

氏名	ちば かずはる 千葉 和治
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	2021年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	膵癌における腹腔洗浄液を用いたリキッドバイオプシーの臨床的有用性の検討
論文審査委員	主査 教授 海野 倫明 教授 古川 徹 教授 江川 新一

論文内容要旨

学籍番号：B7MD5092

氏名：千葉 和治

本文：

背景：膵癌は予後不良な癌である。その原因として、早期発見の困難性や術後の高率な転移が挙げられる。膵癌に対する集学的治療成績の向上には正確な病期分類に基づいた治療戦略が必須であるが、特に腹膜転移は画像上診断が困難である。本研究では、膵癌症例の腹腔洗浄細胞液中腫瘍由来DNAを検出し、腹腔内微小転移の検出や腹膜再発の予測、治療標的候補の検索を目的としたリキッドバイオプシーの臨床的有用性を検証した。

方法：2018年4月から2020年5月までの期間に、膵癌症例149例から腹腔洗浄液を採取し、腹膜転移陽性(P1)、肝転移陽性(H1)、腹腔洗浄細胞診陽性(CY1)の有無を検索した。再発症例や低品質例を除外した132例(188サンプル)を対象に、腫瘍由来DNAであるKRAS遺伝子変異をDroplet-digital PCR (ddPCR)を用いて検出し、変異アレル頻度が1.0%以上のサンプルは次世代シーケンス(NGS)を用いて膵癌関連遺伝子変異を検索した。また対応ある血液を用い、腹腔洗浄液中腫瘍由来DNAの陽性率およびアレル頻度を、腹腔内転移所見や腫瘍マーカーとの関連性で比較した。さらに、腹腔洗浄液中の腫瘍由来DNAの再発・予後との関連を生存解析を行い解析した。

結果：対象の腹腔洗浄液188サンプル中、25サンプル(13.3%)からKRAS遺伝子変異が検出された。NGSを行った14例では全例からKRAS遺伝子変異が検出され、12例(85.7%)では腹腔内転移所見を認め、8例(66.7%)ではKRAS遺伝子変異の他に膵癌関連遺伝子変異(TP53, SMAD4, CDKN2A, GNAS)も検出された。腹腔洗浄液の腫瘍マーカーは血中と比較して、腹腔内転移所見とより強い関連を認め、高値例は腹腔洗浄液中腫瘍由来DNAの陽性率が高かった。腹腔洗浄液中の腫瘍由来DNAの陽性率は、P1症例で81.8%と血中よりも有意に高率であり($P < 0.001$)、アレル頻度はP1やCY1の所見に伴って血中より高値を示した($P_{0CY1} = 0.084$, $P_{1CY1} = 0.031$)。同一症例($n=3$)のNGSの解析では、2例で腹腔洗浄液と血中から同一のバリエントを有するKRAS遺伝子変異とTP53変異が検出され、1例ではTP53遺伝子変異が血中のみで検出された。前治療歴のない55例を対象に予後因子解析を行うと、腹腔洗浄液中の腫瘍由来DNAが独立した予後不良因子であった(HR 3.607, 95% CI 1.165–11.164, $P=0.029$)。

考察：閉鎖空間である腹腔内から採取した洗浄液中には腫瘍由来DNAが濃縮されており、特にP1/CY1陽性膵癌では血中より高率に検出された。腹腔洗浄液中の腫瘍マーカーは腫瘍由来DNAを含むサンプルを選択・抽出できる可能性が示唆された。NGS解析では腹腔洗浄液からKRAS遺伝子をはじめとする複数の膵癌関連遺伝子変異が検出可能であり、一部は血中と異なる変異パターン

(書式12)

を示したことから、転移部位別、つまり腹膜転移に特異的なゲノム異常を検出できる可能性が示唆された。

結語：本研究は切除を企図した膵癌症例に対して腹腔洗浄液を用いたリキッドバイオプシーを行い、ゲノム解析の有用性を示した初めての報告であり、将来的な腹膜転移に特化した個別化・精密化医療という新たな集学的治療戦略の臨床実装へ向けた橋渡しとなりうるものであり、臨床的有用性、応用性を強く示唆するものである。

審査結果の要旨

博士論文題目膵癌における腹腔洗浄液を用いたリキッドバイオプシーの臨床的有用性の検討.....

所属専攻・分野名医科学専攻・消化器外科学 分野.....

学籍番号 P7MD5092氏名 千葉 和治.....

膵癌は腫瘍生物学的特性から早期診断が困難で切除後も高率な再発を認め、正確な病期診断に基づくより効果的な治療が予後改善に必要である。本研究は画像上診断が困難な腹腔内微小転移の検出や予測、治療標的候補の検索を目的としたリキッドバイオプシーの臨床的有用性を明らかにするため、腹腔洗浄液を用いたゲノム解析を行った。

方法は切除企図膵癌症例の腹腔洗浄液を採取し腹膜転移(P1)、肝転移、腹腔洗浄細胞診(CY1)陽性の有無を検索した。サンプルから腫瘍由来 DNA である *KRAS* 遺伝子変異を Droplet-digital PCR を用い検出し、変異アレル頻度(MAF)が1.0%以上のサンプルに次世代シーケンス(NGS)を行い、膵癌関連遺伝子変異を検索した。腫瘍由来 DNA の陽性率や MAF を対応ある血液サンプルと比較し、腹腔内転移所見や腫瘍マーカーの関連性の検討を加えた。さらに、腹腔洗浄液中の腫瘍由来 DNA の再発や予後への影響を明らかにするため生存解析を行った。

結果は132例より得た188サンプル中25サンプル(13.3%)に *KRAS* 遺伝子変異を検出し、NGSでは *KRAS* 遺伝子変異以外に複数の膵癌関連遺伝子変異も検出した。P1症例の腹腔洗浄液中 *KRAS* 遺伝子変異陽性率は血中より有意に高率($P<0.001$)で、MAFはP1、CY1の所見に伴い腹腔洗浄液中で高値だった(P0CY1, $P=0.084$ 、P1CY1, $P=0.031$)。同一症例3例のNGS解析では2例の腹腔洗浄液と血中から同一バリエーションの *KRAS*、*TP53* 遺伝子変異を検出し、1例は血中のみ *TP53* 遺伝子変異を検出した。前治療歴のない55例の予後因子解析では腹腔洗浄液中腫瘍由来 DNA が独立した予後不良因子であった(HR 3.607, 95% CI 1.165–11.164, $P=0.029$)。

本研究によって得られた結果は、画像診断では検出困難な腹腔内微小転移を有する膵癌に対して腹腔洗浄液が血液と比べリキッドバイオプシーに適した生体試料であることを示唆した。さらに、膵癌の腹腔洗浄液を用いたリキッドバイオプシーは、腹膜転移の予測・早期診断、腹腔内化学療法を見据えた腹膜転移特異的な治療標的候補の探索および治療効果判定に有用な可能性が見出され、将来的な集学的治療への寄与の可能性を含む点で学位に値する。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。