

主 論 文 要 旨

報 告 番 号	① 乙 第	号	氏 名	嶋 根 学
主 論 文 題 名 Molecular diagnosis for detecting <i>KRAS</i> mutation in peritoneal washing fluid of pancreatic ductal adenocarcinoma (膵癌症例の腹腔内洗浄液に対する <i>KRAS</i> 遺伝子変異解析による分子生物学的診断の有用性に関する研究)				
(内 容 の 要 旨) 浸潤性膵管癌（以下、膵癌）において腹腔内洗浄細胞診（以下、CY）は予後不良因子と報告され、膵癌取扱い規約第8版では非切除因子として改訂された。CYは高い特異度を有する一方で、感度が低い診断手法であり、術中腹腔中洗浄液（intraoperative peritoneal washing fluid: IPWL）中の浮遊腫瘍細胞を同定するためには、より高感度で信頼性の高い診断ツールが必要であると考えられる。近年、主に血液など液性検体を利用したリキッドバイオプシーが実臨床に応用されているが、IPWLもリキッドバイオプシーの材料として有用な可能性があると考えられた。そこで本研究では、IPWLに対してKirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (<i>KRAS</i>) 変異に対するPNA directed PCR clamping法を用いた分子生物学的手法で浮遊癌細胞の検出とその臨床的有用性について検討した。 2020年1月より2021年12月までに、手術を施行した膵癌例のうちIPWLを採取した症例を解析対象とした。IPWLより浮遊癌細胞由来DNA (peritoneal floating cell DNA: pfDNA) を抽出し、 <i>KRAS</i> 遺伝子変異をPNA directed PCR clamping法で検出した。またpfDNAに対してPNA directed PCR clampingを併施したSanger sequenceあるいは次世代シーケンスによる <i>KRAS</i> 変異解析を行った。 全54例のうち、CYと肉眼的腹膜播種結節 (P) で分類すると、CY0P0が45例 (83.3%) ,CY1P0が4例 (7.4%) ,CY0P1が2例 (3.7%) ,CY1P1が3例 (5.6%) であった。PNA directed PCR clampingで得られるCt値とCY1およびP1で相関を認めた (CY1 vs CY0, $p<0.001$, P1 vs P0, $p<0.001$)。またpfDNAに対するシーケンス結果では、14例 (25.9%) で <i>KRAS</i> 変異を同定した。pfDNAにおける <i>KRAS</i> 変異陽性に対するCt値の至適Cut-off ≤ 36.42 であり、PNA directed PCR clampingを用いた分子生物学的診断陽性と定義した。分子生物学的診断の感度/特異度/正確度はそれぞれ、100%/80.0%/85.2%であった。分子生物学的診断陽性は全体では22例 (40.7%) であり、CY0P0 45例では16例 (40.7%) であった。根治切除が施行された43例において、腹膜播種再発は分子生物学的診断陽性例で陰性例より統計学的優位に頻度が高かった (38.9% vs. 8.0%, $p=0.013$)。 <i>KRAS</i> 変異型膵癌細胞株 (AsPC-1, mutant <i>KRAS</i> G12D) と <i>KRAS</i> 野生型膵癌細胞株 (BxPC-3, wild <i>KRAS</i>) を0~100%の範囲で連続希釈したテンプレートを作成し、PNA directed PCR clampingの検出限界を検証した。PNA directed PCR clamping法の検出限界は0.1%であった。一次方程式では、 $Ct = -2.645 \times \log (\text{mutant allele frequency: MAF}) + 35.00$ であり、相関係数は0.954であった。分子生物学的診断陽性のカットオフ値36.42は、MAFは0.29%であった。 pfDNAに対するPNA directed PCR clamping法を用いた分子生物学的診断はCYより検出感度が高く、分子生物学的診断陽性例では術後腹膜播種再発が高頻度であった。本研究は、分子生物学的診断はCYの低い検出感度を補い、術後腹膜播種再発の予測バイオマーカーとして腹膜播種再発のリスク層別化に有用であることを示唆し、膵癌治療における新たな戦略を提案した。				