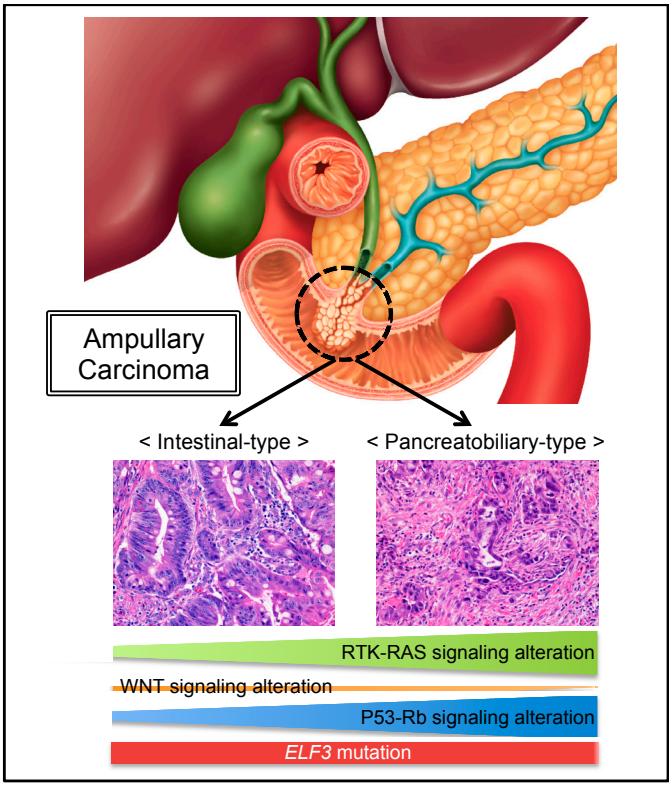
64　ゲノム解析による十二指腸部乳頭部がんの治療標的探索	谷内田　真一

【目的】膵頭部領域のがんは ①膵臓がん、②胆道がんと③十二指腸部乳頭がんに分けられる。いずれも「難治がん」である。このうち十二指腸部乳頭がん（Ampullary carcinoma）は希少がゆえに、その分子遺伝学的な特徴は不明である。本研究は十二指腸部乳頭がんを研究対象とし、網羅的なゲノム解析により治療標的を探索し、さらに新たな治療薬開発の基盤となるデータを蓄積することを目的とする。

【方法】日米の多施設から収集した 172 例の十二指腸部乳頭がん患者を研究対象とした。臨床・病理学的な解析に加え、凍結組織（がん部と非がん部）を研究試料として核酸（DNA と RNA）を抽出し、全エクソーム解析、コピー数解析、トランスクリプトーム解析等を行う。

【結果】十二指腸部乳頭がんは組織・形態像と免疫組織化学染色により、腸型（Intestinal-type）と膵胆型（Pancreatobiliary-type）に分類することが出来る。臨床・病理学的検討から、腸型が膵胆型と比較して有意に腫瘍径が大きいにもかかわらず、リンパ節転移は膵胆型で有意に多く認められた。全エクソーム解析の結果、24 個の Significantly mutated genes が同定された。そのうち、新規のがん関連遺伝子 *ELF3* を同定した。トランスクリプトーム解析の結果、その遺伝子発現に基づき複数のクラスターに分類できた。本研究で解析した 172 例のうち、約半数（51%）の症例で治療標的となり得る遺伝子異常を有し、がんの個別化治療への応用が期待された。

十二指腸部乳頭がんの遺伝子異常



64. ゲノム解析による十二指腸部乳頭がんの治療標的探索

谷内田　真一

*国立がん研究センター研究所 がんゲノミクス研究分野

Key words：十二指腸部乳頭がん，希少がん，難治がん，網羅的ゲノム解析

緒　言

膵頭部領域のがんは ①膵臓がん、②胆道がんと③十二指腸部乳頭がんに分けられる。いずれも「難治性がん」である。①膵臓がんと②胆道がんにおいては、その臨床・病理学的な検討と網羅的なゲノム解析が進んでいる。

十二指腸部乳頭がんは、本邦では胆道がんの一つとして分類され（胆道癌取扱い規約）、欧米では小腸がんの一つとされてきたが 2010 年の WHO 分類で独立した疾患として分類された。米国 SEER に基づく基づく十二指腸部乳頭がんの 5 年生存率は、十二指腸乳頭部にとどまる場合は 45%、周囲組織に浸潤した場合は 31%、リンパ節転移や遠隔転移を伴う場合はわずかに 4%である。申請者は香川県全体における後向きコホート研究の結果、その発症率は 0.73 人／10 万人であることを報告した［1］。十二指腸部乳頭がんはこのように「希少がん」であるため、その分子遺伝学的な特徴はほとんど解明されていない。

本疾患の標準治療は、転移のない症例では外科切除であるが、診断時に転移を伴う症例や術後の再発に対しては、胆道がんに準じた治療（Gemcitabine/Cisplatin）が行われている。しかし、その妥当性は不明である。本研究では、国際多施設共同研究として臨床・病理学的情報と研究試料（凍結試料）を収集し、本疾患の臨床・病理学的特徴の解明と網羅的ゲノム解析を行った。

方法および結果

本研究では、日本 6 施設（国立がん研究センター・中央病院、東北大学、東京女子医科大学、和歌山県立医科大学、広島大学、香川大学）と米国メリーランド州・Johns Hopkins 大学から収集した 172 例の十二指腸部乳頭がんの手術検体（凍結サンプル）を用いて、網羅的なゲノム解析を行った。同症例の臨床・病理学的情報も収集した。

十二指腸部乳頭がんは、その組織・形態学的な特徴と免疫組織化学染色から腸型（Intestinal-type）と膵胆型（Pancreatobiliary-type）に亜分類される。本亜分類は 1994 年に本邦から提唱され［2］、腸型と膵胆型で予後が大きく異なるため、その亜分類は世界で広く使用されている。172 例を腸型（93 例）と膵胆型（66 例）に分類し（分類不能；13 例）、臨床・病理学的な検討を行った。腫瘍径は腸型が平均 27.4 mm であったのに対し、膵胆型では 22.5 mm と有意に腸型が大きかった（$P < 0.0387$）。一方、リンパ節転移は腸型では 36.6%で陽性であったのに対し、膵胆型では 71.2%に陽性で有意差を認めた（$P < 0.0001$）。すなわち、十二指腸部乳頭がんにおいてその大きさはリンパ節転移と比例しない。

凍結検体から DNA を抽出し、60 例の十二指腸部乳頭がんに対して全エクソーム解析を行った。ライブラリ作製には SureSelect Human All Exon v4.0 試薬（Agilent Technologies）を用いた。高速シークエンサーとして HiSeq2000（Illumina）を用いた。シークエンス深度（depth）は平均で 188X であった。全エクソーム解析を行った 60 例のうち 4 例は Hyper-mutated phenotype であった。

全エクソーム解析の結果、Significantly ($q < 0.1$) mutated genes であった遺伝子と治療標的となり得る遺伝子の 92 遺伝子を対象に、Targeted deep sequencing を全 172 症例に行った。ライブラリ作製には HaloPlex 試薬（Agilent Technologies）を用いた。シークエンス深度（depth）は平均で 2,535X であった。その結果、24 遺伝子が Significantly ($q < 0.1$) mutated genes であった。q 値の低い順に、トップ 10 は *KRAS*、*TP53*、*CTNNB1*、*SMAD4*、*APC*、*ELF3*、

*現在の所属：大阪大学 大学院医学系研究科 ゲノム生物学講座

GNAS、*ACVR2A*、*ERBB3*、*ACVR1B* の順であった（表 1）。既知のがん関連遺伝子が多い中、*ELF3* が新規のがん関連遺伝子として同定された。*ELF3*は十二指腸部乳頭がん 172 例のうち、25 例で変異が観察され、14 例が Frameshift、6 例が Missense、2 例が Nonsense、2 例が In-frame で、残りの 1 例が Splice-site mutation であった。変異の Hot spot がみられず、多くが Truncating mutations であったことから、*ELF3* はがん抑制遺伝子と推測された。免疫組織化学染色においても、*ELF3* の変異がみられたがんではタンパク欠失がみられたことから 2-hit の可能性が示唆された。

表 1. 十二指腸部乳頭がんにおける Significantly mutated genes

	Gene	Frequency (%)	Patients	No. of Inactivating Alterations	q-value
1	*KRAS*	47.7	82	0	1.06E-116
2	*TP53*	55.8	96	30	2.73E-115
3	*CTNNB1*	23.3	40	1	8.40×10^{-21}
4	*SMAD4*	16.3	28	10	1.02×10^{-14}
5	*APC*	33.7	58	54	3.52×10^{-13}
6	*ELF3*	12.2	21	17	1.78×10^{-10}
7	*GNAS*	11.6	20	1	7.41×10^{-07}
8	*ACVR2A*	7.6	13	9	0.000147
9	*ERBB3*	10.5	18	0	0.000147
10	*ACVR1B*	8.1	14	5	0.000428

十二指腸部乳頭がん172症例におけるTargeted gene sequencingの結果、24個のSignificantly mutated genes（$q < 0.1$）が同定された。q値で順位づけを行っている。そのうちトップ10を表に示している。既知のがん関連遺伝子の他に新規のがん関連遺伝子、*ELF3*が特定され、遺伝子変異のほとんどがInactivating alterationsである（17/21）。

十二指腸部乳頭がんは上述のように腸型と膵胆型に亜分類されるが、変異を認めた遺伝子を、組織・形態像が類似する大腸がんや膵臓がんと比較した（表 2）。腸型と大腸がんの変異を認める遺伝子のトップ 3 は *APC*、*TP53* と *KRAS* であった。膵胆型と膵臓がんを比較したところ、変異を認める遺伝子は *KRAS*、*TP53*、*SMAD4* の順で同一であった。遺伝子変異の頻度は異なるが、組織・形態像と遺伝子異常は類似する可能性が示唆された。

表 2. 十二指腸部乳頭がんの亜型分類における Significantly mutated genes の遺伝子変異頻度

	腸型 十二指腸部乳頭がん	大腸がん	膵胆型 十二指腸部乳頭がん	膵臓がん
1	*APC*（50%）	*APC*（81%）	*KRAS*（68%）	*KRAS*（99%）
2	*TP53*（46%）	*TP53*（60%）	*TP53*（67%）	*TP53*（33%）
3	*KRAS*（39%）	*KRAS*（43%）	*SMAD4*（20%）	*SMAD4*（16%）

十二指腸部乳頭がんを腸型と膵胆型に亜分類し、Significantly mutated genes（$q < 0.1$）の遺伝子変異頻度を、組織・形態像が類似している大腸がんと膵臓がんの既知のデータと比較した。大腸がんはTCGA（The Cancer Genome Atlas）、膵臓がんはICGC（International Cancer Genome Consortium）の結果を引用した。

Targeted deep sequencing を全 172 症例に行った結果、治療標的となり得る遺伝子異常を検討した（図 1）。その結果、172 例中 88 例（51%）で治療標的となり得る遺伝子異常が検出された。*ERBB2*、*ERBB3*、*ATM*、*BRAF*、*BRCA2* や *PIK3CA* などである。これらの遺伝子異常は、日米間で差異は認められなかった。

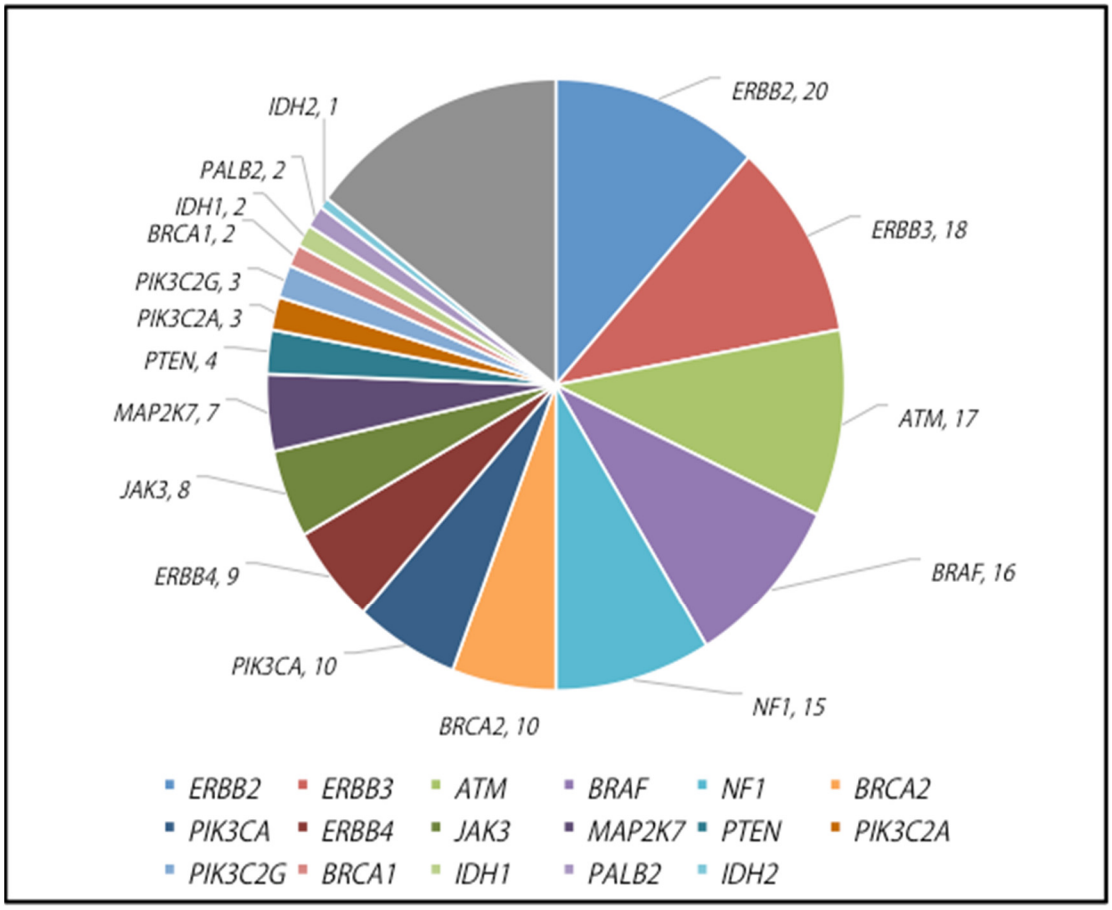


図 1. 十二指腸部乳頭がんにおける治療標的となり得る遺伝子異常

十二指腸部乳頭がん患者 172 例のうち 88 例（51%）で治療標的となり得る遺伝子異常を認めた。グラフでは同一症例に重複して起こっている遺伝子についても表示しているため高い割合になっている。

さらに 172 例のコピー数解析を Agilent CGH array（SurePrint G3 CGH Microarray 1x1M）を用いて行った。GISTIC2.0 アルゴリズムを用いて解析したところ、4 つの領域で有意（$q < 0.1$）な増幅、2 つの領域で有意な欠失を認めた。増幅している領域には *MYC* や *MDM2*、欠失している領域には *CDKN2A* や *SMAD4* 遺伝子が存在していた。興味深いことに *CDKN2A* を含む領域の欠失は大腸がんではまれであるが、腸型の 1／3 の症例で *CDKN2A* を含む領域の欠失が観察された。*SMAD4* の欠失は、腸型と膵胆型の両亜型において観察された。

172 例の十二指腸部乳頭がんのうち、良質な RNA が抽出できたサンプルを用いて、全トランスクリプトーム解析（RNA-Seq）を行った。具体的には TruSeq RNA Access Library Prep Kit（Illumina）を用いてライブラリ作製を行った。本方法は、シークエンス特異的キャプチャーを組み合わせることで、分解サンプルからも RNA コード領域にフォーカスした RNA-Seq ライブラリを調整可能であった。高速シークエンサー（HiSeq2500）を用いて、シークエンスランを行った。シークエンスの情報解析を現在、行っている。解析項目として、既知遺伝子の発現定量解析、スプライシングバリアントや融合遺伝子の検出を行っている。遺伝子プロファイルのクラスタリングを行っており、発現レベルは $\log_2$（PRKM）値を使い、GSEA を用いて解析のクラスター間で、統計学的に有意差のある遺伝子セットの特定に取り組んでいる。

考　察

本研究は日米における国際多施設共同研究によって実施された。特に *ELF3* 遺伝子の変異は人種や亜型（腸型ならびに膵胆型）を問わず検出された、十二指腸部乳頭がんに特徴的な新規のがん抑制遺伝子である［3］。これまでに子宮頸がんのうち腺がん 24 例のうち 3 例で報告があったが、症例数が少ないことから注目されていなかった［4］。最近では肝内胆管がん（寄生虫の関与がないもの）においても高頻度で観察されることが報告されている［5］。

本研究の成果として、十二指腸部乳頭がんにおいて高頻度で治療標的となり得る遺伝子異常が検出された。現時点では、十二指腸部乳頭がんは本邦では胆道がんとして取扱われているため、保険適用となっている分子標的薬剤は極めて少ない。また一部の症例で Hyper-mutated phenotype がみられたことから、他のがん種と同様に免疫チェックポイント阻害剤の効果も期待できる。

胆道がんでは FGFR2 などの融合遺伝子が検出され、治療標的となることが報告されている［6］。今後の情報解析の結果、十二指腸部乳頭がんにおいても、治療標的となり得る融合遺伝子の同定が期待される。

十二指腸部乳頭がんは、希少がんであり、難治がんでもある。十二指腸部乳頭がんのようながん種は希少がゆえ、抗がん剤等のランダム化臨床試験を行うことには長い時間を要する。本研究のような国際多施設共同研究による検体収集と、包括的ゲノム解析は難治がん・希少がん克服のロールモデルとなることが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は、本邦 6 施設と米国 1 施設の多くの臨床医や基礎研究者との共同研究である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Okano K, Oshima M, Yachida S, Kushida Y, Kato K, Kamada H, et al. Factors predicting survival and pathological subtype in patients with ampullary adenocarcinoma. J Surg Oncol. 2014;110(2):156-62. doi: 10.1002/jso.23600. PubMed PMID: 24619853.

2） Kimura W, Futakawa N, Yamagata S, Wada Y, Kuroda A, Muto T, et al. Different clinicopathologic findings in two histologic types of carcinoma of papilla of Vater. Jpn J Cancer Res. 1994;85(2):161-6. PubMed PMID: 7511574.

3） Yachida S, Wood LD, Suzuki M, Takai E, Totoki Y, Kato M, et al. Genomic Sequencing Identifies ELF3 as a Driver of Ampullary Carcinoma. Cancer Cell. 2016;29(2):229-40. doi: 10.1016/j.ccell.2015.12.012. PubMed PMID: 26806338; PubMed Central PMCID: PMCPMC5503303.

4） Ojesina AI, Lichtenstein L, Freeman SS, Pedamallu CS, Imaz-Rosshandler I, Pugh TJ, et al. Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas. Nature. 2014;506(7488):371-5. doi: 10.1038/nature12881. PubMed PMID: 24390348; PubMed Central PMCID: PMCPMC4161954.

5） Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH, Lim JQ, Huang MN, Padmanabhan N, et al. Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. Cancer Discov. 2017;7(10):1116-35. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0368. PubMed PMID: 28667006; PubMed Central PMCID: PMCPMC5628134.

6） Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shirota T, Elzawahry A, Kato M, et al. Genomic spectra of biliary tract cancer. Nat Genet. 2015;47(9):1003-10. doi: 10.1038/ng.3375. PubMed PMID: 26258846.