

論文内容要旨

論文題目

膵癌個別化治療スクリーニングのための迅速細胞診検体を用いた
droplet digital PCR による KRAS 遺伝子変異解析:後ろ向き研究

責任講座： 内科学第二講座

氏 名： 鈴木 裕也

【内容要旨】(1,200 字以内)

【背景と目的】膵癌は予後不良な難治性疾患だが、近年は癌パネル検査に基づく個別化治療が期待されている。しかし、癌パネル検査は高価で長時間を要し、個別化治療到達率は低く、膵癌全例への施行は非効率的である。今回われわれは、膵癌診断の組織採取法である超音波内視鏡下穿刺吸引術時に得られ、日常診療で破棄される迅速細胞診検体 (Rapid On-Site Evaluation、ROSE 検体) から核酸を抽出し、droplet digital PCR で個別化治療到達率の高い KRAS G12C と KRAS 野生型を拾い上げるにより、癌パネル検査の実施推奨度を層別化可能と考え、その信頼性を後方視的に評価した。

【方法】当院にて 2019 年 11 月から 2021 年 8 月まで、膵癌に対して超音波内視鏡下穿刺吸引術が施行された 55 例を対象とした。検体は保存 ROSE 検体 55 例 107 枚を用いた。比較対照として、穿刺針を生理食塩水で水洗しシャーレ上の残余検体と共に回収した保存洗浄残余検体 55 例 55 検体、保存末梢血液由来の血漿 cell-free DNA 30 例 30 検体を用いた。陰性対照として保存末梢血液由来の germline DNA 30 例 30 検体、陽性対照として手術標本由来の FFPE 検体 20 例 20 検体を用いた。各検体から DNA 抽出し、droplet digital PCR で KRAS G12/13 及び KRAS G12C プライマーを用いて遺伝子変異解析を行った。

【結果】ROSE 検体の平均 DNA 抽出量は 66.7 ng/枚であり、ROSE スライド上の細胞数増加と共に DNA 抽出量は有意に増加した。KRAS G12/13 変異陽性率は、ROSE 検体 94.5% (52/55)、洗浄残余検体 89.1% (49/55)、血漿 cell-free DNA 20.0% (6/30)、手術標本 FFPE 検体 90.0% (18/20)、全血 germline DNA 0% (0/30) だった。KRAS G12C 変異は全検体で検出されなかった。KRAS G12/13 変異における手術標本との一致率は、ROSE 検体 85.0% (17/20)、洗浄残余検体 80.0% (16/20)、血漿 cell-free DNA 27.3% (3/11) だった。ROSE 検体と洗浄残余検体は血漿 cfDNA と比して有意に KRAS 変異の手術標本との一致率が高かった。ROSE 検体と洗浄残余検体で有意な差はなかった。

【考察】ROSE 検体と洗浄残余検体は共に信頼性が高いことが明らかとなった。ROSE 検体は洗浄残余検体と比して細胞を視認可能であり、実臨床ではより信頼性の高い検体と考えられる。膵癌パネル検査に対する実施推奨度の層別化を目的とした KRAS 変異解析や ROSE 検体を用いた droplet digital PCR による KRAS 変異解析の報告はなく、本研究が世界で初めての報告である。この手法により、癌パネル検査の実施推奨度を安価で低侵襲に、短時間で層別化可能となり、限られた医療費をより有効に活用しながら膵癌の予後改善に寄与出来る可能性がある。

令和 5 年 1 月 4 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学 位 論 文 審 査 結 果 報 告 書

申請者氏名：鈴木 裕也

論文題目：膵癌個別化治療スクリーニングのための迅速細胞診検体を用いた
droplet digital PCR による KRAS 遺伝子変異解析：後ろ向き研究

審査委員：主審査委員 浅尾 裕信

副審査委員 元井 冬彦

副審査委員 鈴木 民夫



審査終了日：令和 4 年 12 月 28 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

膵癌は予後不良の疾患であるが、近年 *KRAS* 等の遺伝子変異の有無を癌パネル検査で検出することによる個別化治療が可能になってきている。しかし癌パネル検査は費用と検査に時間がかかることから、より簡便で迅速な検査で癌パネル検査の実施推奨度を層別化することが重要である。

申請者は膵癌診断時に得られ、将来廃棄される超音波内視鏡下穿刺吸引術検体の迅速細胞診 (ROSE) 検体や穿刺針内の洗浄検体を利用して droplet digital PCR (ddPCR) による *KRAS* 遺伝子変異の検出を後方視的に検討し以下の結果を得た。

- 1) 55 症例の ROSE 検体 107 枚のうち、DNA を得られなかったのは 15 枚 (14%) であり、細胞数が少ない検体であった。
- 2) ddPCR による *KRASG12* や *KRASG13* の変異の陽性率は、ROSE 検体 94.5%、洗浄残余検体 89.1%と、血漿 cell free DNA の 20.0%より有意に高く、陽性対照とした手術標本由来パラフィン包埋検体 (FFPE) の 90.0%と同等であった。ただ 55 症例の中に *KRASG12C* の変異は認められなかった。これら ROSE 検体、洗浄残余検体と、陽性対照 FFPE 検体との一致率はそれぞれ 85.0%、80.0%と高かった。

廃棄される ROSE 検体を用いた ddPCR による *KRAS* スクリーニング検査は信頼性が高いことがわかった。このような安価で迅速な *KRAS* 遺伝子解析を行うことは、迅速な個別化医療の選択を可能とし、また癌パネル検査の推奨度を層別化でき、限られた医療資源の有効利用を可能とすると考えられる。*KRASG12C* の変異については、その後の追加症例の ROSE 検体を用いた ddPCR で検出可能であることを確認している。ROSE 検体から DNA 抽出に十分な細胞数が存在することの確認や周囲組織のコンタミネーションを防止し、偽陰性や偽陽性症例を減らすなどの課題は残されているが、今後さらなる前方視的研究をすすめて行くうえで重要な研究であると考えられる。以上から、本学位論文審査委員会は本研究論文を博士 (医学) の授与に値すると判定した。

(1, 200字以内)