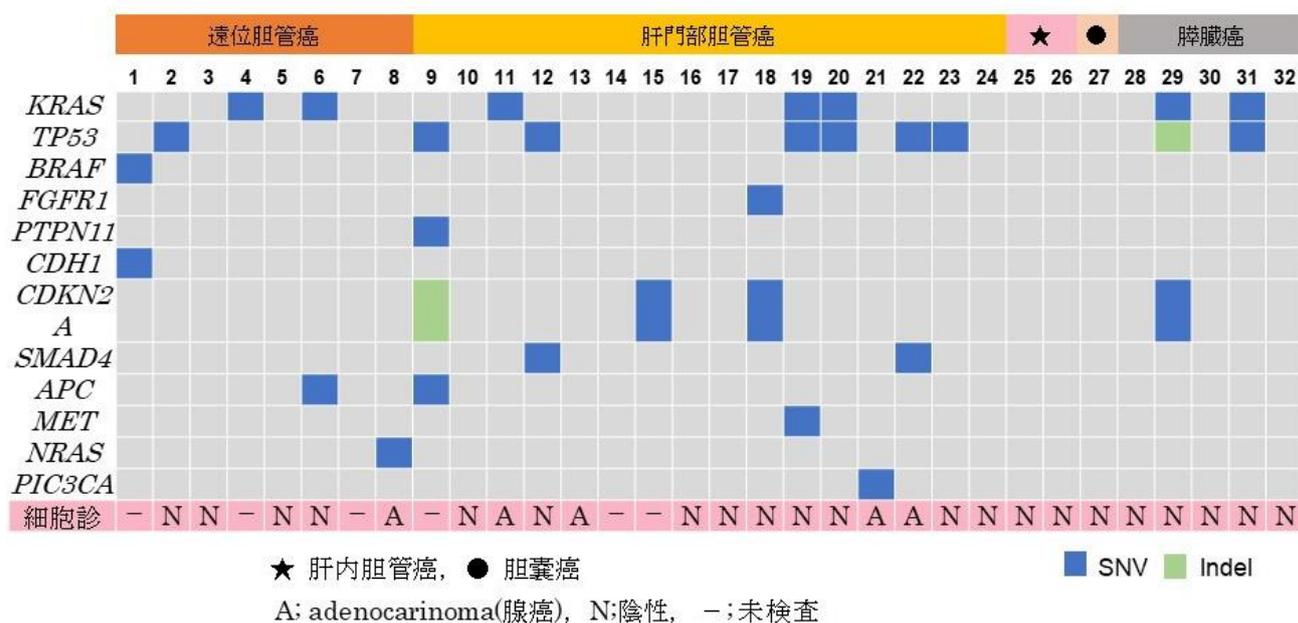


図 6. 胆汁群における膵胆道悪性疾患の遺伝子変異プロファイル.  
 肝内胆管癌と胆嚢癌を除いた胆道癌において, 複数の遺伝子変異が検出された.

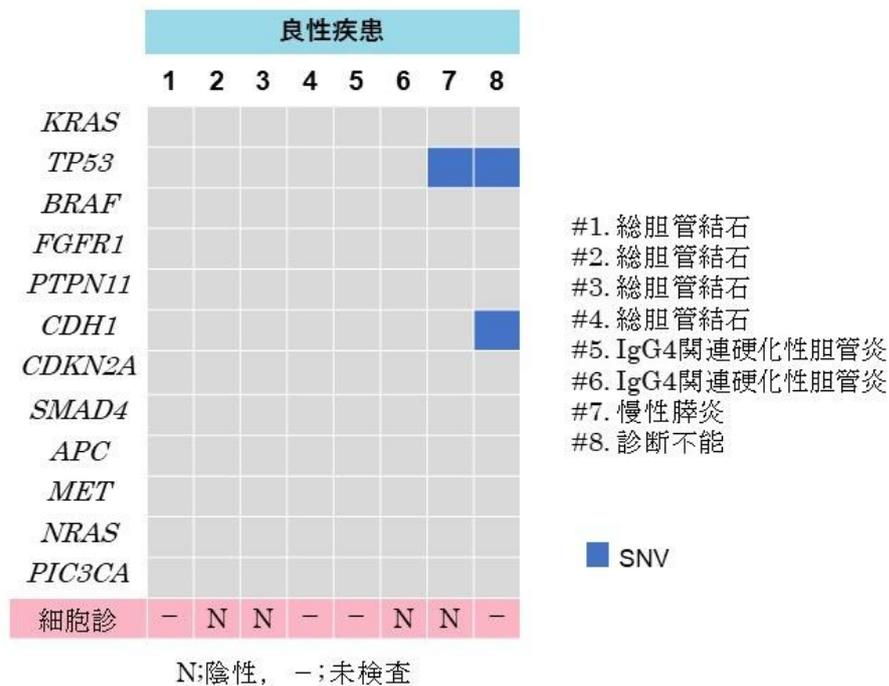


図 7. 胆汁群の良性胆道狭窄における遺伝子変異プロファイル。  
*TP53* および *CDH1* 変異が 2 例において検出された。

表 7. 胆汁群の liquid biopsy および細胞診の成績 (感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率).

		疾患 (n=40)		感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
		悪性	良性				
Liquid biopsy	陽性	17	2	53.1%	75%	89.5%	28.6%
	悪性	15	6				

		疾患 (n=30)		感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
		悪性	良性				
細胞診	陽性	5	0	19.2%	100%	100%	16%
	悪性	21	4				

### 3.3. 胆汁群の悪性腫瘍の部位別にみた遺伝子変異

肝門部胆管癌では 10 例 (62.5%) で遺伝子変異が認められ, *TP53* 変異 (37.5%) が高頻度で認められた. 遠位胆管癌では 5 例 (62.5%) に遺伝子変異が認められ *KRAS* 変異 (25%) が最も多く, 膵臓癌では 2 例 (40%) に認めら

れ、*KRAS*変異と*TP53*変異（50%）が多かった。肝内胆管癌と胆嚢癌では遺伝子変異は検出されなかった（図 8）。

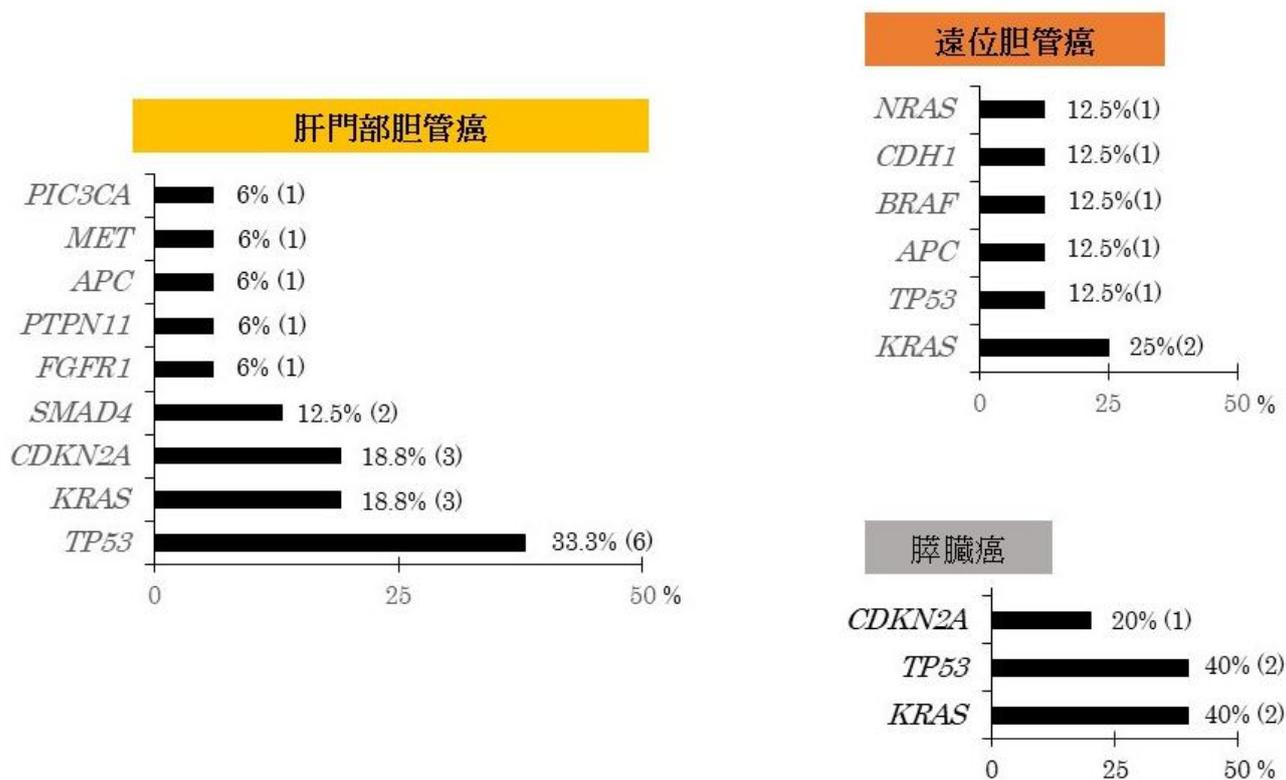


図 8. 癌部位における胆汁 cfDNA の遺伝子変異の頻度。

*KRAS*と*TP53*変異が多くみられ、次いで*CDKN2A*変異が多く認められた。

## 考察

本研究では、既報の血漿から得られる cfDNA 濃度および断片長とは異なる性質の cfDNA が膵液および胆汁から共に抽出されることを示し、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ことを実証した。

血漿中の cfDNA 濃度は一般的に 0.001-0.05 ng/ $\mu$ l とされているが (Yang et al., 2018), 本研究における膵液中 cfDNA 濃度中央値は 5.4 ng/ $\mu$ l, 胆汁中 cfDNA 濃度中央値は 7.9 ng/ $\mu$ l と、血漿に比べ濃度が非常に高いことが示された。また、血漿は 150–200 bp の短い断片の cfDNA を多く含むことが報告されているが (Yang et al., 2018), 本研究では膵液および胆汁中の cfDNA 断片長は約 8000–10000 bp と血漿中 cfDNA と比べると非常に長く、膵液・胆汁中 cfDNA の既報で示されたものと同様であった (Shen et al., 2019; Yang et al., Arechederra et al., 2022). 血漿 cfDNA と膵液・胆汁 cfDNA 断片長の違いは、両者の DNA 制限酵素の種類と活性の違いに起因している可能性があるかと推察されている (Shen et al., 2019). 長い cfDNA 断片は、遺伝子変異の高感度な検出に有用であり、この概念はロングリードシーケンスを用いた新しい DNA シーケンス技術に適用できると考えられ、短い DNA 断片では検出しづらい遺伝子変異を捕らえやすい長所がある。 (Sakamoto et al., 2020).

また、本研究の結果では、悪性疾患における胆汁中の cfDNA 濃度において、UICC 病期分類で濃度および遺伝子変異検出率の差は認めなかった。血漿中 cfDNA に関する既報では、進行癌では早期癌とくらべて cfDNA 濃度や遺伝子変異検出率は高いとされており (Bettegowda et al., 2014), 膵液, 胆汁 cfDNA の解析は早期癌においても有効であることが考えられる。

膵管内乳頭粘液性腫瘍の膵液中の cfDNA 濃度は、他の膵臓疾患の膵液中の cfDNA 濃度よりも高いことも判明した。膵管内乳頭粘液性腫瘍は粘液の分泌が多いことが特徴であり、粘液には腫瘍細胞由来の cfDNA や DNA を含むエクソソーム (Iacobuzio et al., 2012) も含まれている。膵液中の cfDNA 量を膵臓癌, 膵管内乳頭粘液性腫瘍, その他疾患で比較した報告はなく、本研究では膵管内乳頭粘液性腫瘍 2 例のみでの検証となったが、cfDNA 量は粘液量に比例している可能性がある。一方、Mateos らによると、膵液中の腫瘍由来 cfDNA の比率は膵管内粘液性腫瘍の grade とは相関がなかったと報告されている (Mateos et al., 2019).

本研究では、膵液と胆汁 liquid biopsy の悪性腫瘍に対する感度は、細胞診の感度よりも高いことも明らかになった (膵液: 33.3% vs 0%, 胆汁: 53.1% vs 19.2%). これらの結果は、膵液および胆汁 liquid biopsy が、膵液/胆汁細胞診に加えて補助的な

診断ツールとなりうることを示している。

膵液群では、UICC 病期分類 I 期の膵臓癌で *KRAS* 変異が検出されたが、high-grade 相当の膵上皮内腫瘍症例では変異は検出されなかった。*KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* および *SMAD4* における遺伝子変異は、膵上皮内腫瘍の進行に段階的に関与していると報告されている (Boschman et al., 1994; Hruban et al., 2000, Hezel et al., 2006; Iacobuzio et al., 2012)。理論的にはこれらの遺伝子変異を含む cfDNA が膵液中に存在し、検出されるはずであるが、本研究は変異対立遺伝子頻度 (Mutant allele frequency: MAF) の検索閾値の限界が既報の胆汁 cfDNA 解析 (Arechederra et al., 2022) で設定された MAF (0.15%) よりも高い 2% であったことが要因の一つとして考えられる。

Mateos ら (Mateos et al., 2019) は、DNA コピー数の変動や代表的な *KRAS*, *GNAS*, *RNF43*, *TP53* の SNV や INDEL を含む MAF 5% での閾値のエクソーム変化を、全ゲノムシーケンスを行うことで検出感度を上げ、様々な膵管内粘液性腫瘍の膵液 cfDNA で検索した。彼らは、ほぼ全てのサンプルが何らかの体細胞変異を保有していることを明らかにしたが、*KRAS* と *GNAS* 変異はそれぞれ 44% と 31% の割合で検出されたと報告している。Ginesta ら (Ginesta et al., 2016) は、膵液 cfDNA を用いて *EN 1*, *HRH2*, *SPARC*, *APC* および *CDH13* 遺伝子プロモーターのメチル化の状態を評価し、*APC* のメチル化が膵臓癌 (76%) および膵管内乳頭粘液性腫瘍 (80%) で起こっていること、慢性膵炎 (7%) では少数例でしか認められなかったことを報告している。一方、悪性腫瘍の陽性適中率は低く、鑑別診断が困難であったとも示している。

本研究の胆汁群では、肝内胆管癌と胆嚢癌では変異を検出することができなかった。先行研究では、肝内胆管癌と胆嚢癌と診断された患者において、150–160 の遺伝子を含むより包括的な遺伝子パネルとより高性能な NGS を用いて、MAF の下限を 0.1–0.15% とし cfDNA 変異を高感度で検出している (Shen et al., 2019; Arechederra et al., 2022) ことが、その違いの要因と考えられる。

良性疾患では、慢性膵炎の症例と診断不能の 2 症例で遺伝子変異が検出された。偽陽性の可能性も完全には否定できないが、初期の病理診断が良性疾患でありながら遺伝子変異が陽性であった 4 例が、その後の観察期間中に膵臓癌を発症したという報告もあることから (Arechederra et al., 2022), liquid biopsy が陽性であった症例については、慎重に経過観察する必要があると考えられる。

本研究はいくつかの限界と課題を有している。一つ目は用いた次世代シーケンサーの MAF の検出限界は 2% であり、過去の報告と比較して、胆汁および膵液中の cfDNA 変異の検出には不十分である可能性がある (Shen et al., 2019; Arechederra et al., 2022)。二つ目は膵臓疾患 (n = 10) および胆道疾患 (n = 40) の少数の患者しか登録されていないことであり、サンプルサイズが小さいことで、疾患

の偏りもでてくる。今後サンプル数を集積することで、より精度の高い評価が行われることが期待される。三つ目は本研究で使用した 50 の癌遺伝子パネル (Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel v2) は *ATM*, *ARID1A/2A*, *BRCA*, *NF43* など、膵・胆道癌領域に関連すると報告されている変異遺伝子をすべては網羅できていない。四つ目は liquid biopsy 陽性の定義として、使用した遺伝子パネル上で 1 つ以上の遺伝子変異があるものを悪性腫瘍と定義したことである。多段階発癌説を考慮すると、癌化するまでに複数の遺伝子変異が発現する可能性があることや、非癌細胞や前癌細胞で 1 つの遺伝子変異が検出される可能性もある。従って、cfDNA 解析による悪性腫瘍の定義には、今後の症例数の蓄積や、より多くの遺伝子を網羅した遺伝子パネルの導入が必要である。

今後臨床の間では、cfDNA の解析は、膵液や胆汁の細胞診で判定不能な症例の良悪性の診断や遺伝子変異に基づく将来の悪性度予測に有効であると考えられる。今後、さらに多くの症例を蓄積し、より精度の高い遺伝子変異解析を行うことで、cfDNA 解析の有効性が確認されると考えられる。

## 結論

本研究で得られた新知見は以下のとおりである。

- ・膵液および胆汁中 cfDNA は血漿 cfDNA と比べて濃度が高く、DNA 断片長も長い。
- ・膵液中の cfDNA 濃度は膵管内粘液性腫瘍で高く、膵癌や非癌に比べて分泌される粘液量が多いことが関係している可能性がある。
- ・膵液・胆汁中 cfDNA 濃度や遺伝子変異検出率は腫瘍の進行と関係しないことが予想される。
- ・本研究は、膵管/胆管狭窄病変における膵液、胆汁中の cfDNA を解析し、遺伝子変異検出が可能であることを実証できた。膵液/胆汁 liquid biopsy は細胞診の補助的診断ツールとなり、悪性診断能の向上への寄与を支持する知見を示した。
- ・今後の課題としては、症例数をさらに蓄積してその再現性を確認していくこと、同一患者から得られた生検検体や手術検体の遺伝子変異を解析し、膵液/胆汁 cfDNA の遺伝子変異との対比をすることで、精度の検証を行うことである。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご助言をいただきました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

臨床的に意義深い研究テーマを与えていただき、計画から研究方法、論文作成まで、全ての面で多くのご助言、ご指導を賜りました北海道大学病院消化器内科講師 栗谷将城先生に厚くお礼申し上げます。

今回の研究の要となる次世代シーケンサーの技術的な指導からデータの集積・解釈についてご指導頂きました北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室講師 須田剛先生、函館市立病院消化器内科医長 平田幸司先生に深く感謝申し上げます。

また日々の診療の中、様々な面でご援助いただきました北海道大学病院消化器内科胆膵グループの先生方に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究に協力いただきましたすべての患者さまに、厚く御礼申し上げます。

## 利益相反

本研究において、開示すべき利益相反はありません。

## 引用文献

Arechederra, M., Rullán, M., Amat, I., Oyon, D., Zabalza, L., Elizalde, M., Latasa, M.U., Mercado, M.R., Ruiz-Clavijo, D., Saldaña, C., et al. (2022). Next-generation sequencing of bile cell-free DNA for the early detection of patients with malignant biliary strictures. *Gut*. *71*, 1141–1151.

Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., Wang, Y., Agrawal, N., Bartlett, B.R., Wang, H., Luber, B., Alani R.M., Antonarakis E.S., et al. (2014). Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* *6*, 224ra24.

Boschman, C.R., Stryker, S., Reddy, J.K., Rao, M.S. (1994). Expression of p53 protein in precursor lesions and adenocarcinoma of human pancreas. *Am. J. Pathol.* *145*, 1291–1295.

Burnett, A.S., Calvert, T.J., Chokshi, R.J. (2013). Sensitivity of endoscopic retrograde cholangiopancreatography standard cytology: 10-y review of the literature. *J. Surg. Res.* *184*, 304–311.

Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutat. Res.* *635*, 105–117.

Driescher, C., Fuchs, K., Haeberle, L., Goering, W., Frohn, L., Opitz, F.V., Haeussinger, D., Knoefel, W.T., Keitel, V., Esposito, I. (2020). Bile-based cell-free DNA analysis is a reliable diagnostic tool in pancreatobiliary cancer. *Cancers.* *13*, 39.

Eloubeidi, M.A., Chen, V.K., Eltoun, I.A., Jhala, D., Chhieng, D.C., Jhala, N., Vickers, S.M., Wilcox, C.M. (2003). Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy of patients with suspected pancreatic cancer: Diagnostic accuracy and acute and 30-day complications. *Am. J. Gastroenterol.* *98*, 2663–2668.

Endo, I., Gonen, M., Yopp, A.C., Dalal, K.M., Zhou, Q., Klimstra, D., D'Angelica, M., DeMatteo, R.P., Fong, Y., Schwartz, L., et al.

(2008). Intrahepatic cholangiocarcinoma: Rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann. Surg.* *248*, 84–96.

Ginesta, M.M., Diaz-Riascos, Z.V., Busquets, J., Pelaez, N., Serrano, T., Peinado, M.À., Jorba, R., García-Borobia, F.J., Capella, G., Fabregat, J. (2016). APC promoter is frequently methylated in pancreatic juice of patients with pancreatic carcinomas or periampullary tumors. *Oncol. Lett.* *12*, 2210–2216.

Goodale, R.L., Gajl-Peczalska, K., Dressel, T., Samuelson, J. (1981). Cytologic studies for the diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer*, *47*, 1652–1655.

Gormally, E., Caboux, E., Vineis, P., Hainaut, P. (2007). Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutat. Res.* *635*, 105–117.

Groot, V.P., van Santvoort, H.C., Rombouts, S.J., Hagendoorn, J., Borel Rinkes, I.H., van Vulpen, M., Herman, J.M., Wolfgang, C.L., Besselink, M.G., Molenaar, I.Q. (2017). Systematic review on the treatment of isolated local recurrence of pancreatic cancer after surgery; re-resection, chemoradiotherapy and SBRT. *HPB.* *19*, 83–92.

Hadano, N., Murakami, Y., Uemura, K., Hashimoto, Y., Kondo, N., Nakagawa, N., Sueda, T., Hiyama, E. (2016). Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br. J. Cancer.* *115*, 59–65.

Han, J.Y., Ahn, K.S., Kim, T.S., Kim, Y.H., Cho, K.B., Shin, D.W., Baek, W.K., Suh, S.I., Jang, B.C., Kang, K.J. (2021). Liquid biopsy from bile-circulating tumor DNA in patients with biliary tract cancer. *Cancers.* *13*, 4581.

Hatfield, A.R., Smithies, A., Wilkins, R., Levi, A.J. (1976). Assessment of endoscopic retrograde cholangio-pancreatography (ERCP) and pure pancreatic juice cytology in patients with pancreatic disease. *Gut.* *17*, 14–21.

- Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., Depinho, R.A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* *20*, 1218–1249.
- Hruban, R.H., Wilentz, R.E., Kern, S.E. (2000). Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am. J. Pathol.* *156*, 1821–1825.
- Iacobuzio-Donahue, C.A., Velculescu, V.E., Wolfgang, C.L., Hruban, R.H. (2012). Genetic basis of pancreas cancer development and progression: Insights from whole–exome and whole–genome sequencing. *Clin. Cancer Res.* *18*, 4257–4265.
- Ignatiadis, M., Sledge, G.W., Jeffrey, S.S. (2021). Liquid biopsy enters the clinic—implementation issues and future challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *18*, 297–312.
- Kameya, S., Kuno, N., Kasugai, T. (1981). The diagnosis of pancreatic cancer by pancreatic juice cytology. *Acta Cytol.* *25*, 354–360.
- Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy–to–use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* *48*, 452–458.
- Khan, S.A., Emadossadat, S., Ladep, N.G., Thomas, H.C., Elliott, P., Taylor-Robinson, S.D., Toledano, M.B. (2012). Rising trends in cholangiocarcinoma: Is the ICD classification system misleading us? *J. Hepatol.* *56*, 848–854.
- Kinugasa, H., Nouse, K., Ako, S., Dohi, C., Matsushita, H., Matsumoto, K., Kato, H., Okada, H. (2018). Liquid biopsy of bile for the molecular diagnosis of gallbladder cancer. *Cancer Biol. Ther.* *19*, 934–938.
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C.D., Biankin, A.V., Neale, R.E., Tempero, M., Tuveson, D.A., Hruban, R.H., et al. (2016). Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis Primers.* *2*, 16022.

Lo, YMD., Han, DSC., Jiang, Peiyong., Chiu, RWK. (2021). Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science*. *372*, eaaw3616.

Mateos, R.N., Nakagawa, H., Hirono, S., Takano, S., Fukasawa, M., Yanagisawa, A., Yasukawa, S., Maejima, K., Oku-Sasaki, A., Nakano, K., et al. (2019). Genomic analysis of pancreatic juice DNA assesses malignant risk of intraductal papillary mucinous neoplasm of pancreas. *Cancer Med*. *8*, 4565–4573.

Mizrahi, J.D., Surana, R., Valle, J.W., Shroff, R.T. (2020). Pancreatic cancer. *Lancet*. *395*, 2008–2020.

Mok, TSK., Kim, SW., Wu, YL., Nakagawa, K., Yang, JJ., Ahn, MJ., Wang, J., Yang, JC., Lu, Y., Atagi, S., et al. (2017). Gefitinib Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy in Epidermal Growth Factor Receptor Mutation–Positive Non–Small–Cell Lung Cancer Resistant to First–Line Gefitinib (IMPRESS): overall survival and biomarker analyses. *J Clin Oncol*. *35*, 4027–34.

Molina-Vila, M.A., de-Las-Casas, C.M., Bertran-Alamillo, J., Jordana-Ariza, N., González-Cao, M., Rosell, R. (2015). cfDNA analysis from blood in melanoma. *Ann. Transl. Med*. *3*, 309.

Nakaizumi, A., Tatsuta, M., Uehara, H., Yamamoto, R., Takenaka, A., Kishigami, Y., Takemura, K., Kitamura, T., Okuda, S. (1992). Cytologic examination of pure pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic carcinoma. The endoscopic retrograde intraductal catheter aspiration cytologic technique. *Cancer*. *70*, 2610–2614.

Nakamura, H., Arai, Y., Totoki, Y., Shirota, T., Elzawahry, A., Kato, M., Hama, N., Hosoda, F., Urushidate, T., Ohashi, S., et al. (2015). Genetic spectra of biliary tract cancer. *Nat. Genet*. *47*, 1003–1010.

Navaneethan, U., Njei, B., Lourdusamy, V., Konjeti, R., Vargo, J.J., Parsi, M.A. (2015). Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: A systematic review and meta–analysis. *Gastrointest. Endosc*. *81*, 168–176.

Okada, T., Iwano, H., Ono, Y., Karasaki, H., Sato, T., Yamada, M., Omori, Y., Sato, H., Hayashi, A., Kawabata, H., et al. (2018). Utility of 'liquid biopsy' using pancreatic juice for early detection of pancreatic cancer. *Endosc. Int. Open.* *6*, E1454–E1461.

Sakamoto, Y., Sereewattanawoot, S., Suzuki, A. (2020). A new era of long-read sequencing for cancer genomics. *J. Hum. Genet.* *65*, 3–10.

Saunders, C.T., Wong, W.S., Swamy, S., Becq, J., Murray, L.J., Cheetham, R.K. (2012) Strelka: Accurate somatic small variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics.* *28*, 1811–1817.

Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B., Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* *11*, 426–437.

Shen, N., Zhang, D., Yin, L., Qiu, Y., Liu, J., Yu, W., Fu, X., Zhu, B., Xu, X., Duan, A., et al. (2019). Bile cell-free DNA as a novel and powerful liquid biopsy for detecting somatic variants in biliary tract cancer. *Oncol. Rep.* *42*, 549–560.

Valle, J.W., Kelley, R.K., Nervi, B., Oh, D.Y., Zhu, A.X. (2021). Biliary tract cancer. *Lancet.* *397*, 428–444.

Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., et al. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature.* *518*, 495–501.

Yang, K.S., Ciprani, D., O'Shea, A., Liss, A.S., Yang, R., Fletcher-Mercaldo, S., Mino-Kenudson, M., Castillo, C.F.D., Weissleder, R. (2021). Extracellular vesicle analysis allows for identification of invasive IPMN. *Gastroenterology.* *160*, 1345–1358.

Yang, N., Li, Y., Liu, Z., Qin, H., Du, D., Cao, X., Cao, X., Li, J., Li, D., Jiang, B., et al. (2018) The characteristics of ctDNA reveal the high complexity in matching the corresponding tumor tissues. *BMC Cancer.* *18*, 319.