

201. 膵癌の集学的治療の個別化を図るバイオマーカーの同定

畠 達夫

東北大学 大学院医学系研究科 消化器外科学分野

Key words : 膵癌, バイオマーカー, リキッドバイオプシー, プレシジョン医療, 集学的治療

緒 言

膵癌は消化器悪性腫瘍の中で最も難治であり、治療成績向上のための基礎的、臨床的研究の重要性・緊急性は極めて高い。膵癌において長期生存を得るための唯一の治療法は根治切除であるが、早期発見が困難であり、多くの症例では診断の時点で既に遠隔転移を伴っているため切除不能とされるのが現状である。また、切除しえたとしても高率に再発を来すことから、今後さらなる膵癌治療成績向上のためには手術治療と非手術治療（放射線治療や全身化学療法）を組み合わせた集学的治療法の改良が求められる。当教室では膵癌に対する集学的治療にいち早く取り組み、2019年1月のASCO-GIにおいて当教室が主導した切除可能膵癌に対する術前化学療法の有用性を検証した国内多施設第Ⅱ／Ⅲ相ランダム化比較試験（Prep-02/JSAP-05 試験）の結果を報告し、切除可能膵癌における術前化学療法 Gemcitabine＋S-1（GS）療法の予後改善効果を示した。本臨床試験の結果は、切除可能膵癌に対する術前化学療法を標準治療と位置付ける pivotal study となりうるインパクトを有するものである。

今後の展望は、切除可能膵癌に対する術前GS療法を標準治療として位置付けつつ、術前化学療法の対象を切除可能膵癌のみならず切除境界膵癌にまで適応拡大し、さらにはより強力な化学療法レジメンを導入することで、治療成績の向上を図ることである。したがって、化学療法レジメン選択を含めた治療方針決定のためには正確な病期診断が必須であり、当教室は切除の可能性のある膵癌症例に対して審査腹腔鏡検査を積極的に行っている。

本研究の目的は、切除企図膵癌に対する集学的治療にリキッドバイオプシーを導入し、特に画像診断では検出困難な微小転移診断における血液バイオマーカーの有用性を明らかにすることである。膵癌においては、最も高頻度に見られる遺伝子異常である *KRAS* 変異アレルをゲノムマーカーとして用いたリキッドバイオプシー研究が行われているが [1, 2]、主に膵癌の質的鑑別診断や予後予測マーカーとしての有用性について検討したものであり、微小転移の存在診断についての有用性については未だ明らかでない。バイオマーカーの結果に基づき、微小転移を有する症例、微小転移の存在が強く疑われる症例に対してより強力なレジメンを用いた全身化学療法を行い、微小転移の病勢を制御した上で切除を企図するという集学的治療のプレシジョン化が可能になれば、これまで難治とされてきた膵癌の予後向上へのブレイクスルーとなりうるということが期待される。

方 法

1. 対象

2017年11月から2018年4月までの間に東北大学病院総合外科で審査腹腔鏡検査を行った、組織学的に膵腺癌と診断されている37例を対象とした。現在、「血液試料を用いた膵疾患の診断・治療に関するバイオマーカーを調査する研究」として東北大学大学院医学系研究科倫理委員会より承認を受け、当教室で切除を企図して精査・治療が開始された膵癌を対象に前向きに血液試料を採取している（承認番号2018-1-248）。本研究の対象となった37例についても、個別に説明と同意取得を行った。

2. 方法

審査腹腔鏡検査と同時期に患者末梢血を採取後、可及的速やかに遠心分離し、血漿成分を抽出した。抽出した血漿成分は分注し、使用時まで -80°C で凍結保存した。使用に際して、血漿を解凍後に16,000 g、 4°C で10分間遠心し、上清2.0 mLからCirculating cell free DNA extraction kit (QIAGEN、Hilden、Germany)を用いてcell-free DNA (cfDNA)を抽出した。cfDNAは低濃度でかつ高度に断片化されていることから、濃度測定はLINE-1配列を標的としたPCR法にて行い、標準試料であるhuman genomic DNA (G3041、Promega、Madison、WI)を用いて検量線を作製した。

得られたcfDNAをテンプレートにKRASマルチスクリーニングキット (Bio-Rad、Hercules、CA)を用いてKRAS遺伝子のcodon12/13の点突然変異を有するアレル頻度をdroplet digital PCR (QX200、Bio-Rad)を用いて定量した。Quantasoft1.7.4 (Bio-Rad)を用いて陽性の液滴数をカウントし、ポアソン分布に基づく補正後、野生型、変異型のアレル頻度をそれぞれ測定した。

対象症例より得られた画像診断、腫瘍マーカー、審査腹腔鏡検査所見などの臨床情報を診療記録から抽出した。審査腹腔鏡検査については、肝転移 (H1)、腹膜転移 (P1)、腹腔洗浄細胞診陽性 (CY1)のいずれかを認めた症例を陽性と定義した。臨床病期は肺癌取扱い規約第7版に基づいて分類した。切除可能性分類も同規約に基づいて、切除可能 (R)、切除境界 (BR)、切除不能 (UR)に分類し、さらにBR肺癌は門脈 (BR-PV)、動脈への浸潤 (BR-A)、UR肺癌は局所進行 (UR-LA)、遠隔転移あり (UR-M)にそれぞれ細分類した。これらの診療情報とKRAS変異アレル頻度との関連性を検証した。

結 果

1. 患者背景

37例の患者背景は男性19例、女性18例で、画像検査に基づく臨床病期はそれぞれStage I/II/III/IV: 4/22/10/1例であった。同様に、切除可能性分類についてはRが29例、BRが8例 (BR-PV: 3例、BR-A: 5例)、UR (UR-LA: 6例、UR-M: 1例)が7例であった。UR-Mの1例は術前画像検査で肝転移が否定できない小腫瘤影を指摘され、切除生検を予定して審査腹腔鏡検査を行った (表1)。

表1. 患者背景

患者背景因子	n	(%)
性別	男性	19 (51.4)
	女性	18 (48.6)
占拠部位	頭部	23 (62.2)
	体尾部	14 (37.8)
臨床病期 (規約7版)	I	4 (10.8)
	II	22 (59.5)
	III	10 (27.0)
	IV	1 (2.7)
切除可能性 (規約7版)	R	22 (53.7)
	BR-PV	3 (8.1)
	BR-A	5 (13.5)
	UR-LA	6 (16.2)
	UR-M	1 (2.7)
治療内容	切除	8 (21.6)
	化学療法→切除	17 (45.9)
	化学療法	11 (29.7)
	化学放射線療法→切除	1 (2.7)

R: 切除可能、BR-PV: 切除境界 (門脈系への浸潤)、BR-A: 切除境界 (動脈系への浸潤)、UR-LA: 切除不能 (局所進行)、UR-M: 切除不能 (遠隔転移あり)

37 例中 9 例は初診時精査の段階で審査腹腔鏡検査を行い、28 例は何らかの前治療（化学療法、化学放射線療法）が施行された後に審査腹腔鏡を行った。審査腹腔鏡検査の結果、10 例が陽性と診断された。10 例全例が CY1 と診断され、うち 1 例が H1 と診断され、2 例が P1 と診断された（表 2）。

表 2. 審査腹腔鏡検査の結果

		N = 37
審査腹腔鏡検査の時期		
	前治療なし	9
	治療後	28
肝転移 (H)		
	H0	36
	H1	1
腹膜転移 (P)		
	P0	35
	P1	2
腹腔洗浄細胞診 (CY)		
	CY0	27
	CY1	10

2. cfDNA 中の *KRAS* 変異アレルの測定

まず、単位血漿あたりの cfDNA 量と画像所見、審査腹腔鏡検査所見との関連について検証した。測定された cfDNA 量は術前画像診断に基づいた病期分類と切除可能性分類とのいずれとも明らかな関連は認めなかった（図 1）。特に症例数の多い切除可能病変、ステージ II においては症例間の測定値にばらつきを認めた。審査腹腔鏡検査陽性例の cfDNA 量は血漿 1 mL あたり 8.83 ng であり、陰性例 (5.24 ng) と比較すると多い傾向であったが、有意差 ($P=0.098$ 、Mann-Whitney U 検定) は認めなかった（図 2）。

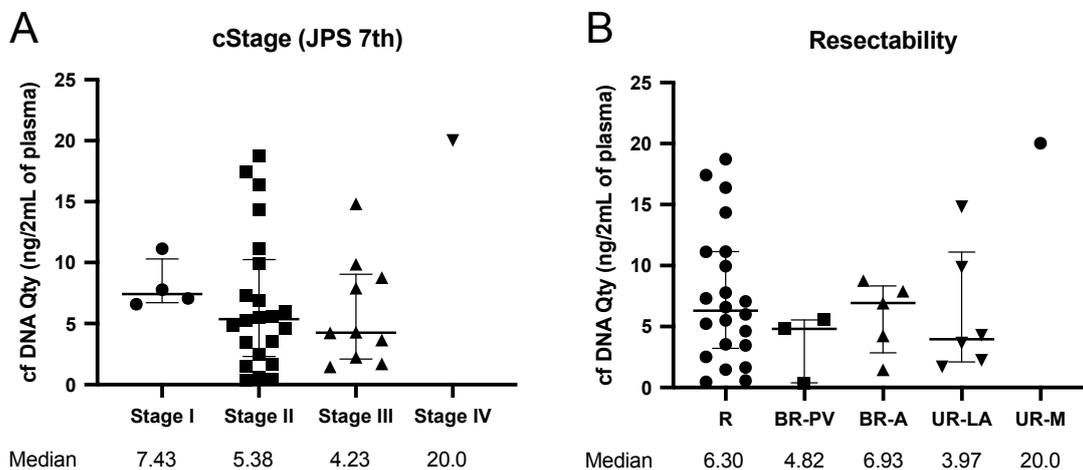


図 1. 臨床病期 (A) と切除可能性分類 (B) 別の血中 cell-free DNA 量

R : 切除可能、BR-PV : 切除境界（門脈系への浸潤）、BR-A : 切除境界（動脈系への浸潤）、UR-LA : 切除不能（局所進行）、UR-M : 切除不能（遠隔転移あり）。

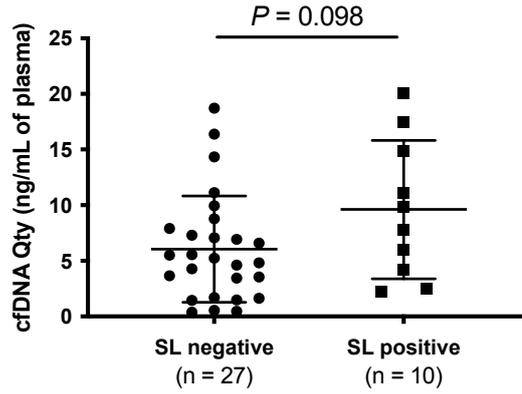


図2. 審査腹腔鏡検査と血中 cell-free DNA 量
SL : staging laparoscopy。

cfDNA 中の *KRAS* 変異アレルは全 37 例中 8 例から検出され、UR-LA 症例の半数、R 症例の約 2 割で *KRAS* 変異アレルが検出された。審査腹腔鏡検査所見と比較検討すると、検査陽性であった 10 例中 5 例 (50%) から *KRAS* 変異アレルが検出され、検査陰性例 (3/27、11%) と比較すると有意 ($P=0.020$ 、Fisher 正確検定) に高頻度であった (図 3)。

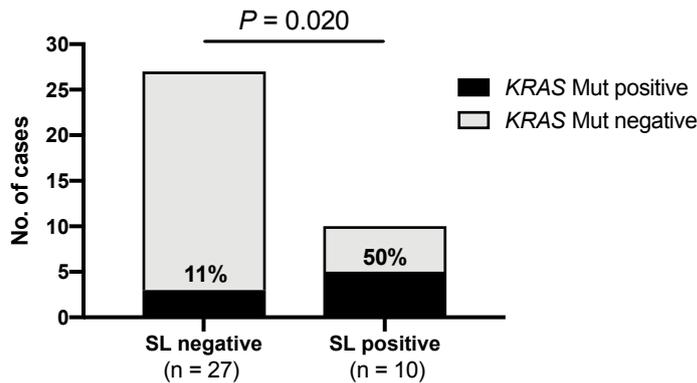


図3. 審査腹腔鏡検査所見と血中 cell-free DNA の *KRAS* 変異アレル検出頻度
SL : staging laparoscopy。

切除可能膵癌症例の cfDNA 中の *KRAS* 変異アレル陽性 4 例のアレル頻度はそれぞれ 2.1%、1.0%、0.5%、0.4% であった。R 膵癌における *KRAS* 変異陽性例の詳細を表 2 に示す。4 例中 2 例は腹腔洗浄細胞診が陽性 (CY1) であり、1 例は血液中の腫瘍マーカーである DUPAN-2 が 16,000 IU/mL と異常高値を示していた (表 3)。

表 3. 切除可能膵癌における血中 cell-free DNA の *KRAS* 変異アレル陽性例の詳細

No.	Age	CEA (ng/mL)	CA19-9 (IU/mL)	DUPAN-2 (IU/mL)	Location	cT	Size (mm)	cN	cM	CY	Stage	cfDNA Qty (ng/2mL of plasma)	<i>KRAS</i> MAF (%)
1	44/M	7.0	113.5	16000	Ph	3	31	0	0	Class II	IIA	10.47	1.0
2	66/F	2.6	28.6	41	Pb	1c	15	0	0	Class V	IA	22.29	0.5
31	65/F	3.5	254.5	197	Pb	3	25	0	0	Class V	IIA	5.04	2.1
61	82/F	3.6	50.8	37	Ph	1b	7	0	0	Class II	IA	7.07	0.4

M : male、F : female、Ph : pancreas head、Pb : pancreas body。MAF : mutant allele frequency。

考 察

切除を企図した膵癌に対する微小転移の診断は集学的治療の適応と方針決定に直結するため、高い精度が求められる。本研究の結果、血中 cfDNA 量および *KRAS* 変異アレル陽性率は、画像診断に基づく臨床病期や切除可能性分類と明らかな関連を示さなかった。しかしながら、切除可能膵癌であっても血中 cfDNA の *KRAS* 変異陽性例は腹腔洗浄細胞診陽性例や腫瘍マーカー異常高値例であり、腹腔内または全身に微小転移の存在が疑われる症例であった。これらの結果は、症例選択や診断精度に関連するバイアスが存在する余地があるものの、血中 cfDNA の *KRAS* 変異アレルは病期や切除可能性分類とは独立した、画像診断では検出困難な微小転移の存在を予測する診断マーカーとなりうる可能性があることを示唆するものである。このことにより、将来的には血中 cfDNA 中の *KRAS* 変異アレルを測定することで、局所病変は切除可能であっても *KRAS* 変異アレル陽性例を全身転移のハイリスク群として強力な全身化学療法を行う、という治療戦略が可能となりうる。また、切除を企図した膵癌全例に対して審査腹腔鏡検査を行うべきかという点については一定の見解が得られておらず、低侵襲で検査可能な血中 cfDNA 中の *KRAS* 変異アレル測定は、審査腹腔鏡検査の適応を決定する上でも重要なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

本研究における審査腹腔鏡検査陽性例は全例 CY1 であったが、腹膜転移が成立する前段階と解釈されている CY1 所見と血中 cfDNA 中の *KRAS* 変異に関連性が示唆されたことは興味深い。画像診断では検出が比較的困難とされる播種性転移を血液バイオマーカーを用いて予測・診断する試みは画期的であり、本研究の結果はその有用性を支持するものであった。しかしながら、少数例の検討であり、今後は対象症例の再発、予後に関する臨床アウトカムを用いた検討が必要と考え、症例の集積および解析を継続していく予定である。

謝 辞

この場をお借りして、研究助成を頂いた上原記念生命科学財団の関係各位に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Takai E, Totoki Y, Nakamura H, Morizane C, Nara S, Hama N, Suzuki M, Furukawa E, Kato M, Hayashi H, Kohno T, Ueno H, Shimada K, Okusaka T, Nakagama H, Shibata T, Yachida S. Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep.* 2015 Dec 16;5:18425. doi: 10.1038/srep18425. PubMed PMID: 26669280; PubMed Central PMCID: PMC4680882
- 2) Ako S, Nouse K, Kinugasa H, Dohi C, Matushita H, Mizukawa S, Muro S, Akimoto Y, Uchida D, Tomoda T, Matsumoto K, Horiguchi S, Tsutsumi K, Kato H, Okada H. Utility of serum DNA as a marker for *KRAS* mutations in pancreatic cancer tissue. *Pancreatology.* 2017 Mar - Apr;17 (2) :285-290. doi: 10.1016/j.pan.2016.12.011. Epub 2016 Dec 27. PubMed PMID: 28139399.