



Title	ゲノム解析による膵癌術後予後予測に関する研究
Author(s)	小野, 雅人
Description	配架番号 : 2930
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16554号
Issue Date	2025-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16554
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95992
Type	doctoral thesis
File Information	ONO_Masato.pdf



学位論文

ゲノム解析による膵癌術後予後予測に関する研究
(Studies on predicting postoperative prognosis of
pancreatic cancer using genomic analysis)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

小野 雅人

学位論文

ゲノム解析による膵癌術後予後予測に関する研究
(Studies on predicting postoperative prognosis of
pancreatic cancer using genomic analysis)

2025 年 6 月

北 海 道 大 学

小野 雅人

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	5 頁
緒言	7 頁
対象と方法	11 頁
結果	17 頁
考察	31 頁
結論	34 頁
謝辞	35 頁
利益相反	36 頁
引用文献	37 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Masato Ono, Yusuke Ono, Toru Nakamura, Takahiro Tsuchikawa, Tomotaka Kuraya, Shota Kuwabara, Yoshitsugu Nakanishi, Toshimichi Asano, Aya Matsui, Kimitaka Tanaka, Yuma Ebihara, Yo Kurashima, Takehiro Noji, Soichi Murakami, Toshiaki Shichinohe, Tomoko Mitsuhashi, Yuko Omori, Toru Furukawa, Kenzui Taniue, Mayumi Suzuki, Ayumu Sugitani, Hidenori Karasaki, Yusuke Mizukami, Satoshi Hirano
Predictors of Long-Term Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma after Pancreatectomy: TP53 and SMAD4 Mutation Scoring in Combination with CA19-9
Annals of Surgical Oncology, 29 • 5007-5019, (2022)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Masato Ono, Toru Nakamura, Takahiro Tsuchikawa, Kimitaka Tanaka, Yoshitsugu Nakanishi, Toshimichi Asano, Takehiro Noji, Keisuke Okamura, Yusuke Ono, Munehiko Ogata, Yusuke Mizukami, Satoshi Hirano
Mutation profiles in long-term survivors with pulmonary metastases from pancreatic ductal adenocarcinoma
49th Meeting of European Pancreatic Club, 2017 年 6 月 28 日～7 月 1 日, Budapest, Hungary
2. Masato Ono, Toru Nakamura, Tomotaka Kuraya, Yusuke Ono, Ayumu Sugitani, Yusuke Mizukami, Satoshi Hirano
Predictors of the long-term survival of pancreatic ductal adenocarcinoma after pancreatectomy: TP53 and SMAD4 mutation scoring in combination with CA19-9
第 34 回日本肝胆膵外科学会・学術集会, 2022 年 6 月 10 日～11 日・東京
3. 小野 雅人, 中村 透, 小野 裕介, 杉谷 歩, 水上 祐輔, 平野 聡
TP53 と SMAD4 のゲノム変異スコアと CA19-9 を用いた膵臓癌術後長期生存の予測
Japan Digestive Disease Week 2024, 2024 年 10 月 31 日～11 月 3 日・神戸

要旨

【背景と目的】

膵癌は最も予後の悪い癌の一つで、唯一外科切除で長期生存が期待されるものの、再発も多く、治療が難しいのが現状である。一方で近年、術後長期生存例も散見されるようになり、早期再発や長期生存の予測が適切な治療選択の判断基準に欠かせない。膵癌の臨床的特徴から、生存予測や治療法の決定に関わるバイオマーカーが必要である。CA19-9を筆頭としたバイオマーカー、リキッドバイオプシーやエクソソーム解析などを用いて外科的切除後の短期・長期予後を予測する試みも相当数行われているが、単一の指標では生存予測が困難なのが現状である。膵癌のマーカーの一つとして、癌化に関連する遺伝子変異があげられる。腫瘍ゲノム解析は患者の転帰を正確に予測するために有用であり、大規模コホートを含むいくつかの研究において検証されている。また、癌抑制遺伝子変異は、機能喪失表現型をもたらすことが知られているが、一部の癌抑制遺伝子の機能を考慮すると、ミスセンス変異はトランケート変異よりも予後不良に関連する可能性があると報告されている。卵巣癌において、*TP53*の特徴的なミスセンス変異が、他のミスセンス変異やトランケート変異に比べ全生存率及び無再発生存率の悪化との関連が示されているが、膵癌では変異形式と予後の関連について分析されていない。

そこで、変異形式の違いを考慮したゲノムプロファイルと臨床パラメーターを組み合わせることで、膵癌患者の予後予測を行える可能性を考え、術後生存期間の大きく異なる患者群のゲノムプロファイルと臨床データを検証し、膵癌患者の新たな予後予測モデルを開発することを目的とした。

【対象と方法】

北海道大学病院で2000年から2016年に外科手術を行った膵癌患者310例のうち、術後5年以上生存を得ている「長期生存例」32例と、術後に再発し術後6か月から12ヶ月以内に死亡した「早期再発死亡例」34例の外科切除材料を用いた。膵癌で高頻度に変異するがん関連遺伝子18種に対し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行い、長期生存例と早期再発死亡例におけるゲノムプロファイルの違いを解析した。同症例のp53, SMAD4とp16の免疫染色を行い、遺伝子変異との関連を解析した。また、*TP53*変異形式と予後の関連についての検証のために、149名の米国の大規模データベース（TCGAデータベース）を使用し、解析を行った。

以上の解析結果から、長期生存確率を算出するスコアリング式を作成した。スコアリング式の妥当性を検証するために、310例以降に行われた2018年まで

の膵癌手術患者のうち、長期生存例 11 名、早期再発死亡例 10 例をバリデーショ
ンコホートとして設定し、解析を行った。

【結果】

ゲノム解析の結果、癌抑制遺伝子 *TP53* の変異形式が予後に関連することが示された。変異なし、トランケート変異、ミスセンス変異の順に予後不良と関連していた。TCGA データベースによる検証でもトランケート変異例に比べミスセンス変異例は予後不良であり、上記結果の正確性が裏付けられた。

他に、*TP53* と並ぶ主な癌抑制遺伝子である *SMAD4* 変異の有無も予後への関連が示された。この 2 つの遺伝子変異をスコア化し[*TP53* (0 : 変異無し, 1 : トランケート変異, 2 : ミスセンス変異) + *SMAD4* (0 : 変異無し, 2 : 変異あり)], 腫瘍マーカー CA19-9 値 100 U/mL を閾値として[0 : ≤100, 1 : >100]両者を組み合わせた予後予測モデルを作成した。予後予測モデルの計算式に各症例を当てはめて、各症例の予後予測スコアを計算した。感度と特異度を考慮し、予後予測スコア 60% をカットオフ値に設定した (Kappa=0.664)。バリデーショ
ンコホートにおいて、予後予測モデルを使用したスコアと、長期生存例および早期再発死亡例の分布から、予後予測モデルの有効性が示された (Kappa=0.452)。

【考察】

癌抑制遺伝子の機能の喪失は 2 つの対立遺伝子の欠失または不活化に応答して発生し、ナンセンスおよびフレームシフト変化により通常は切断が生じる。一方で、特定の *TP53* ミスセンス変異は、*TP53*WT に対する *TP53* トランケート変異のドミナントネガティブ効果を超えた発癌機能を示す可能性がある。その際は機能喪失型変異と比較して、腫瘍形成性と薬剤耐性が増強される。*TP53* ミスセンス変異が、膵癌におけるグアノシン三リン酸アーゼ活性化タンパク質のアイソフォームの発現を促進したことが証明されている。これらの要因が *TP53* において WT, トランケート変異, ミスセンス変異と順に予後不良につながるものが想定される。本研究で *TP53* 変異形式と免疫染色間の相同性がみられたが、これまで免疫染色パターンは十分に分類されておらず、より大規模なデータセットでの検証が必要と考える。

CA19-9 が現時点で使用可能な最も有用な膵癌のバイオマーカーであるが、約 5~10% の割合でルイス抗原陰性者が存在し、CA19-9 がマーカーとして機能しないことを考えると、CA19-9 単独ではなく他の因子も生存予測の要因に加えるべきである。変異スコアを含めて解析を行うと、長期生存例と早期再発死亡例の生存予測において高い予測力が得られた。

本研究は後ろ向き研究であることが研究限界としてあげられる。また、膵癌加療に術前補助化学療法を行うことが一般的となった現在では、治療介入前に予後情報を得ることが重要となる。本研究では外科切除標本を用いてシーケンス解析を行ったが、本解析に必要な組織検体は術前に内視鏡超音波吸引細胞診で取得できると想定される。今後、継続的な追跡期間を持つ大規模なコホートで、前向き研究での実証が望まれる。また、化学療法、ctDNA との関連を探ることで、予後予測だけでなく治療内容の選択につながる新たな指標の作成にも大きな役割を果たす可能性があると考ええる。

【結論】

術前に測定可能な *TP53* 変異型と *SMAD4* 変異の遺伝子情報に CA19-9 を組み合わせることで、膵癌外科切除後の生命予後への関連が示された。膵癌の手術戦略において、適切な治療選択に関わる重要なツールとなると考えられる。

略語表

ARID1A	AT-rich interactive domain 1A
BRAF	B-Raf proto-oncogene serine threonine kinase
CA19-9	carbohydrate antigen 19-9
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CI	confidence interval
CRP	C-reactive protein
cfDNA	cell-free DNA
ctDNA	circulating tumor DNA
CTNNB1	catenin beta 1
DUPAN2	duodenal pancreatic cancer antigen 2
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EIA	enzyme immunoassay
EUS-FNA	endoscopic ultraSound-guided fine needle aspiration
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
GNAS	GNAS complex locus
GPS	glasgow prognostic score
GPT	guanosine triphosphate
HE	hematoxylin and eosin
IDH1	isocitrate dehydrogenase 1
IHC	immunohistochemistry
KDM6A	lysine demethylase 6A
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
m-GPS	modified glasgow prognostic score
NLR	neutrophil lymphocyte ratio
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PLR	platelet lymphocyte ratio
PNI	prognostic nutritional index
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RB	retinoblastoma
RMB10	RNA-binding motif 10
RNF43	ring finger protein 43
SF3B1	splicing factor 3b subunit 1

SMAD4	SMAD family member 4
STK11	serine threonine kinase 11
TGFBR	transforming growth factor beta receptor
TP53	tumor protein p53
WT	wild type

緒言

膵癌の臨床的特徴

厚生労働省発表の人口動態統計によると、膵悪性腫瘍による年間死亡者数は年々増加傾向にあり、2023年の統計では40174人であった。浸潤性膵管癌（以下、膵癌）による死亡は全癌死の10.5%程度を占め、男性では肺癌、大腸癌、胃癌に次いで第4位であり、女性では大腸癌、肺癌に次いで第3位である。また、罹患数は男女ともに増加している（厚生労働省, 2023）。膵癌の5年生存率は12%程度で、極めて予後不良の悪性腫瘍である（国立研究開発法人国立がん研究センター, 2023）。これは、欧米諸国でも同様の傾向が認められる（Rahib L et al, 2014 ; Majumder S et al, 2019）。その理由として、①ある程度進行するまで無症状のため早期発見が難しく、80～85%の症例が初診断時すでに遠隔転移や局所進行のため根治切除不能であること（Donghui et al, 2004 ; Vincent et al, 2011）、②根治切除できたとしても、診断時には癌細胞はすでに全身に広がっている可能性が高く、多くの遺伝子変異が蓄積した段階での播種であるため、術後早期に高率で遠隔転移再発を来すこと（Yachida et al, 2010）、③転移した膵癌への化学療法・放射線療法の奏効率が低いことがあげられる。

膵癌は、近年の画像診断の進歩にもかかわらず、腫瘍の切除可能性の正確な評価と外科的切除後の生存率の推定は困難な側面がある（McGuigan et al, 2018）。安全で効果的な化学療法の選択肢が増えた現在、外科的切除の候補を選択するための戦略を、さまざまな種類のパラメーターを組み合わせ、適切かつ定量的に評価することが求められている（Mizrahi et al, 2020）。

膵癌におけるバイオマーカー

膵癌の臨床的特徴から、生存予測や治療法の決定に関わるバイオマーカーが必要である。非侵襲的に得られる因子のうち、血清アルブミン値、C-reactive protein（CRP）に基づく指標である modified glasgow prognostic score（m-GPS）は、膵癌を含む癌の患者予後を予測することが可能である（Jamieson NB et al, 2011 ; Imaoka H et al, 2016）。手術が行われた12のコホートのメタアナリシスでは、膵癌における好中球とリンパ球の比率が有意な予後予測因子であることが示されている（Zhou Y et al, 2018）。また、ctDNA（circulating tumor DNA）などのリキッドバイオプシーや、エクソソーム解析などを用いて外科的切除後の短期・長期予後を予測する試みも相当数行われているが、単一の指標では生存予測が困難なのが現状である（Melo SA et al, 2015 ; Krantz BA et al, 2018）。carbohydrate antigen 19-9（CA19-9）は、膵癌の診断および腫瘍切除後の再発予測に汎用され、最も有効な血清腫瘍マーカーである（Kim J et al, 2017 ; Mizrahi

JD et al, 2020)。一方で、CA19-9 は血液型抗原ルイス A にシアル酸が付加した糖鎖抗原であるため、5-10%に存在するルイス血液型陰性者では癌化によっても上昇しない偽陰性を呈することが知られている (Luo G et al, 2017)。膵癌の有効なバイオマーカーとして CA19-9 は欠かすことが出来ず、それに付随するマーカーが必要とされる。

膵癌におけるゲノム解析

膵癌のマーカーの一つとして、癌化に関連する遺伝子変異があげられる。腫瘍ゲノム解析は患者の転帰を正確に予測するために有用であり、癌遺伝子 *v-Ki-ras2* Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) と 3 つの癌抑制遺伝子 tumor protein p53 (*TP53*)、SMAD family member 4 (*SMAD4*)、cyclin dependent kinase inhibitor 2A (*CDKN2A*, p16Ink4a タンパク質をコードする遺伝子) は膵癌において高頻度に変異を認める主な遺伝子であり、膵癌の BIG4 ドライバー遺伝子と呼ばれ、大規模コホートを含むいくつかの研究において検証されている (Yachida et al, 2012 ; Hayashi et al, 2017 ; Qian et al, 2018)。ある特定のタイプの *KRAS* 変異 (*KRAS* G12D) は予後不良と関連していることも報告されている (Dan A et al, 2017 ; Qian et al, 2018)。また、全ゲノムシーケンスにより、AT-rich interactive domain 1A (*ARID1A*) や RNA-binding motif 10 (*RBM10*) のような稀な変異が予後を左右する可能性があることも示されている (Witkiewicz et al, 2015)。

膵癌のドライバー遺伝子

膵癌は膵管上皮細胞が発生母地と考えられている悪性腫瘍で、その発癌過程としていくつかの重要な遺伝子変異が起り、段階を踏みながら発生するとされている (図 1)。つまり、正常膵管上皮細胞に遺伝子異常が蓄積していくと、前癌病変である膵上皮内腫瘍性病変 (pancreatic intraepithelial neoplasia, 以下, PanIN) を経て多段階的に異型度が高まり浸潤癌に至ると考えられている (Marita et al, 2006)。BIG4 ドライバー遺伝子の変異は膵癌の癌化に特徴的であり、*KRAS* は膵癌化の最も早期に、かつ高率に変異が認められる遺伝子であり、PanIN-1A 病変の 30%以上に認められる。さらに異型度が増すに従って *KRAS* 変異の頻度が高くなり、膵癌病変では 90%以上に *KRAS* 変異を認める。変異型 *KRAS* タンパク質は、細胞増殖に関与するシグナル経路を持続的に活性化し、細胞増殖を促進する (Tape et al, 2016)。*TP53* の変異は膵癌の 50~70%に認められ、相同染色体の片側の変異や欠失によるものが多い。*TP53* がコードする p53 タンパク質は、DNA に損傷が生ずると G1, G2 期で細胞周期を停止させる。また、p53 タンパク質は、修復不能な遺伝子の損傷を検出し、細胞死や

アポトーシスへと誘導する (Weissmueller et al, 2014)。SMAD4 がコードする SMAD4 タンパク質は, transforming growth factor- β (TGF- β) シグナル伝達の調節因子である。異常が生じると TGF- β の細胞増殖抑制作用が消失し, 細胞増殖が促進されると考えられている (Ming et al, 2018)。TP53 や SMAD4 の変異は PanIN3 病変から観察され, 膵癌化過程の後期に起こるものと考えられている。p16 タンパク質をコードする CDKN2A に変異が起こると retinoblastoma (RB) タンパク質のリン酸化が起こり, 細胞周期が G1 から S 期に移行する。その結果, 細胞分裂が誘導・促進されると考えられ, PanIN-1B 以降の中間段階から CDKN2A 変異が認められることが多い (Kimura et al, 2021)。

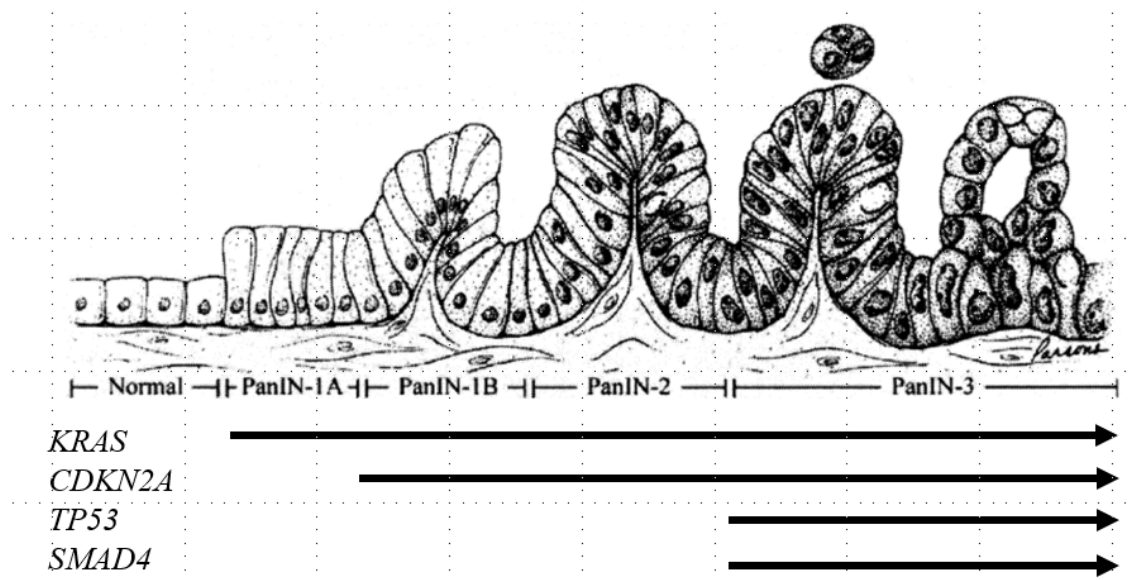


図1 PanIN 分類と多段階発癌モデル (Schneider et al, 2005 より引用)

矢印は各 BIG4 遺伝子変異の見られる PanIN の段階を示している。段階的に遺伝子変異が発生し, その度に異型度が増し, 浸潤癌に至ると考えられている。

PanIN : pancreatic intraepithelial neoplasia 膵上皮内腫瘍性病変

本研究の目的

現状, タンパク質や遺伝子に基づく多くのバイオマーカーが評価されているが, 予後指標としてのエビデンスは, 一定のコンセンサスが得られていない (Qian et al, 2020)。また, 癌抑制遺伝子変異は, 機能喪失表現型をもたらすことが知られているが, 一部の癌抑制遺伝子の機能を考慮すると, ミスセンス変異はトランケート変異よりも予後不良に関連する可能性がある」と報告されてい

る (Maddalena et al, 2021)。卵巣癌において、*TP53* の特徴的なミスセンス変異が、他のミスセンス変異やトランケート変異に比べ生存率及び無再発生存率の悪化との関連が示されている (Tuna et al, 2020)。一方で、*TP53* が *BIG4* ドライバー遺伝子である膵癌では、変異形式と予後の関連については分析がされていない。

すなわち、膵癌ではゲノム解析の有用性が検証されており、多くのバイオマーカーが評価されているが、単一指標では予後予測が困難であった。そこで今回、ゲノムプロファイルに臨床パラメーターを加えることで予後予測が可能かどうかを検討し、膵癌患者の新たな予後予測モデルを開発することを目的とした。特にゲノムプロファイルには予後が大きく異なる二群を抽出して行うことで、予測に有用な変異が同定できる可能性を考え、上記の検討を行った。

対象と方法

研究デザイン

北海道大学病院消化器外科学教室Ⅱにて 2000 年から 2018 年の間に外科的に膵臓を切除され、インフォームドコンセントを得た膵癌患者を対象とした。本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、北海道大学病院倫理委員会の承認 (研究番号: 016-009) のもとに行った。310 名の患者を対象に後方視的に検討した。膵臓を専門領域とする病理専門医が、入手したすべての組織スライドを精査し、TNM ステージで診断を確定した (Sobin et al, 2011 ; Isaji et al, 2018)。神経内分泌腫瘍、腺房細胞癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍や膵粘液性嚢胞腫瘍由来の管状腺癌は、通常型膵癌と比較して予後が異なるため除外した。採血データは、手術直前に採取した血清に統一した。血清腫瘍マーカーの CA19-9 と duodenal pancreatic cancer antigen 2 (DUPAN2) は、enzyme immunoassay (EIA) 法にて測定した。CA19-9 において、ルイス血液型表現型が陰性と考えられる患者は DUPAN2 で代用した (Sunagawa et al, 2020)。具体的には、CA19-9<5 U/mL の患者はルイス血液型表現型陰性の可能性を考慮し、DUPAN2>300U/mL 以上であれば CA19-9>100U/mL に相当するとした (Kondo et al, 2017)。

外科的切除後 6 ヶ月未満に死亡した患者 (n=22) は、手術時に潜在的転移が存在した可能性や周術期合併症の可能性など、極短期間での現病再発死亡以外の要因が多いと考え、研究に含めなかった。また、早期再発死亡例と明確なサブセットでの比較を考え、術後 5 年以上生存した患者を長期生存例として設定し、術後 12-59 ヶ月生存した患者 (n=192) を除外した。以上より、膵癌切除を受け 6-12 ヶ月生存した患者 (n=41) と、5 年以上生存した患者 (n=55) の 2 つのサブセットにおいて比較検討を行った。前者では、他の疾患で死亡した 12 例を除外した。後者では、病理学的に完全奏効した 2 例が、変異プロファイリングに必要な腫瘍組織の確保が困難なため除外した。この 2 つのサブセットのうち 16 症例は、DNA 精製 (n=5) およびライブラリ調製 (n=8) の不成功とフォローアップデータの欠落 (n=3) のために除外した。最終的に、早期再発死亡例 34 例と長期生存例 32 例がこの研究に登録された (図 2)。

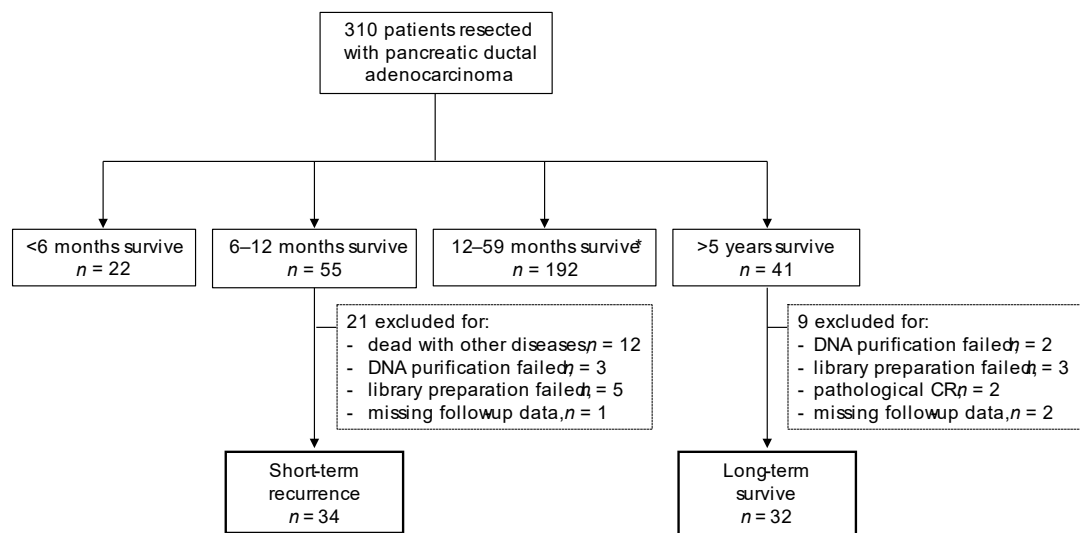


図2 研究デザイン，早期再発死亡例 34 名と長期生存例 32 名を解析

バリデーションコホートは，上記コホート後の 2013 年から 2018 年の間に膵癌切除術を受け，術後 6-12 ヶ月生存した早期再発死亡例 11 名と，病理学的に完全奏効した患者を除く，術後 5 年以上生存した長期生存例 10 名が登録された。いずれも DNA 精製やライブラリ調整に問題はなく，解析可能であった。

組織切片の選択

外科的に切除された原発性腫瘍の腫瘍最大断面を含む formalin-fixed paraffin-embedded（ホルマリン固定パラフィン包埋，FFPE）ブロックを，腫瘍細胞含有量の高い生存浸潤区画を含むように，各患者で選択した。DNA 精製目的には 10 μm に，免疫組織化学染色目的には 4 μm に薄切した。シーケンスでの変異抽出のためのコントロール健常部として，膵頭十二指腸切除が施行された検体は十二指腸を，膵体尾部切除が施行された検体は脾臓を選択した。

免疫組織化学染色

hematoxylin and eosin (HE) 染色と各種の免疫組織化学染色を施行した。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 p53 抗体 (clone DO-7, 1:100 ; Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA), 抗 p16 抗体 (clone E6H4, 1:100 ; Roche mtm laboratories AG, Heidelberg, Germany), 抗 SMAD4 抗体 (clone B-8, 1:100 ; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いて、二次抗体はシンプルシステイン MAX-PO (MULTI) (NICHIREI BIOSCIENCES, JPN) を使用し、発色には DAB 基質キット (NICHIREI BIOSCIENCES, JPN) を用いた。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。

p53 の発現消失 (Completely absent) と過剰発現 (Overexpression), SMAD4 の発現消失と弱い発現 (ハプロ不全を示す), p16 の発現消失と過剰発現を、独立した 2 名の病理専門医が評価した (Omori et al, 2019)。不一致の症例は 2 名の病理専門医で再検討を行った (図 3)。

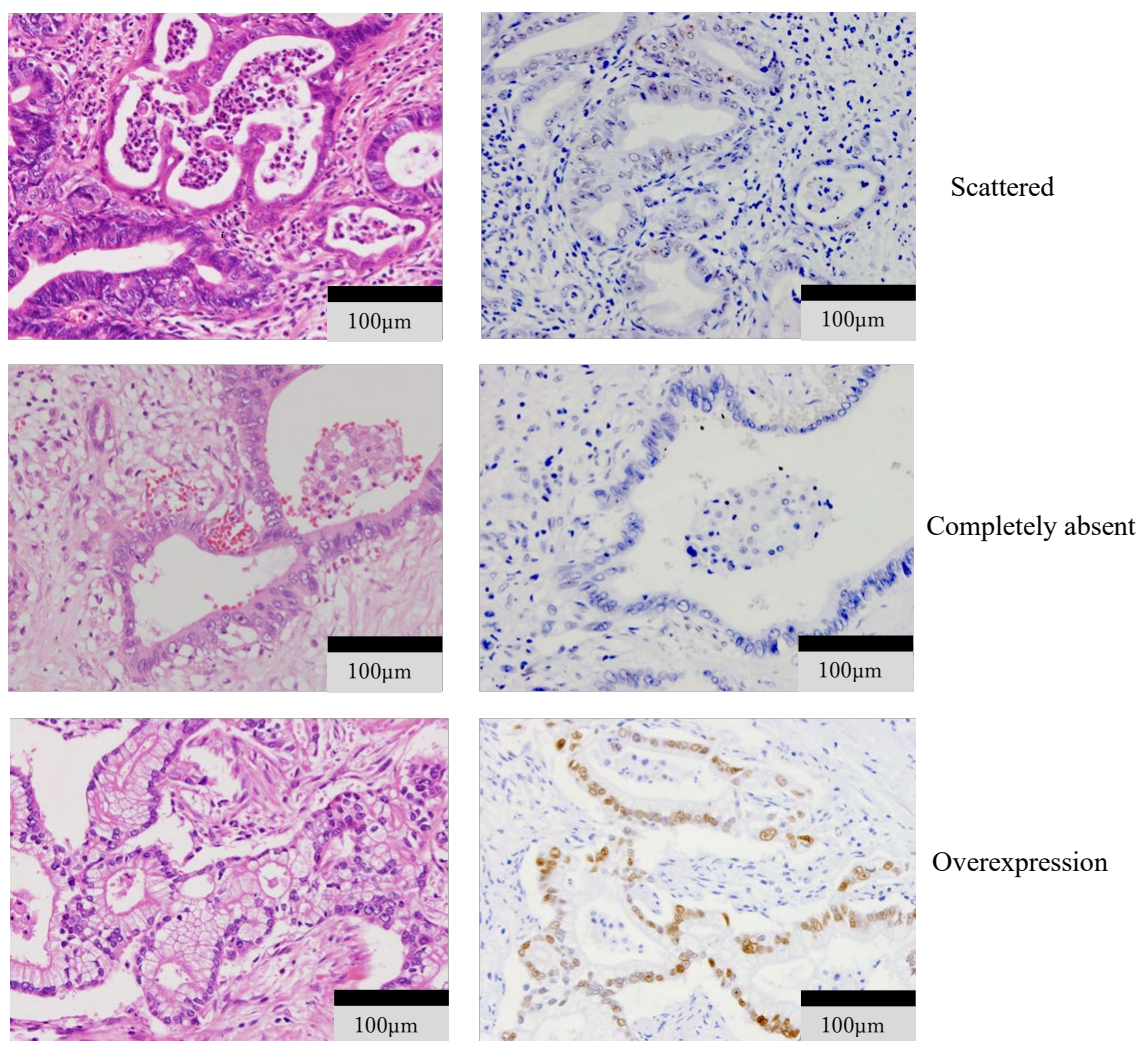


図 3 典型的な p53 免疫染色パターン（左：HE 染色，右：p53 免疫染色）

ゲノム DNA 抽出

HE 染色にて病変部位をマッピングし，同スライドを重ねて未染スライドの腫瘍部あるいはコントロールの十二指腸粘膜または脾臓実質をマッピングした（図 4）。それを切り出し採取した FFPE 検体から，GeneRead DNA FFPE Kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いてゲノム DNA を抽出した。

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。

術後年数が経過した検体は DNA 抽出に難渋し，FFPE 検体採取のスライド枚数を増やすことや，複数ブロックから採取するなど試行を重ねることで精製が可能となったものもあった。

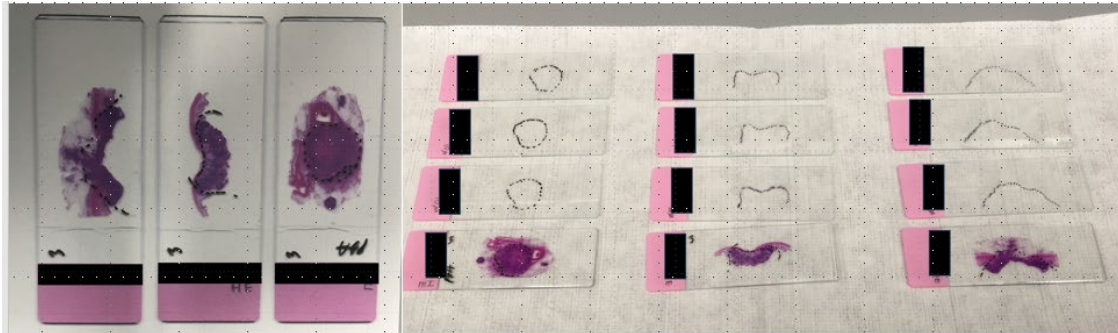


図 4 HE 染色スライドと未染スライドマッピング

変異検出アッセイ

腫瘍変異プロファイルは、Ion Personal Genome Machine および Ion GeneStudio S5 システムを用い、膀胱癌関連遺伝子パネルを使用し、18 の膀胱癌関連遺伝子（*KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*, *GNAS* complex locus (*GNAS*), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*), transforming growth factor beta receptor 1 (*TGFBR1*), *TGFBR2*, ring finger protein 43 (*RNF43*), B-Raf proto-oncogene serine threonine kinase (*BRAF*), mitogen-activated protein kinase kinase 4 (*MAP2K4*), *ARID1A*, lysine demethylase 6A (*KDM6A*), splicing factor 3b subunit 1 (*SF3B1*), serine threonine kinase 11 (*STK11*), *RBM10*, isocitrate dehydrogenase 1 (*IDH1*) および catenin beta 1 (*CTNNB1*) に対し標的のアンプリコンシーケンスを行い、決定した。同パネルは 220 個のアンプリコンで構成され、合計 17.8 kb の DNA で対象領域の 99.59% をカバーした。

シーケンスライブラリ調整と IonPGM システム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、前項目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、quantitative polymerase chain reaction (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。

統計解析

臨床データ, 病理学的因子, シーケンスデータと予後の関連性は, 単変量解析と多変量解析共にロジスティック回帰分析を用いて評価された。統計的検出力の評価には c 統計値を用いた。cBioPortal web (<https://www.cbioportal.org>) を通じて TCGA データを用い, Kaplan-Meier 法により *TP53* 変異形式の違いによる生存率を推定し, 一般化 Wilcoxon 検定によりハザードの差を求めた (Liu et al, 2018)。Cochran-Armitage 検定は 2 値データの傾向性の評価に用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。変異と免疫組織化学プロファイル間の一致の評価については, Cohen's kappa を用いた。統計解析またはバイオインフォマティクス解析は, SAS Studio Release 3.8 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を利用し, 両側, 5%の有意水準および 95%の Confidence interval (CI) で実施した。グラフの一部は Prism ソフトウェア (バージョン 9 ; GraphPad Prism Inc, San Diego, CA, USA) を使用して作成した。

結果

1 CA19-9 についてルイス血液型表現型陰性を考慮した DUPAN2 との関連

既報を元に CA-19-9 のカットオフ値を 100U/mL に設定した (Nakamura et al, 2019)。CA19-9<5 U/mL 患者 7 名の DUPAN2 レベルを分析したところ、長期生存例 4 例とも 300U/mL 未満であったが、早期再発死亡例は 3 例とも 300 U/mL 以上であった ($p=0.029$) (表 1)。

表 1 CA19-9<5 U/mL の患者 7 名の DUPAN2 の分布と解析

CA19-9 <5 (n=7)	U/mL	Short-term	Long-term	p-value
		recurrence $n = 3$	survive $n = 4$	
DUPAN2	<300	0	4	0.029
	≥300	3	0	

2 臨床学的特徴

外科的切除後の膵癌患者の生存を予測する他の既知の術前因子のうち、アルブミン (Alb, 3.9 対 4.2, $p<0.001$) および予後栄養指数 (PNI, prognostic nutritional index, 45.2 対 49.8, $p=0.002$) は、いずれも早期再発死亡例が有意に低値であった。長期生存例では補助化学療法が実施されている症例が多く ($p=0.030$)、腫瘍が膵体尾部に存在した症例が多かった ($p=0.003$)。また、早期再発死亡例の方が手術時の年齢 (69.0 対 64.5, $p=0.129$) が高い傾向があり、mGPS ($p=0.093$) が低い傾向があった (表 2)。

表 2 患者背景データと早期再発死亡例，長期生存例の分布

		Short-term recurrence* <i>n</i> = 34	Long-term survive* <i>n</i> = 32	p-value
Sex	Male	19 (55.9%)	13 (40.6%)	0.231
	Female	15 (44.1%)	19 (59.4%)	
Age		69.0 (44–84)**	64.5 (45–76)**	0.129
Location	Head	29 (85.3%)	16 (50%)	0.003
	Body–Tail	5 (14.7%)	16 (50%)	
CEA	≤5	16 (50.0%)	21 (67.7%)	0.203
	>5	16 (50.0%)	10 (32.3%)	
	n/a	2	1	
CA19-9	≤100	10 (30.3%)	28 (87.5%)	<0.001
	>100	23 (69.7%)	4 (12.5%)	
	n/a	1	0	
Albumin		3.9 (2.5–4.5)**	4.2 (3.6–4.8)**	0.002
CRP		0.24 (0.02–8.09)**	0.21 (0–6.89)**	0.334
GPS	0	27 (79.4%)	28 (87.5%)	0.513
	1-2	7(20.6%)	4 (12.5%)	
mGPS	0	22 (64.7%)	27 (84.4%)	0.093
	1-2	12 (33.3%)	5 (15.6%)	
NLR	>2.5	11 (44.0%)	16 (61.5%)	0.267
	≤2.5	14 (56.0%)	10 (38.5%)	
	n/a	9	6	
PLR	>150	24 (96.0%)	26 (100%)	0.490
	≤150	1 (4.0%)	0	
	n/a	9	6	
PNI	>40	17 (68.0%)	26 (100%)	0.002
	≤40	8 (32.0%)	0	
	n/a	9	6	
Neoadjuvant chemotherapy	–	32 (94.1%)	31 (96.9%)	1.0
	+	2 (5.9%)	1 (3.1%)	
Adjuvant chemotherapy	–	21 (61.8%)	11 (34.4%)	0.030
	+	13 (38.2%)	21 (65.6%)	
Date of surgical resection	2000–2007	23 (67.6%)	19 (59.4%)	0.610
	2008–2015	11 (32.4%)	13 (40.6%)	

*All patients were Asian.

**Values indicte median (range) unless otherwise stated.

3 病理学的因子

早期再発死亡例，長期生存例での病理学的因子について検討した。リンパ節転移 ($p<0.001$)，pStage ($p<0.001$)，門脈侵襲 ($p=0.020$) の3項目に有意差を認めた。また，早期再発死亡例の方が術前 CT での腫瘍径が大きい傾向があった ($p=0.125$) (表 3)。

表 3 病理学的因子と早期再発死亡例，長期生存例の分布

		Short-term recurrence <i>n</i> =34	Long-term survive <i>n</i> =32	p-value
cTumor size	≤20mm	9 (26.5%)	15 (46.9%)	0.125
	>20mm	25 (73.5%)	17 (53.1%)	
pT	1	0	1 (3.1%)	0.703
	2	1 (2.9%)	1 (3.1%)	
	3	32 (94.1%)	28 (87.5%)	
	4	1 (2.9%)	2 (6.3%)	
pN	–	5 (14.7%)	18 (56.3%)	<0.001
	+	29 (85.3%)	14 (43.8%)	
pStage (UICC 7th)	IA	0	1 (3.1%)	<0.001
	IB	0	1 (3.1%)	
	IIA	5 (14.7%)	16 (50%)	
	IIB	28 (82.4%)	13 (40.6%)	
	III	0	1 (3.1%)	
	IV	1 (2.9%)	0	
pS	–	12 (36.4%)	11 (34.4%)	1.0
	+	21 (63.6%)	21 (65.6%)	
	n/a	1	0	
pRP	–	12 (36.4%)	12 (37.5%)	1.0
	+	21 (63.6%)	20 (62.5%)	
	n/a	1	0	
pOO	–	30 (90.9%)	32 (100%)	0.239
	+	3 (9.1%)	0	
	n/a	1	0	
pPL	–	13 (39.4%)	17 (53.1%)	0.324
	+	20 (60.6%)	15 (46.9%)	
	n/a	1	0	
pA	–	33 (100%)	30 (93.8%)	0.239
	+	0	2 (6.3%)	
	n/a	1	0	
pPV	–	18 (52.9%)	26 (81.3%)	0.020
	+	16 (47.1%)	6 (18.8%)	

4 *KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A* 変異の検討

既報では、*KRAS* 変異が膵癌における生存の独立した予後因子であることが実証されている (Bournet et al, 2016)。本研究では早期再発死亡例 32 名 (94.1%) と長期生存例 31 名 (96.9%) で *KRAS* 変異が観察された。解析の結果本研究では、*KRAS* 野生型 (Wild-type, WT) と *KRAS* 変異型との間で転帰に有意差はなかった ($p=1.0$)。また、他のタイプの *KRAS* 変異よりも予後不良と関連すると報告されている *KRAS* G12D 変異についても、本研究では有意差はなかった (Bournet et al, 2016 ; Qian et al, 2018 ; McIntyre et al, 2020) (表 4)。

表 4 *KRAS* 変異の早期再発死亡例，長期生存例の分布

		Short-term recurrence <i>n</i> = 34	Long-term survive <i>n</i> = 32	p-value
<i>KRAS</i>	Wild-type	2 (5.9%)	1 (3.1%)	1.0
	Mutant	32 (94.1%)	31 (96.9%)	
	G12D	14	16	
	G12V	13	8	
	G12R	3	3	
	Q61H/L/R	1	3	
	Other type	1	1	

TP53 変異は、統計学的に有意差はなかった ($p=0.070$) が、長期生存例 (17/32, 53.1%) よりも早期再発死亡例 (26/34, 76.5%) でより多く見られた。*SMAD4* 変異は、早期再発死亡例に多く認めた (12/34, 35.3% vs 1/32, 3.1%) ($p=0.001$)。対称的に、*CDKN2A* 変異には有意差はなかった (表 5)。

表 5 *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A* 変異の早期再発死亡例，長期生存例の分布

			Short-term recurrence <i>n</i> = 34	Long-term survive <i>n</i> = 32	p-value
<i>TP53</i>	Wild-type		8 (23.5%)	15 (46.9%)	0.070
	Mutant		26 (76.5%)	17 (53.1%)	
		Truncating	5	5	
		Missense	21	12	
<i>SMAD4</i>	Wild-type		22 (64.7%)	31 (96.9%)	0.001
	Mutant		12 (35.3%)*	1 (3.1%)	
		Truncating	4	0	
		Missense	5	1	
		Deep deletion	4	0	
<i>CDKN2A</i>	Wild-type		26 (76.5%)	24 (75%)	1.0
	Mutant		8 (23.5%)	8 (25%)	
		Truncating	4	3	
		Missense	2	3	
		Deep deletion	2	2	

*both truncating mutation and deep deletion were detected in 1 case

5 主要な癌抑制遺伝子における変異形式と免疫組織学的プロファイルとの関係

本研究では早期再発死亡例の割合は *TP53* WT，トランケート変異，ミスセンス変異の順で増加していた ($34.8\% < 50\% < 63.6\%$, $p=0.024$)。p53 免疫染色パターンに有意差はなかった (Scatter 42.9%, Completely absent 36.3%, Overexpression 63.9%, $p=0.115$) (図 5)。

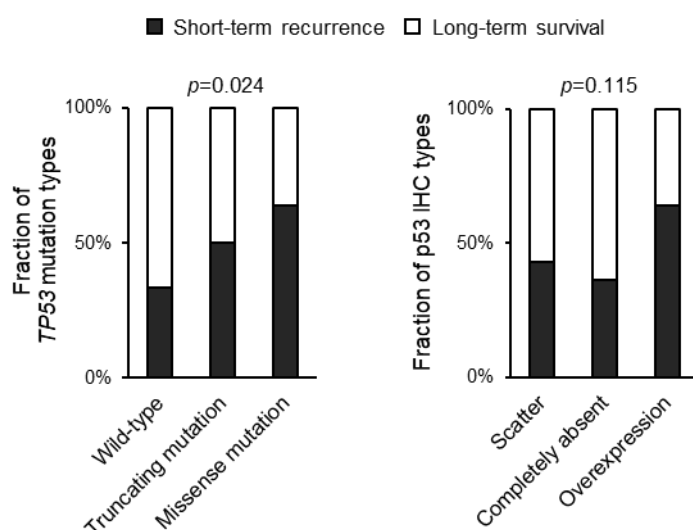


図 5 *TP53* 変異，p53 免疫染色と早期再発死亡例，長期生存例の傾向解析
Cochran-Armitage 検定

より大規模なコホートを使用して、ミスセンス変異とトランケート変異の違いを検証するために、149 名の患者からの腫瘍および正常組織の配列決定結果を含む The Cancer Genome Atlas (TCGA) データセットを利用した (Liu et al, 2018)。ミスセンス変異例はトランケート変異例に比べ予後不良であった (ハザード比 1.717 ; 95% CI, 0.973-3.028 ; 一般化 Wilcoxon 検定, $p=0.043$) (図 6)。

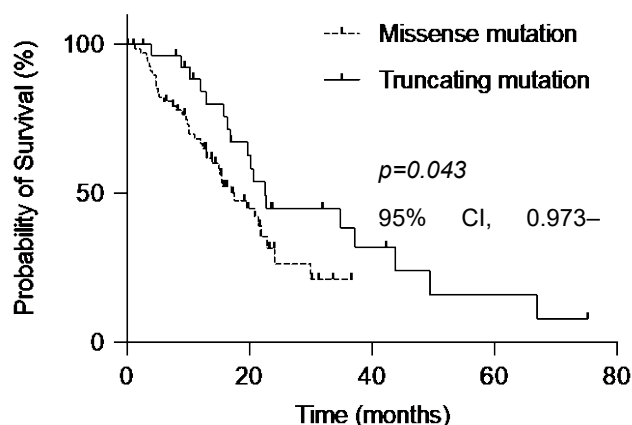


図 6 TCGA データセットでのミスセンス変異とトランケート変異の生存曲線

また、*KRAS* G12D 変異に焦点を当て解析を行うと、有意差はなかったが *TP53* のミスセンス変異例が、長期生存例(37.5%)と比較して、早期再発死亡例でより多くみられた(64.3%)。*SMAD4* と *CDKN2A* では特に差はなかった (表 6)。

表 6 *KRAS* G12D 変異を持つ例の *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A* の分布

		Short-term recurrence $n = 14$	Long-term survive $n = 16$	p-value
<i>TP53</i>	Wild-type	2 (14.3%)	7 (43.8%)	0.223
	Truncating mutation	3 (21.4%)	3 (18.8%)	
	Missense mutation	9 (64.3%)	6 (37.5%)	
<i>SMAD4</i>	Wild-type	9 (64.3%)	16 (100%)	1.00
	Truncating mutation	4 (28.6%)	0	
	Missense mutation	1 (7.1%)	0	
<i>CDKN2A</i>	Wild-type	11 (78.6%)	12 (75.0%)	1.00
	Truncating mutation	3 (21.4%)	3 (18.8%)	
	Missense mutation	0	1 (6.3%)	

さらに、変異と免疫染色の関連を探ると、*TP53* ミスセンス変異は *p53* の過剰発現と高度に相関していた。逆に、*TP53* トランケート変異例のほとんどは、この腫瘍抑制タンパクが完全に欠如していることが示された。また、一部の *TP53*WT では、*p53* 発現の異常が観察された。全体として、*TP53* 変異の種類と免疫染色パターン間の関係は相関していた (Kappa=0.780, 95% CI 0.642-0.917)。ただし、早期再発死亡例と長期生存例との関連では、変異プロファイルの方が免疫染色に比し、より優れた結果であった (図 3, 5, 7, 8)。

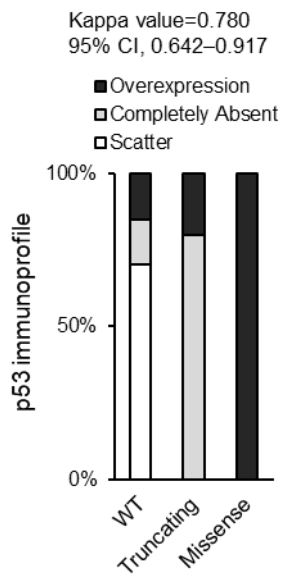


図 7 *TP53* 変異と *p53* 免疫染色の関連 : Cohen's Kappa

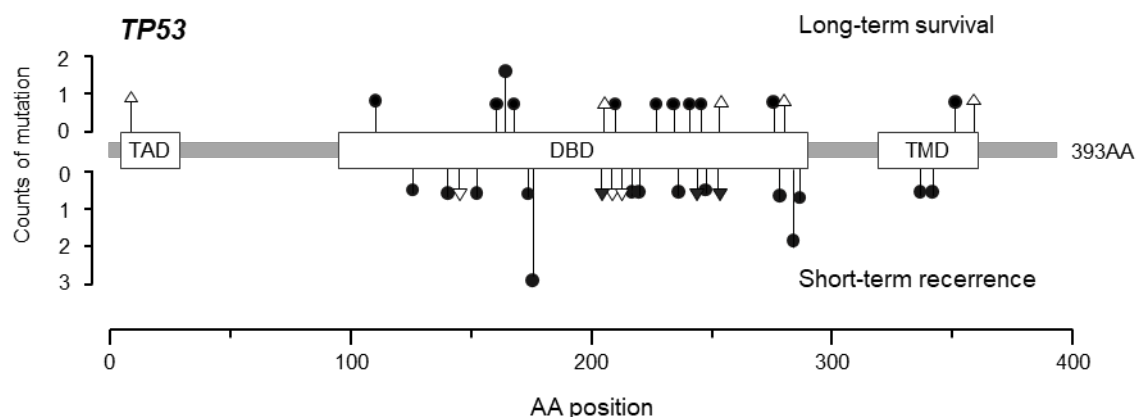


図 8 変異位置，形式と度数を示す *TP53* 遺伝子の概略図

上方が長期生存例，下方に早期再発死亡例として，縦軸に度数をプロットした。変異形式は形状で表示した（円：ミスセンス変異，三角：トランケート変異）。タンパク質発現パターンは色で表示した（黒：Overexpression，白：Completely absent）。具体的には，ミスセンス変異例は全て Overexpression を呈したため，円形は全て黒色で示した。

SMAD4 ミスセンス変異は，長期生存例（患者 1/32，3.13%）よりも早期再発死亡例（患者 5/34，14.7%）でより多くみられた。変異形式に関わらず *SMAD4* 変異の有無でみると，長期生存例（患者 1/32，3.13%）よりも早期再発死亡例（患者 12/34，35.3%）で有意に多く認めた（ $p=0.001$ ）（表 5）。*SMAD4* では，変異と免疫染色間の関連は認めなかった（Kappa=0.010，95%CI 0.080～0.103）。*CDKN2A* については，長期生存例と早期再発死亡例でのミスセンス変異とトランケート変異の間に顕著な差は認めず，p16 の発現は変異と一致しなかった（Kappa=0.072，95%CI 0.026～0.169）（図 9）。

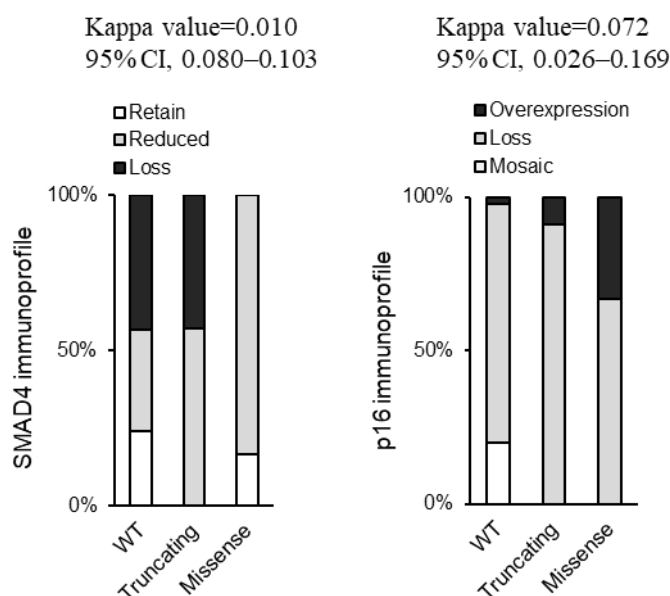


図9 *SMAD4* 変異と *SMAD4* 免疫染色, *CDKN2A* 変異と p16 免疫染色の関連 :
Cohen's Kappa

6 主要な膀胱癌関連遺伝子の変異スコアリング

既報では、膀胱癌の主要な変異ドライバー遺伝子 (*KRAS*, *TP53*, *SMAD4*, *CDKN2A*) の遺伝子変異数と予後との関連が示されている (Hayashi et al, 2017)。同様の傾向を本研究でも認め ($p=0.013$)、3 つ以上の変異を有する症例の割合は、長期生存例 (6/32, 18.8%) よりも早期再発死亡例 (13/34, 38.2%) の方が高かった (表 7)。

表 7 *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* の変異数と早期再発死亡例, 長期生存例の分布

		Short-term recurrence <i>n</i> = 34	Long-term survive <i>n</i> = 32	p-value
Number of mutated <i>KRAS</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>TP53</i> , and <i>SMAD4</i> genes	0	1 (2.9%)	0	0.013
	1	3 (8.8%)	13 (40.6%)	
	2	17 (50%)	13 (40.6%)	
	3	11 (32.4%)	6 (18.8%)	
	4	2 (5.9%)	0	

本研究において、*KRAS* および *CDKN2A* 変異と比較して、*TP53* および *SMAD4* 変異は早期再発死亡例に認められた。*TP53* トランケート変異よりも *TP53* ミスセンス変異に重みづけをし (0 ; WT, 1 ; トランケート変異, 2 ; ミスセンス変異), *SMAD4* 変異 (0 ; WT, 2 ; 変異) の組み合わせを用いること

で変異スコアを作成し、予後との解析を行った。同スコアは、4つの主要な膵癌関連遺伝子の変異数よりも、予後との関連がみられた ($p=0.004$) (表 8)。変異の重みづけにおいて、各指標の点数の決定には試行錯誤を要した。実際には *SMAD4* 変異 (0 ; WT, 1 ; 変異) での重みづけや、*KRAS*, *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* の変異数を尺度にすることをそれぞれ試した。重複がなく、最も有意差が高くなったものを変異スコアとして最終決定した。

表 8 *TP53* (変異形式で重みづけ) と *SMAD 4* 変異有無とを組み合わせた変異スコアの分布

		Short-term recurrence <i>n</i> = 34	Long-term survive <i>n</i> = 32	p-value
<i>TP53</i> and <i>SMAD4</i> mutation score*	0	6 (17.7%)	14 (43.8%)	0.004
	1	4 (11.8%)	5 (15.6%)	
	2	14 (41.2%)	13 (40.6%)	
	3	1 (2.9%)	0	
	4	9 (26.5%)	0	

*mutation score; *TP53* (0; WT, 1; truncating mutation, 2; missense mutation) + *SMAD4* (0; WT, 2; mutation)

7 術前測定可能な因子を使用した外科的切除後の膵癌予後予測のモデリング

以上の結果を考慮し、術前に測定可能なモデルの作成を試みた。表 2 および表 3 に示すパラメーターから、ロジスティック回帰分析を使用して該当する因子を抽出した。リンパ節転移の存在や門脈転移などの病理学的要因は、長期生存例よりも早期再発死亡例で多くみられたが、術前画像所見に基づいて正確に評価することが困難であるため、これらの要因は除外した (Elshaer et al, 2017 ; Kang et al, 2020)。単変量解析で年齢、腫瘍部位、CA19-9、アルブミン、腫瘍サイズ、*TP53* と *SMAD4* を使用した変異スコアが最終的に抽出された ($p<0.20$)。本研究のサンプルサイズとこれら 6 つの因子の多変量解析を考慮して、ロジスティック回帰分析の上位 2 つの因子 ($p<0.05$) にさらに絞り込んで解析を行った。CA19-9 ($p<0.001$, オッズ比: 21.043, 95% CI: 4.612-96.019) は、早期再発死亡例と長期生存例を区別するのに最も検出力が高く、次いで *TP53* と *SMAD4* を用いた変異スコアが有意であった ($p=0.005$, オッズ比: 41.322, 95% CI: 3.156-541.035) (表 9)。

CA19-9 におけるルイス血液型表現型陰性の可能性から、CA19-9 に万能性があるわけではないと考えて、DUPAN2 数値での代用を行わないデータでの検討も行った。各種データでの検討を比較し、最終的にルイス血液型表現型陰性を DUPAN2 で代用しての CA19-9 と、*TP53* と *SMAD4* を使用した変異スコアでのモデルが最も有用と考えた。

表 9 早期再発死亡例，長期生存例の関連因子の単変量解析および多変量解析

Characteristics			Short-term recurrence <i>n</i> = 34	Long-term survival <i>n</i> = 32	Univariate analysis p-value	Multivariate analysis p-value (6 factors)	Multivariate analysis p-value (2 factors)	Odds ratio (95% CI)
Clinical and Pathological findings								
	Age		69.0 (44–84)*	64.5 (45–76)*	0.129	0.686		
	Location	Head	29 (85.3%)	16 (50%)	0.003	0.153		
		Body–Tail	5 (14.7%)	16 (50%)				
	CA19-9	≤100	10 (30.3%)	28 (87.5%)	<0.001	0.002	<0.001	21.043 (4.612–96.019)
		>100	23 (69.7%)	4 (12.5%)				
		n/a	1	0				
	Albumin		3.9 (2.5–4.5)*	4.2 (3.6–4.8)*	0.002	0.261		
	Tumor size	≤20mm	9 (26.5%)	15 (46.9%)	0.125	0.359		
		>20mm	25 (73.5%)	17 (53.1%)				
Mutation profiles								
	<i>TP53</i> and <i>SMAD4</i> mutation score**	0	6 (17.7%)	14 (43.8%)	0.001	0.023	0.005	41.322 (3.156–541.035)
		1	4 (11.8%)	5 (15.6%)				
		2	14 (41.2%)	13 (40.6%)				
		3	1 (2.9%)	0				
		4	9 (26.5%)	0				
Note;								
n/a; data not available								
*Values indicte median (range) unless otherwise stated.								
**mutation score; <i>TP53</i> (0; WT, 1; truncating mutation, 2; missense mutation) + <i>SMAD4</i> (0;WT, 2; mutation)								

次に、CA19-9 と変異スコアの 2 つの要素を使用して、長期生存を予測するための統計的検出力を評価した。CA19-9 と変異スコアそれぞれの単独の c 統計値は 0.786 と 0.719 であった。さらに、2 つの因子を使用したロジスティック回帰モデルでは、より高い c 統計値 0.876 を認めた（表 10）。

表 10 予後スコアのパラメーターと計算式

Long-term survival probability*			
Parameter	β_0	β_1	β_2
	Intercept	CA19-9 (0,1)	Mutation score (0-4)
Estimate	2.477	-3.0466	-0.9304
* Calculated based on logistic regression model with following fomula			
$P = \frac{1}{(1 + \exp(-\beta_0 - \beta_1 x_1 - \dots - \beta_i x_i))}$			

上記計算式を各症例に当てはめて、各症例の予後予測スコアを計算した。予後予測スコアの傾向性を評価するため、予測スコアにカットオフ値を設定し高値と低値の 2 群に分け、早期再発死亡例と長期生存例での分布で四分表を作成した。予後予測スコアのカットオフ値の設定に際し、30%～70%の範囲で 10% ずつ Kappa 値を計算し、同値が最も高くなる 60% をカットオフ値に設定した（図 10，表 11）。

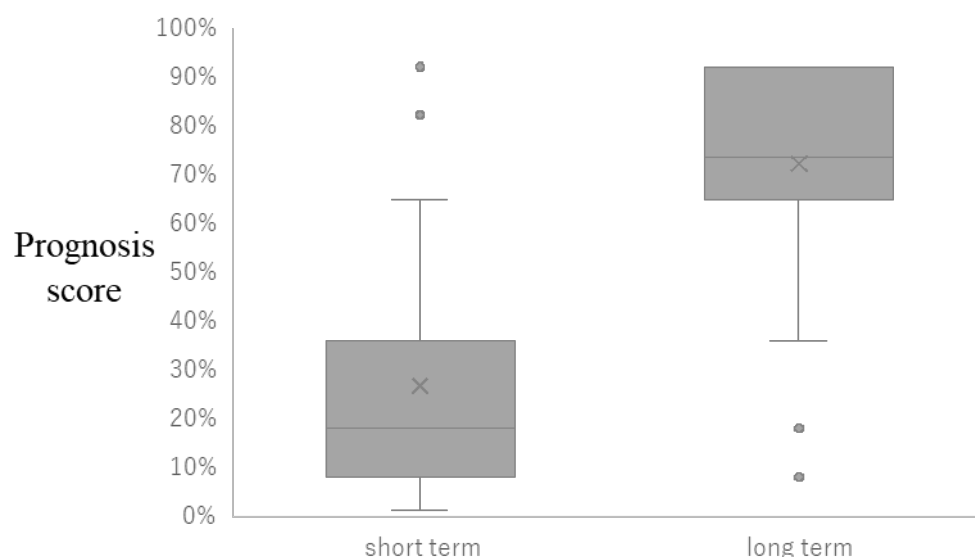


図 10 早期再発死亡例 34 例と長期生存例 32 例の予後予測スコアの分布

表 11 60%をカットオフ値とした予後予測スコアの分布

		Short-term recurrence n = 34	Long-term survive n = 32	Kappa value
Prognosis score	>60%	7	28	0.664
	≤60%	26	4	
	n/a	1	0	

作成したロジスティック回帰モデルの有効性を検証するために、本解析後の早期再発死亡例 10 例と長期生存例 11 例のバリデーショコホートを使用した。同コホートにおいても、2 つの因子を使用したロジスティック回帰モデルの予後予測の有効性が示された (Kappa=0.452) (図 11, 表 12)。

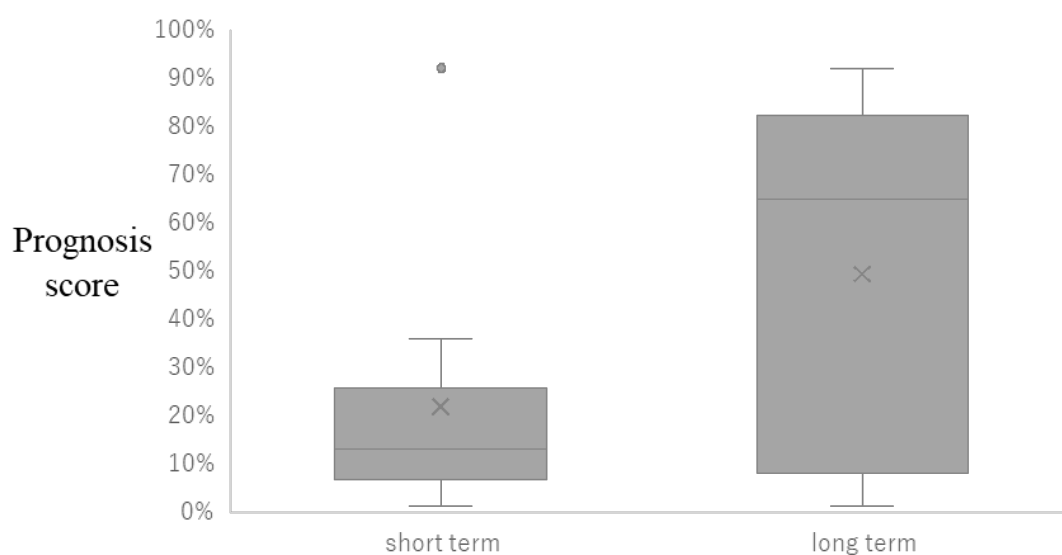


図 11 バリデーショコホートにおける早期再発死亡例 10 例と長期生存例 11 例の予後予測スコアの分布

表 12 60%をカットオフ値としたバリデーショコホートでの予後予測スコアの分布

		Short-term recurrence n = 10	Long-term survive n = 11	Kappa value
Prognosis score	>60%	1	6	0.452
	≤60%	9	5	

考察

本研究では、*TP53* 変異タイプと *SMAD4* 変異を組み合わせた変異スコアは、*KRAS* を含む遺伝子変異数よりも予後関連性が高かった（表 7, 8）。これらを用い、術前に測定可能な生存確率の指標の作成を試みた。本研究では切除標本を使用して腫瘍の体細胞変異プロファイルを取得したが、*TP53* と *SMAD4* 変異を含む同様のデータは、内視鏡超音波吸引細胞診（Endoscopic UltraSound-guided Fine Needle Aspiration, EUS-FNA）を使用して腫瘍サンプルを収集することによって、術前に取得できると想定される（Puli et al, 2013 ; Yokose et al, 2020）。診断時に採取する腫瘍サンプルは大きさとしては、少量なことが想定されるが、シーケンスは問題なく可能であると考えられる。また、EUS-FNA を使用して取得したサンプルは、本研究で使用した FFPE 固定されたものや、保存から長期間経過したものよりも、サンプルの質として優れている。本研究においても過去の検体であればあるほど、より多くのサンプルサイズが必要となり、逆に直近の症例では必要スライド数が少なかった。実際のところ、EUS-FNA 検体でのシーケンスは十分に可能であることが既報でも示されている。

本研究において、*TP53* 変異形式（ミスセンスまたはトランケート）が予後と関連があることが示された（図 5）。WT と比較して、*TP53* ミスセンス変異は早期再発死亡例でより多く見られた。また、*TP53* ミスセンス変異例と比較して、*TP53* トランケート変異例の生存期間が有意に延長していることが TCGA データを使用して検証された（図 6）。一般に、癌抑制遺伝子の機能の喪失は 2 つの対立遺伝子の欠失または不活化に応答して発生し、ナンセンスおよびフレームシフト変化により通常は切断が生じる（Wang et al, 2018）。一方で、*TP53* ミスセンス変異（R175H, R248Q/W, R275C/H など）は、*TP53*WT に対する *TP53* トランケート変異のドミナントネガティブ効果を超えた発癌機能を示す可能性がある（Hingorani et al, 2005 ; Bargonetti et al, 2019 ; Maddalena et al, 2021）。その際は機能喪失型変異と比較して、腫瘍形成性と薬剤耐性が増強される。既報では、*TP53* ミスセンス変異が、膵癌におけるグアノシン三リン酸（guanosine triphosphate, GTP）アーゼ活性化タンパク質のアイソフォームの発現を促進し RAS GTP レベルを高めることが実証された（Escobar-Hoyos et al, 2020）。ドライバー変異の特定の組み合わせが予後と治療結果に及ぼす影響を検証するためには、さらなる研究が必要である。

早期再発死亡例と長期生存例の膵癌患者の遺伝子変異と免疫染色プロファイリングを通じて、本研究でみられたもう 1 つの重要な点は、*TP53* 変異形式と発現パターンが強く一致していることである。卵巣癌での免疫染色において、元来異常とされてきた p53 発現パターンである過剰発現に加えて、完全欠損パタ

ーンが認められた (Kobel et al, 2016)。本研究では、*TP53* ミスセンス変異を持つすべての腫瘍は免疫染色では過剰発現を呈し、ほとんどのトランケート変異は免疫染色では完全欠損パターンをもたらした (図 3, 7, 8)。上記の強い一致にもかかわらず、*p53* 免疫染色パターンはこれまで十分に分類されていなかった。免疫染色プロファイルにおいて、正常と過剰発現と完全欠損パターンの違いについては、評価の共通認識が今後期待される。実際、本研究でも *TP53* WT および *TP53* トランケート変異を持つ一部の腫瘍は過剰発現として分類された。したがって、*TP53* の免疫染色ベースの評価は、変異プロファイリングによる定量的分析よりも患者の生存に関して、予測値が低い可能性がある。*TP53* 変異は、ミスセンス変異またはトランケート変異の変異形式の違いで異なる性質をもつ可能性があり、より大規模なデータセットにおける変異形式による追加の分類が必要となると考える。本研究では *SMAD4* や *CDKN2A* の変異では同様の相関関係は観察されなかったが、エピジェネティックな制御もこれらの遺伝子の腫瘍抑制因子機能の不活性化に重要な役割を果たしているためと想定される。さらに、*SMAD4* に関しては、免疫染色、特に組織の長期保存に関して技術的な困難性が存在したと考えられる。

KRAS 変異、特に *KRAS* G12D が膵癌患者の生存の独立した予後因子であることを示した既報とは対照的に、*KRAS* 変異だけでは本研究における長期生存例と早期再発死亡例の差は十分ではなかった (Yachida et al, 2012 ; Bournet et al, 2016 ; Hayashi et al, 2017 ; Qian et al, 2018)。一方で、*TP53* および *SMAD4* 変異は患者の転帰と強く関連性があつた (表 4, 5)。*KRAS* 変異と生存の間に相関関係がないのは、サンプルサイズが小さいことと、早期再発死亡例の腫瘍における *TP53* 変異の不均一性が原因である可能性を想定した (表 6)。

早期再発死亡例と長期生存例を比較するための多変量ロジスティック回帰分析の項目は、サンプルサイズから 2 または 3 因子が妥当であつた。まずは単変量解析で差のあつた 6 因子を用いて多変量解析を行い、有意差 ($p<0.05$) のあつた上位 2 つの因子 CA19-9 (>100 U/mL) および *TP53* と *SMAD4* の変異スコアを選定した。単因子として CA19-9 は生存予測に関して最も高い値を示した (c 統計値=0.786)(Kim J et al, 2017 ; Mizrahi JD et al, 2020)。約 5~10%の割合でルイス抗原陰性で、CA19-9 がマーカーとして機能しないことを考えると、CA19-9 単独ではなく他の因子も生存予測の要因に加えるべきである (Kusama et al, 2017 ; Luo et al, 2017)。変異スコアを含めて解析を行うと、長期生存例と早期再発死亡例の生存予測において高い予測力が得られた (c 統計値=0.876)。さらに、予後予測スコアは転帰と高度に相関していた ($Kappa=0.664$) (表 10, 11)。

本研究の限界として、後ろ向き研究であることがあげられる。また、本研究の対象は、外科的切除後 6~12 か月または 5 年間以上観察された膵癌患者に限

定されていた。本研究では、費用対効果が高いと考えられる差異のある 2 つのグループを分析したが、切除後の継続的な追跡期間を持つ、より大規模なコホートを使用すると、本研究では同定されなかった予後に関わる要因が明らかになる可能性がある。また、18 の膵癌関連遺伝子をカバーする 220 個のアプリコンで構成された遺伝子パネルの使用も、研究の限界として想定される。既報では、*RBM10* 変異と *ARID1A* 変異の有無が早期再発死亡例と長期生存例の転帰に強い影響を与えることが報告されているが、本研究では特に差は認めなかった (Witkiewicz et al, 2015)。10 年以上生存した患者を対象とした超長期生存例に焦点を当てた報告において、予後に関連する単一の遺伝子を同定できない結果であり、単一のマーカー遺伝子の同定が容易ではないことが想定される (Dal Molin et al, 2015)。

本研究で特定された膵癌患者に対する予後因子の検証は、より大規模な前向きコホートで行う必要がある。また、術前化学療法は膵癌患者にとっての標準的な治療選択肢となっており、化学療法と関連した予後の検証も必要とされる。最近の研究では、循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) が膵癌切除後の再発の予測に役立つ可能性があることが実証されており、そのような取り組みは術前化学療法にも有益であることが証明されている (Lee et al, 2019 ; Okada T et al, 2020)。一方で、ctDNA の検出率が高くないことが現状である

(特に stage I,II の症例では検出率が 30–40%程度と低い) (Sivapalan L et al, 2021 ; Watanabe K et al, 2022)。血中循環遊離 DNA (cell-free DNA, cfDNA) を使用した正確な変異プロファイリングは、腫瘍からの ctDNA の脱落を促進する化学療法後により効果的に実行できると考える。血液検査、治療内容、転帰の情報と、ctDNA と組み合わせた腫瘍 DNA 配列のデータベースを構築し、本データベースを研究の検証目的に世界中で利用できるようにする必要がある。

結論

＜本研究から得られた新知見＞

- ・ 膵癌術後検体を用い次世代シーケンスを行うことで、*TP53* の変異形式（トランケート変異とミスセンス変異）で生命予後に違いがあることを示した。
- ・ *TP53* の変異形式と免疫染色に強い関連があることを示した。（ミスセンス変異と過剰発現， トランケート変異と完全欠損）
- ・ 術前採取可能な *CA19-9* の値， *TP53* の変異形式と *SMAD4* 変異の有無の変異スコアを組み合わせることで， 予後予測のツールを作成した。バリデーションコホートでも有用性が示された。

＜新知見の意義＞

遺伝子変異形式と予後に関しては，膵癌領域において十分に検討されていない。本研究では *TP53* の変異形式と免疫染色との相同性も示唆されており， 予後予測の新たなツールと考えられる。本研究における予後予測モデルは術前採取可能なデータであり， 画像診断や臨床病理学的な情報に基づいて決定してきた従来の膵癌の診療方針に， 革新的な変化をもたらす可能性がある。最も効果的で適切な治療を患者に提供できることに加え， 多くの医療資源を投入する手術治療の回避を通して， 高騰する医療費の削減や， 限られた医療資源の有効活用という点で， 社会に与えるインパクトは非常に大きい。

＜本研究から得られた新知見に基づく今後の研究の展開＞

継続的な追跡期間を持つ大規模なコホートで， 前向き研究での実証が望まれる。また， 化学療法， ctDNA との関連を探ることで， 予後予測だけでなく治療内容の選択につながる新たな指標の作成にも大きな役割を果たす可能性があると考ええる。

＜今後の課題＞

膵癌加療に術前補助化学療法を行うことが一般的となった現在では， 治療介入前に予後情報を得ることが重要となる。本研究は手術検体を使用しているので， EUS-FNA による治療介入前の検体を使用したバリデーションの必要性がある。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱ 平野聡教授，ならびに旭川医科大学内科学講座 病態代謝・消化器・血液腫瘍制御内科学分野（がんゲノム医学部門）水上裕輔教授に深く感謝します。また，病理診断を御精査いただいた北海道大学 病理部/病理診断科 三橋智子先生，免疫染色の再評価を行っていただいた東北大学大学院医学系研究科 病態病理学分野 古川徹教授と大森優子助教，遺伝子解析に関する技術的御支援をいただいた札幌東徳洲会病院 角篤子氏，緒方宗彦氏，シーケンス解析に関する技術的サポートをしていただいた **Thermo-Fisher Scientific** 高橋治氏，統計学的解析の御指導をいただいた杉谷歩氏にも心から感謝申し上げます。最後に，このプロジェクトの過程を通じて有益な提案をいただき，本研究を支えて下さった，北海道大学医学研究院 消化器外科学教室Ⅱと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を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

引用文献

Bargonetti J and Prives C (2019) Gain-of-function mutant p53: History and speculation. *J Mol Cell Biol* 11, 605-609.

Bournet B, Buscail C, Muscari F, Cordelier P and Buscail L (2016) Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur J Cancer* 54, 75-83.

Bournet B, Muscari F, Buscail C, Asseant E, Barthet M, Hammel P, Selves J, Guimbaud R, Cordelier P and Buscail L (2016) KRAS G12D mutation subtype is a prognostic factor for advanced pancreatic adenocarcinoma. *Clin Transl Gastroenterol* 7, e157.

Dal Molin M, Zhang M, de Wilde RF, Ottenhof NA, Rezaee N, Wolfgang CL, Blackford A, Vogelstein B, Kinzler KW, Papadopoulos N, et al (2015) Very Long-term survival following resection for pancreatic cancer is not explained by commonly mutated genes: results of whole-exome sequencing analysis. *Clin Cancer Res* 21, 1944-1950.

Dan A, Fujii D, Soda S, Machimura T and Ike M (2017) Removal of phenol, bisphenol A, and 4-tert-butylphenol from synthetic landfill leachate by vertical flow constructed wetlands. *Sci Total Environ* 578, 566-576.

Elshaer M, Gravante G, Kosmin M, Riaz A and Al-Bahrani A (2017) A systematic review of the prognostic value of lymph node ratio, number of positive nodes and total nodes examined in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann R Coll Surg Engl* 99, 101-106.

Escobar-Hoyos LF, Penson A, Kannan R, Cho H, Pan CH, Singh RK, Apken LH, Hobbs GA, Luo R, Lecomte N, et al (2020) Altered RNA splicing by mutant p53 activates oncogenic RAS signaling in pancreatic cancer. *Cancer Cell* 38:, 198-211.

Hayashi H, Kohno T, Ueno H, Hiraoka N, Kondo S, Saito M, Shimada Y, Ichikawa H, Kato M, Shibata T, et al (2017) 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.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S and Tuveson DA (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469-483.

Imaoka H, Mizuno N, Hara K, Hijioka S, Tajika M, Tanaka T, Ishihara M, Yogi T, Tsutsumi H, Fujiyoshi T, et al (2016) Evaluation of Modified Glasgow Prognostic Score for Pancreatic Cancer: A retrospective cohort study. *Pancreas* 45, 211-217.

Isaji S, Murata Y and Kishiwada M (2018) New Japanese Classification of Pancreatic Cancer. *Pancreatic Cancer* 12, 1021-1037.

Jamieson NB, Denley SM, Logue J, MacKenzie DJ, Foulis AK, Dickson EJ, Imrie CW, Carter R, McKay CJ and McMillan DC (2011) A prospective comparison of the prognostic value of tumor- and patient-related factors in patients undergoing potentially curative surgery for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 18, 2318-2328.

Kang H, Kim SS, Sung MJ, Jo JH, Lee HS, Chung MJ, Park JY, Park SW, Song SY, Park M, et al (2020) Radiographic portal or superior mesenteric vein invasion is an independent prognostic factor in non-metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma: A missing block of clinical T staging? *Pancreatology* 20, 952-959.

Kim J, Bamlet WR, Oberg AL, Chaffee KG, Donahue G, Cao X, Chari S, Garcia BA, Petersen GM and Zaret KS (2017) Detection of early pancreatic ductal adenocarcinoma with thrombospondin-2 and CA19-9 blood markers. *Sci Transl Med* 9, eaah5583.

Kimura H, Klein AP, Hruban RH and Roberts N (2021) The Role of Inherited Pathogenic CDKN2A Variants in Susceptibility to Pancreatic Cancer, *Pancreas* 50, 1123-1130.

Kobel M, Piskorz AM, Lee S, Lui S, LePage C, Marass F, Rosenfeld N, Masson AM and Brenton JD (2016) Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Pathol Clin Res* 2, 247-258.

Kondo N, Murakami Y, Uemura K, Nakagawa N, Takahashi S, Ohge H and Sueda T

(2017) Comparison of the prognostic impact of pre- and post-operative CA19-9, SPan-1, and DUPAN-II levels in patients with pancreatic carcinoma. *Pancreatology* 17, 95-102.

Krantz BA and O'Reilly EM (2018) Biomarker-based therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma: An emerging reality? *Clin Cancer Res* 24, 2241-2250.

Kurahara H, Maemura K, Mataka Y, Sakoda M, Lino S, Arigami T, Mori S, Ueno S, Shinchi H, Takao S, et al (2016) Clinical significance of serum carbohydrate antigen 19.9 and duke pancreatic monoclonal antigen type 2 for the prediction of hematogenous metastases in patients with pancreatic ducal adenocarcinoma. *Pancreatology* 16, 1051-1056.

Kusama K, Okamoto Y, Saito K, Kasahara T, Murata T, Ueno Y, Kobayashi Y, Kamada Y and Miyoshi E (2017) Reevaluation of Pholiota squarrosa lectin-reactive haptoglobin as a pancreatic cancer biomarker using an improved ELISA system. *Glycoconj J* 34, 537-544.

Lee B, Lipton L, Cohen J, Tie J, Javed AA, Li L, Goldstein D, Burge M, Cooray P, Nagrial A, et al (2019) Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Ann Oncol* 30, 1472-1478.

Li D, Xie K, Wolff R and Abbruzzese JL (2004) Pancreatic cancer. *Lancet* 363, 1049-1057.

Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, Poisson LM, Lazar AJ, Cherniack AD, Kovatich AJ, Benz CC, Levine DA, Lee AV, et al (2018) An integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics. *Cell* 173, 400-416 e411.

Luo G, Liu C, Guo M, Cheng H, Lu Y, Jin K, Liu L, Long J, Xu J, Lu R, et al (2017) Potential biomarkers in Lewis negative patients with pancreatic cancer. *Ann Surg* 265, 800-805.

Maddalena M, Mallel G, Nataraj NB, Shreberk-Shaked M, Hassin O, Mukherjee S, Arandkar S, Rotkopf R, Kapsack A, Lambisae G, et al (2021) TP53 missense mutations

in PDAC are associated with enhanced fibrosis and an immunosuppressive microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2025631118.

Majumder S, Philip NA, Singh Nagpal SJ, Takahashi N, Mara KC, Kendrick ML, Smyrk TC, Zhang L, Levy MJ, Gleeson FC, et al (2019) High-grade dysplasia in resected main-duct intraductal papillary mucinous neoplasm (MD-IPMN) is associated with an increased risk of subsequent pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 114, 524-529.

Maitra A, Adsay NV, Argani P, Lacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ and Hruban RH (2003) Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 16, 902-912.

McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG and McCain RS (2018) Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* 24, 4846-4861.

McIntyre CA, Lawrence SA, Richards AL, Chou JF, Wong W, Capanu M, Berger MF, Donoghue MTA, Yu KH, Varghese AM, et al (2020) Alterations in driver genes are predictive of survival in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer* 126, 3939-3949.

Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, et al (2015) Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523, 177-182.

Ming Z, Lopa M and Chu-Xia D (2018) The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci* 14,111-123.

Mizrahi JD, Surana R, Valle JW and Shroff RT (2020) Pancreatic cancer. *Lancet* 395, 2008-2020.

Nakamura T, Asano T, Okamura K, Tsuchikawa T, Murakami S, Kurashima Y, Ebihara Y, Noji T, Nakanishi Y, Tanaka K, et al (2018) A preoperative prognostic scoring system to predict prognosis for resectable pancreatic cancer: Who will benefit from upfront

surgery? J Gastrointest Surg 23, 990-996.

Narimatsu H, Iwasaki H, Nakayama F, Ikehara Y, Kudo T, Nishihara S, Sugano K, Okura H, Fujita S and Hirohashi S (1998) Lewis and secretor gene dosages affect CA19-9 and DU-PAN-2 serum levels in normal individuals and colorectal cancer patients. Cancer Res 58, 512-518.

Okada K, Kawai M, Tani M, Hirono S, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahara Y and Yamaue H (2014) Predicting factors for unresectability in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci 21, 648-653.

Okada T, Mizukami Y, Ono Y, Sato H, Hayashi A, Kawabata H, Koizumi K, Masuda S, Teshima S, Takahashi K, et al (2020) Digital PCR-based plasma cell-free DNA mutation analysis for early-stage pancreatic tumor diagnosis and surveillance. J Gastroenterol 55, 1183-1193.

Omori Y, Ono Y, Tanino M, Karasaki H, Yamaguchi H, Furukawa T, Enomoto K, Ueda J, Sumi A, Katayama J, et al (2019) Pathways of progression from intraductal papillary mucinous neoplasm to pancreatic ductal adenocarcinoma based on molecular features. Gastroenterology 156, 647-661.

Puli SR, Bechtold ML, Buxbaum JL and Eloubeidi MA (2013) How good is endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in diagnosing the correct etiology for a solid pancreatic mass?: A meta-analysis and systematic review. Pancreas 42, 20-26.

Qian Y, Gong Y, Fan Z, Luo G, Huang Q, Deng S, Cheng H, Jin K, Ni Q, Yu X, et al (2020) Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. J Hematol Oncol 13, 130.

Qian ZR, Robinson DA, Nowak JA, Morales-Oyarvide V, Dunne RF, Kozak MM, Welch MW, Baris LK, Silva AD, Li T, et al (2018) Association of alterations in main driver genes with outcomes of patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. JAMA Oncol 4, e173420.

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM and Matrisian LM (2014) Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of

thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913-2921.

Schneider G, Siveke JT, Eckel F and Schmid RM (2005) Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 128, 1606-1625.

Sivapalan L, Kocher H.M, Ross-Adams H and Chelala C (2021) Molecular profiling of ctDNA in pancreatic cancer: Opportunities and challenges for clinical application. *Pancreatology* 21, 363–378.

Sobin LH, Gospodarowicz MK and Wittekind C (2009) TNM classification of malignant tumours. John Wiley & Sons, 132-135.

Sunagawa Y, Yamada S, Sato Y, Morimoto D, Sonohara F, Takami H, Inokawa Y, Hayashi M, Kanda M, Tanaka C, et al (2020) Novel prognostic implications of DUPAN-2 in the era of initial systemic therapy for pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 27, 2081-2089.

Suzuki Y, Ichihara T, Nakao A, Sakamoto J, Takagi H and Nagura H (1988) High serum levels of DUPAN2 antigen and CA19-9 in pancreatic cancer: Correlation with immunocytochemical localization of antigens in cancer cells. *Hepatogastroenterology* 35, 128-135.

Takasaki H, Uchida E, Tempero MA, Burnett DA, Metzgar RS and Pour PM (1988) Correlative study on expression of CA 19-9 and DU-PAN-2 in tumor tissue and in serum of pancreatic cancer patients. *Cancer Res* 48, 1435-1438.

Tape CJ, Ling S, Dimitriadi M, McMahon KM, Worboys JD, Leong HS, Norrie IC, Miller CJ, Poulogiannis G, Lauffenburger DA, et al (2016) Oncogenic KRAS Regulates Tumor Cell Signaling via Stromal Reciprocation. *Cell* 165, 910-920.

Tuna M, Ju Z, Yoshihara K, Amos CI, Tanyi JL and Mills GB (2020) Clinical relevance of TP53 hotspot mutations in high-grade serous ovarian cancers. *Br J Cancer* 122,405-412.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH and Goggins M (2011) Pancreatic cancer. *Lancet* 378, 607-620.

Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N and Shin YK (2018) Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. *Cell Physiol Biochem* 51, 2647-2693.

Wang W, Shpaner A, Krishna SG, Ross WA, Bhutani MS, Tamm EP, Raju GS, Xiao L, Wolff RA, Fleming JB, et al (2013) Use of EUS-FNA in diagnosing pancreatic neoplasm without a definitive mass on CT. *Gastrointest Endosc* 78, 73-80.

Watanabe K, Nakamura T, Kimura Y, Motoya M, Kojima S, Kuraya T, Murakami T, Kaneko T, Shinohara Y, Kitayama Y, et al (2022) Tumor-Informed Approach Improved ctDNA Detection Rate in Resected Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* 23, 11521.

Weissmueller S, Manchado E, Saborowski M, Morris JP 4th, Eagenblast E, Davis CA, Moon SH, Pfister NT, Tschanarganeh DF, Kitzing T, et al (2014) Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor signaling. *Cell* 157, 382-394.

Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Beak G, Lin WC, Mansour J, Mollaei M, Wagner KU, Kodoru P, Yopp A, et al (2015) Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* 6, 6744.

Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, et al (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467, 1114-1117.

Yachida S, White CM, Naito Y, Zhong Y, Brosnan JA, Macgregor-Das AM, Morgan RA, Saunders T, Laheru DA, Herman JM, et al (2012) Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. *Clin Cancer Res* 18, 6339-6347.

Yamamoto T, Yagi S, Kinoshita H, Sakamoto Y, Okada K, Uryuhara K, Morimoto T, Kaihara S and Hosotani R (2015) Long-term survival after resection of pancreatic cancer: A single-center retrospective analysis. *World J Gastroenterol* 21, 262-268.

Yokose T, Kitago M, Matsuda S, Sasaki Y, Masugi Y, Nakamura Y, Shinoda M, Yagi H, Abe Y, Oshima G, et al (2020) Combination of KRAS and SMAD4 mutations in

formalin-fixed paraffin-embedded tissues as a biomarker for pancreatic cancer. *Cancer Sci* 111, 2174-2182.

Zhou Y, Wei Q, Fan J, Cheng S, Ding W and Hua Z (2018) Prognostic role of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in pancreatic cancer: A meta-analysis containing 8252 patients. *Clin Chim Acta* 479, 181-189.

厚生労働省 (2023). 令和 5 年(2023)人口動態統計(確定数)の概況

国立研究開発法人国立がん研究センター (2023). 院内がん登録 2014-2015 年 5 年生存率集計 p48-49