

【要約】

Analysis of circulating cell free DNA after EUS-FNA in
pancreatic ductal adenocarcinoma

(膵癌における EUS-FNA 前後の cell free DNA を用いた解析)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：加藤直也教授)

浅野 公将

背景

膵癌は、予後不良の致命的な悪性腫瘍であり、その死亡率は発生率と密接に類似している。現在、米国で3番目に多い癌による死亡原因であり、欧州連合と日本では4番目になっており、2030年までに米国で2番目に多い癌関連死の原因になると予想されている。

超音波内視鏡ガイド下穿刺吸引生検(Endoscopic Ultrasound-Fine Needle Aspiration, 以下EUS-FNAと略す)は、膵癌を他の膵臓疾患と区別でき、外科的切除または化学療法の前に病理組織を採取することができる有用な方法である。EUS-FNAは、合併症率0.98%、死亡率0.02%で安全な手技として認識されてきたが、EUS-FNAによる穿刺ルートの腹膜播種の報告が近年、増加している。術前のEUS-FNAが生存に悪影響を及ぼさなかったとの報告もあるが、これらの報告は後ろ向き研究である。

一方で、穿刺ルートの播種に加えて、穿刺後の血流への腫瘍細胞の流出も懸念されており、乳癌で針生検後に遠隔転移率の上昇と関連している報告や、前立腺癌で生検後のCTC(circulating tumor cells)の増加が、予後不良と関連しているとの報告もある。Levyらは、膵癌EUS-FNA後cell free DNA(cfDNA)濃度の2倍以上の上昇、もしくは新規のKRAS遺伝子変異検出をtumoremiaと定義し、新規遠隔転移を発症する可能性が高いと報告しているが、tumoremiaが腫瘍細胞によって引き起こされたかは不明である。

KRAS遺伝子変異検出を含んだcfDNA：circulating tumor DNA(ctDNA)は、膵癌の診断及び予後予測に有用な手段と報告されている。また、cfDNA濃度は、生存率の低下と関連していて、KRAS遺伝子変異検出は、膵癌の化学療法に対するモニタリングとして有用との報告もある。また、Cell-surface vimentin(CSV)を使用したCTCは膵癌で高い感度と特異性を持っていると報告されている。

本研究では、KRAS遺伝子変異検出とCTC検出を用いて、EUS-FNA後の腫瘍細胞やその成分の増加に伴ってcfDNA濃度が増加するかどうか、また、EUS-FNA後cfDNA濃度の増加が、臨床的および技術的要因、新規遠隔転移の発生、または手術後の無再発生存期間(recurrence-free survival, 以下RFSと略す)に関連しているかどうかを検討した。

方法

2019年6月から2020年8月まで、156例が千葉大学医学部附属病院でEUS-FNAを施行され、56例は、20歳未満、複数の癌、または他の疾患、他の膵臓疾患、または膵癌術後再発にてEUS-FNAを施行されたため、除外した。100例が膵癌疑いにてEUS-FNAをされ、最終的に、病理学的に膵癌と診断された68例が対象となった。CTCは、2020年3月から2020年8月に膵癌疑いに対してEUS-FNAを施行された8例を対象とした。本研究は、千葉大学大学院医学研究院の倫理審査委員会(承認番号：3438)によって承認され、患者さんに書面による説明を行い、同意を得た。

患者情報(年齢、性別、腫瘍の位置、病期、白血球数、CRP、CA19-9、Alb、門脈浸潤)は、千葉大学医学部附属病院の電子カルテにて調査し、膵癌の臨床病期は、TNM分類

(UICC 第 8 版)に従って決定した。

EUS-FNA 前後に計 136 の末梢血サンプルが収集され、既報に従い、EUS-FNA 後 15 分以内に cfDNA 採血管に約 8mL 収集した。腫瘍径は EUS 時の測定値を用い、EUS-FNA は胃または十二指腸から行われ、針は 22G または 25G を使用し、サンプル採取の吸引圧は 22G で-20cmH₂O、25G で-50cmH₂O とした。ストロークはドアロック法で 5 回または 15 回であった。迅速診断にて、病理学的に膵癌を確認し、研究用として 1 回採取を施行し、手技を完了とした。

血液サンプルは、3000rpm、4°C で 15 分間遠心分離し、血漿を採取、16000G、4°C で 10 分間遠心分離し、cfDNA 抽出まで血漿を-80°C で保存した。cfDNA は、MagMAXcfDNA 分離キットと King Fisher Duo Prime を使用して 1mL の血漿から抽出した。1mL の血漿から 50 μ L の cfDNA を抽出し、5 μ L の cfDNA を使用して、Qubit4 Fluorometer で cfDNA 濃度測定を施行、ddPCR は Multiplex *KRAS* ddPCR(*KRAS* G12A、G12C、G12D、G12R、G12S、G12V、G13D)と 9 μ L の cfDNA を用いて、QX200 リーダーおよび QuantaSoft ソフトウェアにてサンプルあたりの *KRAS* 遺伝子変異および野生型のコピー数を定量化した。*KRAS* 遺伝子変異は 3 つ以上のドロップの検出で有意とし、変異遺伝子頻度(MAF)は、*KRAS* 遺伝子変異/全 *KRAS* 遺伝子(%)で定義した。

CTC 検出は、8 例で EUS-FNA 前後にさらに 7.5mL の血液を採取し、K2-EDTA 採血管に保存し、CSV 抗体を Abnova Diagnostics Japan で分析した。

統計解析は、連続変数は、平均または中央値及び標準偏差で示し、student t 検定または Mann-Whitney U 検定を使用した。カテゴリ変数は頻度(%)で示し、Fisher の確率検定または Pearson のカイ 2 乗検定を使用した。ウィルコクソン符号順位検定または対応のある t 検定を使用して、2 つの対応のあるグループを比較した。RFS は Kaplan-Meier 法とログランク検定を使用して評価した。有意性を判断するための基準として $P < 0.05$ が使用した。統計分析には、EZR と SPSS を使用した。

結果

47 例は膵頭部に病変があり、平均腫瘍径は 30.0 ± 11.7 mm であった。さらに、29 例に遠隔転移を認めた。穿刺回数の中央値は 3 回で、47 例が 25G であった。ストローク回数は 37 例で 5 回、RFS のフォローアップは EUS-FNA 後 223 日(IQR、97-328)であった。EUS-FNA 前平均 cfDNA 濃度は 527.7 ± 827.3 ng / mL であった。EUS-FNA 前 cfDNA 濃度の中央値は 276ng / mL で、2 群に分けて検討した所、白血球数は、低 cfDNA 濃度群よりも高 cfDNA 濃度群で有意に多かった。血漿中の *KRAS* 遺伝子変異は、EUS-FNA 前に 7 例(66.0 ± 11.9 歳; 女性 4 例[57.1%])で検出され、臨床病期(*KRAS* 陽性 I / II / III / IV : 0/0/0/7 vs *KRAS* 陰性 I / II / III / IV : 10/20/9/22)、腫瘍径(41.1 ± 17.6 mm vs 28.7 ± 10.3 mm)、白血球数(9014.3 ± 3903.6 μ L vs 6172.1 ± 1818.7 μ L)、及び CRP(3.76 ± 3.31 mg / dL vs 0.82 ± 3.31 mg / dL)に有意差を認めた。*KRAS* 遺伝子変異陽性例の平均 cfDNA 濃度(709.1 ± 499.6 ng / mL vs 506.9 ± 857.3 ng / mL)は、*KRAS* 遺伝子変異陰性例よりも高い傾向にあった。

EUS-FNA 前後の cfDNA 濃度を比較した所、それぞれ 527.7 ± 827.3 ng / mL と 72.5 ± 919.6 ng / mL で有意差を認めた。EUS-FNA 後 cfDNA 濃度が 2 倍以上と 2 倍未満群の間で比較したが、臨床的および技術的要因に有意差は認めなかった。25G の穿刺と十二指腸からの穿刺は、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度が 2 倍以上の群で多い傾向があった。

新規遠隔転移は、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度が 2 倍以上の群 12 例のうち 4 例(33%)で認め、144 日[IQR、25-272]、2 倍未満の群 56 例のうち 20 例(36%)で認め、145 日[IQR、60-199] であった。

RFS は EUS-FNA 後 cfDNA 濃度が 2 倍以上の群(観察期間：286 日[IQR、243-358]； $n = 8$)と 2 倍未満の群(観察期間：外科的切除後 3 ヶ月以上追跡された 30 例で 302 日[IQR、227-336]； $n = 22$)で、有意差を認めなかった($P = 0.35$)。

血漿中の *KRAS* 遺伝子変異は、EUS-FNA 前後で 8 例(12%)(65.8 ± 11.0 歳；女性 4 例[50.0%])で検出された。全例、遠隔転移があり、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度に有意に増加していた($P = 0.015$)。 *KRAS* 遺伝子変異のコピー数は、5 例で減少し、2 例で増加し、EUS-FNA 後に 1 例の新規検出を認めた。EUS-FNA 前後で *KRAS* 遺伝子変異のコピー数($P = 0.59$)と MAF($P = 0.56$)に有意差はなかった。EUS-FNA 後 cfDNA 濃度は、*KRAS* 遺伝子変異のコピー数が減少した 5 例で平均 2.36 倍上昇した。*KRAS* 遺伝子変異のコピー数が増加した 3 例で、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度が 1.41 倍上昇した。

CTC 解析をした 8 例(74.5 ± 7.15 歳；女性 4 例[50%])のうち、6 例で検出を認め、stage II 4 例、stage IV 4 例であった。EUS-FNA 後 cfDNA 濃度は、5 例で上昇し、3 例で低下した。血漿中の *KRAS* 遺伝子変異は検出されず、CTC は増加 3 例、減少 3 例、検出なし 2 例であった。

考察

本研究では、膵癌患者の EUS-FNA 後 cfDNA 濃度の有意な上昇を認めた。ただし、*KRAS* 遺伝子変異を伴う新規の cfDNA は 1 例(1.5%)のみで、*KRAS* 遺伝子変異のコピー数は EUS-FNA 後有意に増加せず、関連は見られなかった。CTC のわずかな増加は、EUS-FNA 後 8 例のうち 3 例で認めた。よって、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度の上昇は、血中に放出された腫瘍細胞の成分によって引き起こされたのではないことを示唆している。

近年、針生検後の腫瘍細胞の血中への放出とその予後不良との関係が報告されており、Simon らは、生検に関連した CTC の増加が、前立腺癌の予後不良に関連していることを示し、膵癌では、Levy らが、cfDNA 濃度が 2 倍以上、上昇し、*KRAS* 遺伝子変異の新規検出が、EUS-FNA 後、それぞれ 20.6%(7/35)と 8.8%(3/35)で発生し、新規遠隔転移を発症する可能性が高いと報告した。

本研究では、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度が 2 倍以上の症例の割合は、既報と同様だったが、*KRAS* 遺伝子変異の新規検出は、既報よりも低かった。膵癌症例の *KRAS* 遺伝子変異の検出率は、切除可能例(10.3%~40%)、切除不能例(33.3%~77.0%)と報告されてお

り、本研究では全 stage で 10.3%(stageIVで 27.6%)の検出率であり、既報と比べてわずかに低かった。*KRAS* 遺伝子変異の検出率は低かったが、EUS-FNA 前後の *KRAS* 遺伝子変異と MAF のコピー数の有意差は認めなかった。さらに、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度は、*KRAS* 遺伝子変異のコピー数が減少した 5 例で平均 2.36 倍上昇し、*KRAS* 遺伝子変異のコピー数が増加した 3 例で 1.41 倍上昇していた。従って、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度の上昇は、主に非腫瘍細胞の破壊によるものが示唆された。

さらに、破壊された腫瘍細胞に由来する ctDNA だけでなく、腫瘍細胞が CTC として EUS-FNA 後に血流にあるかを見た所、既報では、膵癌症例の 76%で検出され、CTC 数の中央値は 3.20 だったが、本研究ではわずかに少なかったが、EUS-FNA 後 CTC のわずかな増加が 8 例中 3 例で観察された。これらの結果は、EUS-FNA 後に腫瘍細胞が循環系にあまり放出されないことを示唆している。

本研究では、cfDNA 濃度は、白血球数とのみ関連していたが、胆管炎などの明らかな感染症患者に、EUS-FNA は施行されておらず、膵癌によって誘発されるサイトカインによる炎症が原因であると考えられ、cfDNA 濃度と白血球数の両方が膵癌の予後不良に関連していると報告されており、この結果は妥当と言える。

EUS-FNA 後 cfDNA 濃度の 2 倍以上の上昇に関連する臨床的および技術的要因を考えると、cfDNA 濃度の上昇が血中に放出された腫瘍細胞によるものである場合、2 倍以上の上昇に関連する技術的要因には、太い針または多数の穿刺を考えるが、細い針による穿刺と十二指腸からの穿刺部位が cfDNA 濃度の 2 倍以上の上昇に関連する傾向があり、そちらは関連がないと考えられ、原因は不明だが、壊れた非腫瘍細胞に由来する cfDNA が増加する可能性が考えられた。

EUS-FNA の予後への影響を確認するために、RFS を、術後 3 か月以上の膵癌症例の EUS-FNA 後 cfDNA 濃度が 2 倍以上の症例と 2 倍未満の症例で比較した所、EUS-FNA 後 2 倍以上の上昇は手術後の早期再発に影響を与えなかった。新規遠隔転移を起こす可能性があるとして以前に報告されていたが、本研究で有意差は認めなかった。従って、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度の上昇は、手術後の RFS および我々の研究における新規遠隔転移の発生に影響を与えなかったと考える。

本研究の限界は、第一に、単施設研究であり、患者数が少ない。第二に、*KRAS* 遺伝子変異の検出率が比較的 low だった。この要因としては、1 mL の血漿から抽出した cfDNA を *KRAS* 遺伝子変異の ddPCR に使用された cfDNA 量が既報よりも少なかったが挙げられる。第三に、組織検体を調べておらず、血漿で検出された *KRAS* 遺伝子変異が腫瘍由来かを確認することができなかった。

結論として、EUS-FNA 後 cfDNA 濃度の上昇は、血中に放出された腫瘍細胞の成分によって引き起こされたのではなく、その上昇は、手術後の新規遠隔転移および RFS の発生に影響を与えていなかった。EUS-FNA 後の血流を介した播種リスクは少ないことが示唆された。