

膵液の分子生物学的検討による膵腫瘍診断へのアプローチ

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/40449

胆汁・膵液から何がわかるか？—採取のノウハウから臨床的意義まで—

膵液の分子生物学的検討による膵腫瘍診断へのアプローチ*

渡邊 弘之¹⁾・大坪公士郎¹⁾・岡田 源作¹⁾・毛利 久継¹⁾
山口 泰志¹⁾・澤武 紀雄¹⁾

要約：PanIN 分類のモデルでも、*K-ras* 変異は膵発癌の early event に生じる遺伝子異常とされ、膵液・十二指腸液中の *K-ras* 変異は、膵胆道癌のスクリーニングにその応用が期待される。膵液中の *p53* 変異は感度は不十分であるものの癌特異性に優れており、今後、より簡便で感度の良い検出法の開発が待たれる。膵液中の *SARF2* メチル化異常は、IPMN を含めた膵腫瘍のスクリーニングに有用であり、*TFPI-2* のメチル化は、感度は 60% 程度であるが、癌特異性の高いマーカーとして期待される。膵液中のテロメラーゼ活性は感度は高いが、特異性の点で検討されている。

Key words： *K-ras* 変異, *p53* 変異, メチル化, テロメラーゼ

はじめに

各種画像診断法の発達により、ある程度の大きさの膵癌は診断が可能となったが、依然として根治切除可能な症例は少なく、腫瘍径 2 cm 以下の TS1 膵癌やさらに膵内に限局する stage I などの切除可能な小膵癌の検出率は、それほど上昇していない。これは、膵臓組織が漿膜を持たないために周囲組織へ浸潤・転移を生じやすいなどの解剖学的特徴を持つことに加え、膵癌固有の急速な増殖進展を示す分子生物学的悪性度のために、早期病変での診断が困難な状況を反映しているものと思われる。また、鑑別診断として、自己免疫性膵炎をはじめとする腫瘍形成性膵炎や嚢胞性膵疾患など良悪性の鑑別困難な症例も少なくない。これは、膵癌では、胃癌や大腸癌のように生検が容易でなく、また膵液細胞診もいまだ十分な診断感度を有していないことによるところが大きい。

膵癌の早期診断には、US/CT/MRI (MRCP) などの画像診断の他、EUS, ERCP, IDUS などの内視鏡関

連の検査が主体をなすが、病理組織学的診断として、膵液細胞診や膵管生検がなされている。膵管上皮由来の膵管癌は、膵液に異常が反映されやすいことより、膵液遺伝子検査は、臨床的な膵癌の早期診断法や確定診断法として期待されている。一方、膵液細胞診は、各種細胞診の中でも診断が難しく、その陽性率は期待されているほどに高くない。

われわれは、過去 25 年以上にわたり、膵液を用いた膵管癌の早期診断へのアプローチを一貫して研究してきたので、その成績を中心に報告する。

I. *K-ras* コドン 12 点突然変異1. 膵液検体による *K-ras* 変異

内視鏡下経乳頭的に採取した膵液、膵管ブラッシング法により得たスメア、あるいは US や EUS-FNA で得られた DNA において *K-ras* 分析が行われてきた^{1,2)}。それらにおける *K-ras* コドン 12 変異の検出率は、検出法の感度によりその陽性率は異なるが、mutant allele specific amplification (MASA) などの感度の高い方法を用いると膵癌で 80% 以上で陽性となる。一般に膵液の遺伝子診断には、沈渣から抽出された DNA が用いられるが、筆者ら³⁾は、膵癌患者より得た膵液の検査で *K-ras* コドン 12 の変異が 79% (15/19) であるのに対して、上清では 89% (17/19) に検

* Approach to the Diagnosis of Pancreatic Neoplasm by Molecular Biological Analysis of Pancreatic Juice

1) 金沢大学がん研究所腫瘍内科 (〒 920-0934 金沢市宝町 13-1)

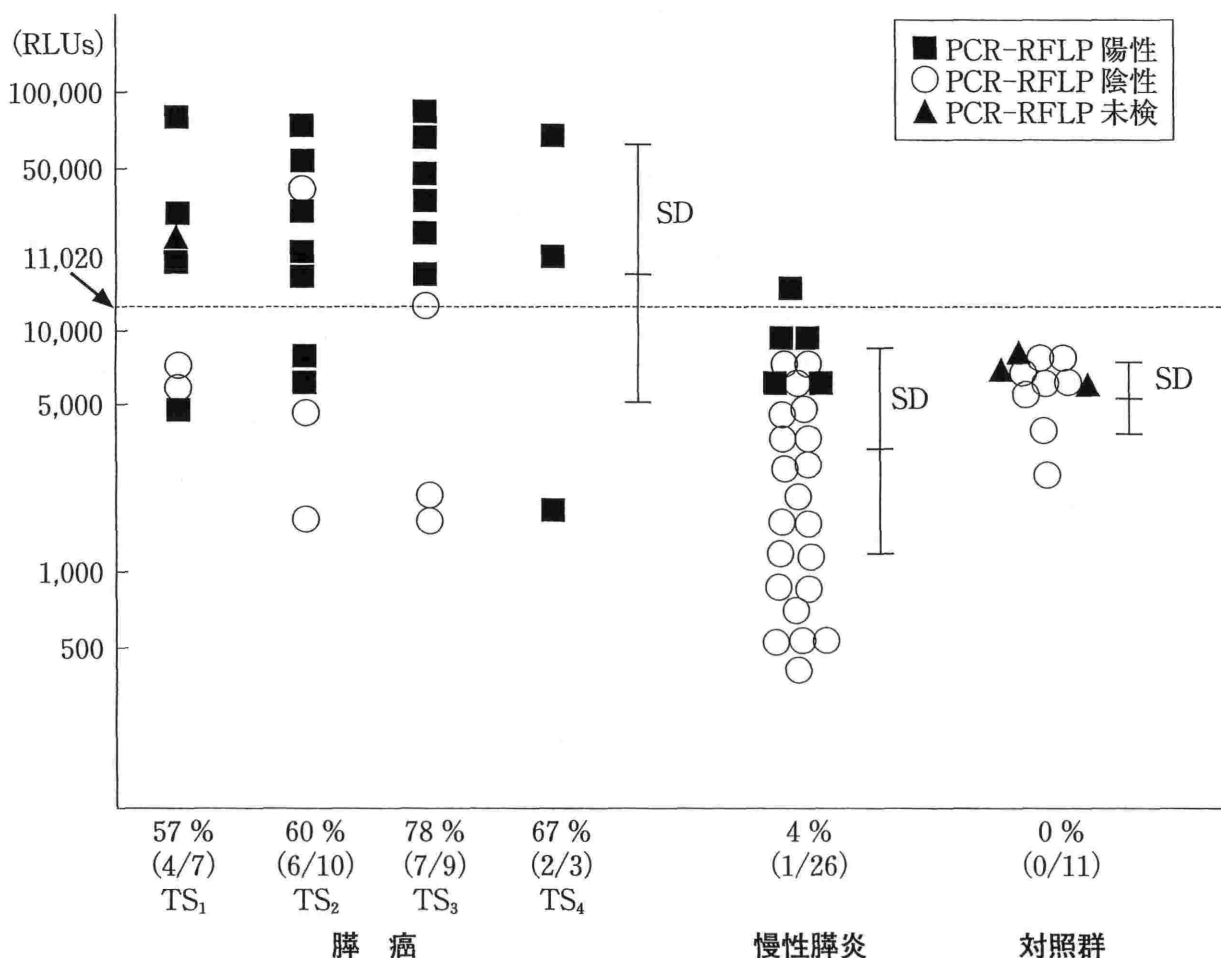


図1 HPA法による*K-ras*コドン12変異の定量的測定

PCR-RFLP法（高感度定性法）で陽性である慢性膵炎5例中4例は、HPA法でカットオフ値（11,020RLUs）以下で、陰性と判定される。

出され、両者を組み合わせると陽性率は100%に達するという成績を得ている。これは脱落した正常上皮が多く含まれる沈渣に対して、アポトーシスなどにより癌細胞からfragment化したDNAが膵液の上清に分布しやすいために相対的に上清中に変異DNAが高濃度に含まれ、検出されやすくなるものと考えられる。一方、Yanagisawaら⁴⁾は、慢性膵炎や高齢者における膵管上皮の粘液細胞過形成にすでに*K-ras*変異が発生していることを明らかにした。さらに、良性腫瘍であるIPMNでも*K-ras*変異が高頻度にみられることも知られるようになっており、PanIN分類のモデルでも、*K-ras*変異は膵発癌のearly eventに生じる遺伝子異常とされている。筆者らの高感度法による膵液における成績³⁾でも、慢性膵炎で*K-ras*変異が20~30%前後に検出されており、癌特異性という点においては、その有用性が疑問視されるようになった。したがって、*K-ras*変異検出には、定量法測定法の導入により癌特異性を向上させることが求められる。筆者ら⁵⁾は、*K-ras*変異を半定量的に測定できるhybridization protection

assay (HPA) 法を開発した。図1に示すように、膵癌患者膵液のHPA値は、66% (19/29) でカットオフ値の11,020 RLUs以上を示したが、慢性膵炎での陽性率は4% (1/26) にとどまるという成績が得られている⁶⁾。また、TS1 (腫瘍径2 cm 以下) でも57%に検出し得ており⁶⁾、小膵癌でも検出し得る癌特異性の高い検査法として期待される。

2. 十二指腸検体による*K-ras*変異

筆者⁷⁾は、ERCPに引き続きスコープの吸引機構を利用して、2~5 mlの十二指腸液を採取し、MASA法で*K-ras*コドン12変異を検討したところ、膵癌で66% (25/38)、胆道癌で55% (12/22) で陽性を認めた。この方法では、慢性膵炎でも32% (12/38) に偽陽性を認めるが、これを踏まえて利用すれば、膵胆道癌のスクリーニングで有用なことが示唆される。

II. *p53* 遺伝子変異

膵癌の*p53*変異には、*K-ras*コドン12のようなホッ

	細胞診	
	class I, II, III (n=15)	class V, IV (n=2)
遺伝子診断	● ● ● ●	● ●
	● ●	
	◎	
	○ ○ ○ ○	
	○ ○ ○ ○	

p53 and *K-ras* mutant: ● *K-ras* mutant only: ○
p53 mutant only: ◎

図 2 膵癌膵液における遺伝子診断と細胞診の比較

トスポットがなく、11 個の exons に変異点が分散しているが、約 90% は exon5~8 (codon128~306) に変異が集中している。膵癌組織における *p53* 遺伝子変異の検出頻度は 40~70% であるが、PanIN 分類にも提示されているように、過形成や腺腫ではその変異はほとんどみられず、変異が出現するのは悪性腫瘍としての病理形態学的特徴が明らかとなった時点以降であるという一致した見解が得られている。筆者ら⁸⁾は、膵液も沈渣で exon5~8 について PCR-SSCP 法および direct sequencing 法にて検索したところ、42% (11/26) に変異陽性を認め、これに上清を併用して検索した例では、陽性率は 52% (11/21) まで向上した⁹⁾。さらに、これらの中、細胞診陰性膵癌 15 例中 7 例 (47%) で *p53* 変異陽性を認めた (図 2)。一方、IPMN 4 例や慢性膵炎 25 例に陽性例はなく、癌特異性に非常に優れており、*p53* 遺伝子変異検索は、細胞診を補完し得るとの結果を得ている。他施設から、IPMN 患者の膵液で 42% (5/12) に *p53* 変異を検出し、変異陽性 5 例中 3 例は腺腫であったとの報告がある¹⁰⁾。このように、膵癌における *p53* 変異検索は感度は不十分であるものの癌特性には優れており、手技がやや煩雑であるので、今後、より簡便で感度の良い検出法の開発が待たれる。

III. SAGE 法により膵管癌に特異的に発現する遺伝子

最近、Ryu ら¹¹⁾により、SAGE 法を用いたスクリーニングにより、正常膵管上皮細胞では発現せず、膵癌細胞で高頻度に発現がみられる遺伝子群が同定された。そのうちの 1 つである *mesothelin mRNA* は、切除膵癌組織 4 例すべてに *in situ hybridization* が陽性で、膵癌細胞株 20 例中 18 例 (90%) で RT-PCR が陽性で、さらに、切除膵癌組織 60 例のすべてで免疫染色が陽性であったと報告された¹²⁾。筆者ら¹³⁾は、各種膵

疾患患者の膵液より RNA を抽出し、RT-PCR にて検討したところ、膵管癌で 52% (11/21)、IPMN で 45% (5/11)、慢性膵炎で 14% (3/22) に *mesothelin mRNA* の発現がみられた。膵癌と慢性膵炎との間には有意差がみられ、膵癌の方が、IPMN よりも発現が強く、定量的な検出法により、有用なマーカーとなる可能性がある。今後、このような遺伝子群からのトランスレシヨナル的なアプローチの推進も期待される。

IV. 癌関連遺伝子のメチル化異常

最近では、遺伝子異常のみならず、各遺伝子の発現調節に関わる epigenetic な因子にも変化がみられることが明らかにされている。

メチル化を指標としたマイクロアレイの網羅的解析により、膵癌組織で 90% 以上にメチル化異常がみられるが、正常組織ではメチル化異常のみられない遺伝子群が同定された¹⁴⁾。

IPMN の良・悪性群の分類には、手術材料で境界病変以上と病理診断された 3 例と、分枝型 IPMN の癌の指標とされる①上皮の乳頭状増殖性病変の高さ: 6 mm 以上②主膵管径: 7 mm 以上③嚢胞径: 30 mm 以上、のいずれかを満たすもの 8 例の計 11 例を悪性群とし、手術材料で腺腫や過形成と病理診断された 2 例と上記の①~③のいずれも満たさないもの 7 例の計 9 例を良性群に分類した。

方法は、膵液の上清・沈渣に遠心分離後、DNA を抽出し、bisulfite 処理後、非メチル化プライマーとメチル化プライマーの 2 組を用いて、Methylation-specific PCR (MSP) と Real-time MSP にて検討した。なお、これまでの *K-ras*、*p53* 変異の検討などにより、膵液上清は沈渣と同等以上の成績が得られるとの経験より、主に上清サンプルにて検討した。

SARP2 は、膜貫通型 frizzled protein の cysteine-rich domain (CRD) に対する相同物であり、secreted frizzled related protein-1 (SFRP-1) と相同の遺伝子で¹⁵⁾、Wnt シグナル伝達系に対して抑制的に働き、一方で、apoptosis に対して、誘導的に作用するとされている。SARP2 のメチル化による転写抑制により、ヒト癌では、Wnt シグナル系の活性化が生じ、癌化が促進されることが明らかにされている。

膵癌細胞株の検討では、SARP2 のメチル化の頻度は、89% (8/9) にみられた¹⁶⁾。

各種膵疾患別の膵液中の SARP2 のメチル化の頻度は、IPMN 良性群で 89%、IPMN 悪性群で 82%、膵癌で 70% と高率にみられ、慢性膵炎 5% との間に有意差

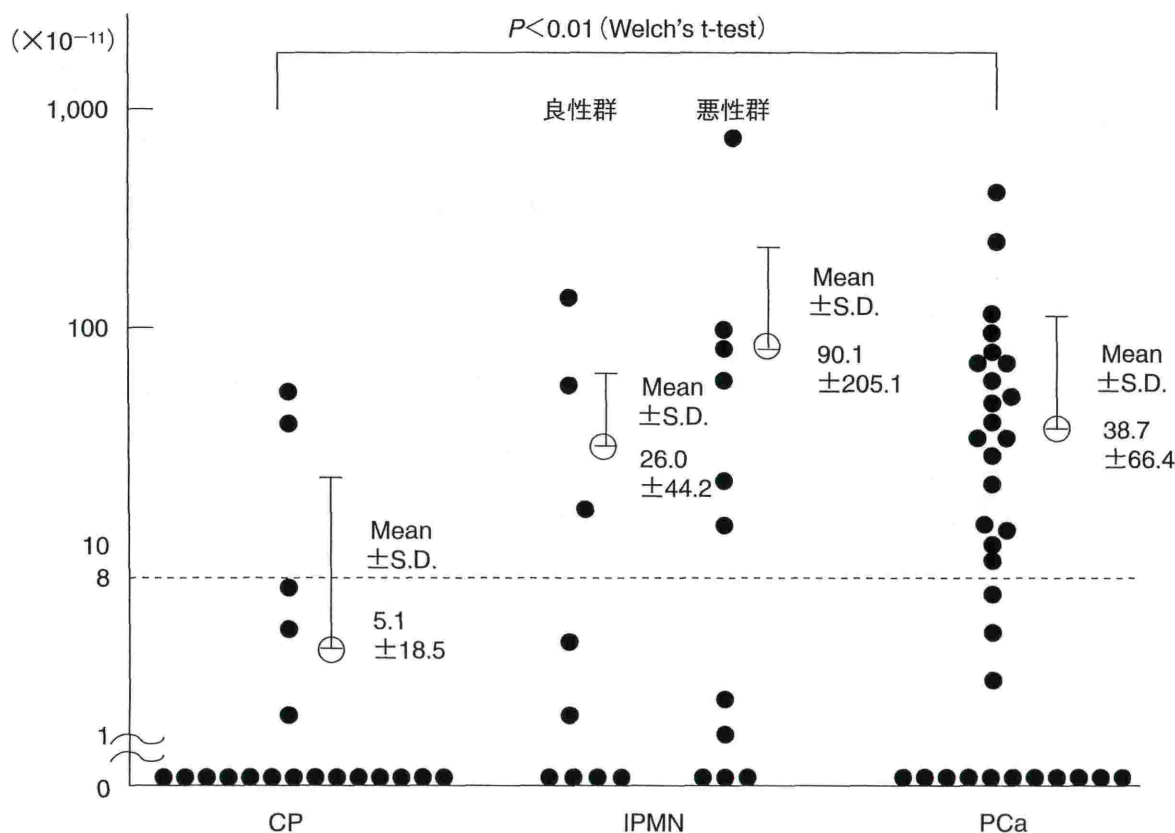


図3 膵液上清におけるSARP2とGAPDHの比(定量的MSP法)

がみられた¹⁶⁾。このように、SARP2のメチル化は、IPMNを含めた膵腫瘍のスクリーニングに有用なマーカーとなることが期待される。

LightCyclerによるReal-time MSP法による定量的MSPの解析でも、図3に示すように、膵液上清中のSARP2メチル化の定量値を内部コントロールのGAPDHの定量値で割った値を片対数グラフにプロットした。平均値と標準偏差を求め、Welch's t-testを用いた検定では、膵癌と慢性膵炎の間に有意差がみられた¹⁶⁾。8 $\times$ 10⁻¹¹をカットオフ値とすると、膵癌で58%、IPMNの悪性群で55%、良性群で33%、慢性膵炎で11%の陽性率となり、膵癌と慢性膵炎の間ならびにIPMNの悪性群と慢性膵炎の間には、有意差がみられた¹⁶⁾。

TFPI-2はKnitz-type serine proteinase inhibitorで、蛋白分解酵素活性の抑制作用から、基質を分解から保護し、腫瘍浸潤や転移を阻止すると考えられている^{17,18)}。TFPI-2遺伝子発現の低下とTFPI-2メチル化は、しばしば非小細胞肺癌の進行病期と関連しており、その不活性化の機序にメチル化が想定されている。また、TFPI-2のプロモーターは、リンパ節転移患者でしばしばメチル化されていることが報告されている¹⁹⁾。メチル化異常は、膵癌組織で高頻度にみられ

るが、正常膵組織ではみられず、膵癌のphenotypeとして注目されている¹⁴⁾。

膵癌細胞株におけるTFPI-2メチル化の頻度は、MSP法で75% (6/8)にみられた。また、MSP法による膵液中TFPI-2のメチル化陽性率は、膵癌で58.3%に対して、IPMN悪性群で20%、良性群で14.3%、慢性膵炎で11%であった。膵癌とIPMN、膵癌と慢性膵炎の間で、TFPI-2のメチル化の陽性率に有意差がみられた²⁰⁾。図4に示すように、Real-timeを用いた定量的MSPの解析でも、TFPI-2/MYOD1比のメチル化指数では、同様に、膵癌とIPMN、膵癌と慢性膵炎の間で有意差がみられた。さらに、ROC曲線より求めたカットオフ値2.5を指標とすると、TFPI-2のメチル化陽性率は、膵癌で62.1%、IPMNで5.9%、慢性膵炎で14.3%となり、有意に膵癌で高率であった²⁰⁾。

ジョーンズホプキンス大学のSatoら²¹⁾は、*in situ* carcinomaをhigh grade IPMNと分類して、microdissection法にて検討し、20例中18例(90%)にメチル化がみられたのに対し、adenomaやborderline lesionをlow grade IPMNと分類し、そのメチル化陽性率は、12例中2例(16.7%)と低率であったと述べている。さらに、膵癌組織では、140例中102例(72.8%)と報

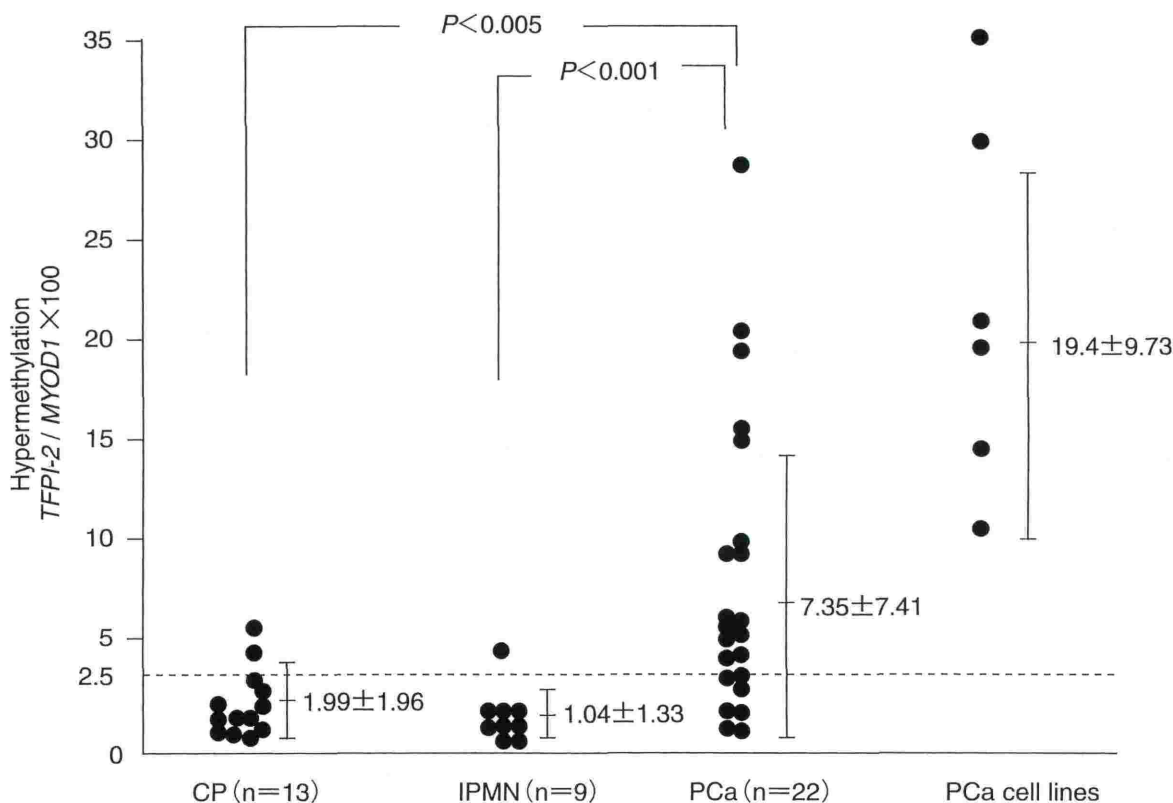


図 4 膵液ならびに膵癌細胞株におけるメチル化 *TFPI-2/MYOD1* 比 (real-time MSP)

告している。このように、*TFPI-2* のメチル化は、癌特異性の高いマーカーとして、期待される。

V. テロメラーゼ

テロメアは、染色体末端部に存在する TTAGGG の反復構造からなる DNA-蛋白複合体で、癌細胞では逆転写酵素である telomerase (TE) が活性化され、テロメアを伸長させることにより、分裂能を維持するといわれ、TE 活性は癌特異的な指標として注目され、切除膵癌でもほとんどの症例で TE 活性が上昇するが、良性の膵腫瘍性病変や慢性膵炎ではほとんど活性の上昇がみられないとされる。

1. 膵液検体を用いたテロメラーゼ活性の測定

Iwao ら²²⁾ は、TRAP 法により TE 活性を測定し、膵癌 15 例では、上皮内癌 1 例を含む 13 例 (87%) に TE 活性がみられたが、慢性膵炎などの良性疾患 17 例では TE 活性はみられず、また、膵癌の膵液細胞診の陽性率 53% (8/15) に比して優れていると報告している。Suehara ら²³⁾ は、TRAP 法の半定量的測定法を工夫し、膵癌で 75% (9/12) がカットオフ値を超えて陽性であるとしている。Uehara ら²⁴⁾ も *in situ* TRAP 法により膵液中 *in situ* TE 活性を測定し、膵癌で 90% (9/10) に TE 活性が高度にみられ、IPMN では 50% (2/

4) に軽度のみられ、正常 3 例ではみられなかったと報告している。

2. 膵液検体を用いた hTERT mRNA の測定

TE 活性の触媒サブユニットである human telomerase reverse transcriptase (hTERT) が同定され、その発現量は TE 活性を強く反映し、RT-PCR 法で測定可能である。Seki ら²⁵⁾ は、RT-PCR 法を用いて膵液中 hTERT mRNA を測定し、膵癌で 88% (15/17) で陽性であったが、慢性膵炎でも 17% (2/12) に陽性であり、後者は CD25 陽性のリンパ球に由来することを報告している。したがって、TE 活性や hTERT を癌特異性の高い診断法として利用するには、高感度で高精度の定量的測定法を開発することが求められる。

参考文献

- 1) Watanabe H, Sawabu N, Ohta H, et al. : Identification of *K-ras* oncogene mutations in the pure pancreatic juice of patients with ductal pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res* **84** : 961-965, 1993.
- 2) Tada M, Komatsu Y, Kawabe T, et al. : Quantitative analysis of *K-ras* gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration : clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* **97** : 2263-2270, 2002.

- 3) Ha A, Watanabe H, Yamaguchi Y, et al. : Usefulness of supernatant of pancreatic juice for genetic analysis of *K-ras* in diagnosis of pancreatic carcinoma. *Pancreas* **23** : 356-363, 2001.
- 4) Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, et al. : Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* **53** : 953-956, 1993.
- 5) Watanabe H, Miyagi C, Yamaguchi Y, et al. : Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay : a simple method for the determination of the types of point mutations. *Jpn J Cancer Res* **87** : 466-474, 1996.
- 6) Watanabe H, Yamaguchi Y, Ha A, et al. : Quantitative determination of *K-ras* mutations in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer using hybridization protection assay. *Pancreas* **17** : 341-347, 1998.
- 7) Watanabe H, Ha A, Hu YX, et al. : *K-ras* mutations in duodenal aspirate without secretin stimulation for screening of pancreatic and biliary tract carcinoma. *Cancer* **86** : 1441-1448, 1999.
- 8) Yamaguchi Y, Watanabe H, Songur Y, et al. : Detection of mutations of *p53* tumor suppressor gene in pancreatic juice and its clinical application to diagnosis of patients with pancreatic cancer : comparison with *K-ras* mutation. *Clin Cancer Res* **5** : 1147-1153, 1999.
- 9) Wang Y, Yamaguchi Y, Watanabe H, et al. : Detection of *p53* gene mutations in the supernatant of pancreatic juice and plasma from the patients with pancreatic carcinoma. *Pancreas* **28** : 13-19, 2004.
- 10) Kaino M, Kondoh S, Okita S, et al. : Detection of *K-ras* and *p53* gene mutations in pancreatic juice for the diagnosis of intraductal papillary mucinous tumors. *Pancreas* **18** : 294-299, 1999.
- 11) Ryu B, Jones J, Blades NJ, et al. : Relationships and differentially expressed genes among pancreatic cancers examined by large-scale serial analysis of gene expression. *Cancer Res* **62** : 819-826, 2002.
- 12) Argani P, Iacobuzio-Donahue C, Ryu B, et al. : Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas : identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin Cancer Res* **7** : 3862-3868, 2001.
- 13) Watanabe H, Okada G, Ohtsubo K, et al. : Expression of mesothelin mRNA in pure pancreatic juice from patients with pancreatic carcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas, and chronic pancreatitis. *Pancreas* **30** : 349-354, 2005.
- 14) Sato N, Fukushima N, Maitra A, et al. : Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* **63** : 3735-3742, 2003.
- 15) Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, et al. : SARPs : a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 13636-13641, 1997.
- 16) Watanabe H, Okada G, Ohtsubo K, et al. : Aberrant methylation of secreted apoptosis-related protein 2 (SARP2) in pure pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic neoplasms. *Pancreas* **32** : 382-389, 2006.
- 17) Konduri SD, Tasiou A, Chandrasekar N, et al. : Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* **18** : 127-131, 2001.
- 18) Rao CN, Mohannan S, Puppala A, et al. : Regulations of ProMMP-1 and ProMMP-3 activation by tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **255** : 94-98, 1999.
- 19) Rollin J, Jochmann S, Blechet C, et al. : Expression and methylation status of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **92** : 775-783, 2005.
- 20) Jiang P, Watanabe H, Okada G, et al. : Diagnostic utility of aberrant methylation of *tissue factor pathway inhibitor-2* in pure pancreatic juice for pancreatic carcinoma. *Cancer Sci* **97** : 1267-1273, 2006.
- 21) Sato N, Parker AR, Fukushima N, et al. : Epigenetic inactivation of *TFPI-2* as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **24** : 850-858, 2005.
- 22) Iwao T, Hiyama E, Yokoyama T, et al. : Telomerase activity for preoperative diagnosis of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* **89** : 1621-1623, 1997.
- 23) Suehara N, Mizumoto K, Tanaka M, et al. : Telomerase activity in pancreatic juice differentiates ductal carcinoma from adenoma and pancreatitis. *Clin Cancer Res* **3** : 2479-2483, 1997.
- 24) Uehara H, Nakaizumi A, Ishii H, et al. : In situ telomerase activity in pancreatic juice may discriminate pancreatic cancer from other pancreatic diseases. *Pancreas* **36** : 236-240, 2008.
- 25) Seki K, Suda T, Aoyagi Y, et al. : Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in pancreatic juice with sample qualification. *Clin Cancer Res* **7** : 1976-1981, 2001.

* * *