

早期がん診断技術の現状～膵がんを中心に～



医療と技術

江口 英利*

Current technologies for the detection of early stage cancers
including pancreatic cancer

Key Words : pancreatic cancer, circulating tumor cells, cell-free DNA,
microRNA, exosome

【はじめに】

がんが我が国の死亡原因の第一位となって久しい。今や日本人の2人に1人はがんに罹患し、3人に1人はがんが原因で死亡する時代である。現在、がんと診断された人をすべて合わせて集計すれば、その5年生存率は62.1%であり¹⁾、もはや不治の病ではなくなったものの、がんの部位による生存率の差は大きい。またいずれの部位であっても進行がんの生存率はいまだに不良である。本邦におけるがんの死亡数を部位別にみると、肺がん、大腸がん、胃がん、膵がん、肝がんの順であるが、中でも膵がんは極めて生存率が低く難治がんの代表とされている。膵がんは進行した状態で発見されることが多く、手術が不可能であることが少なくない。また、たとえ手術可能なステージで発見されて手術を受けたとしても、再発をきたすことがしばしばあり、さらに早期の段階での膵がん発見は喫緊の課題である。そのような実情をふまえ、膵がんを早期に発見するための方法が世界中で精力的に研究されている。本稿では膵がんを中心として、がんの早期診断をめざした新規技術の現状について述べることにする。

【膵がんの画像診断方法】

膵がんは腹痛や体重減少などの臨床症状を契機に発見されることが多いが、臨床症状を認める場合は

すでに進行がんとなっている場合が多い。また胃がんや大腸がんがファイバースコープで直接観察可能であるのとは異なり、膵がんは直接見ることができない部位に発生するため、画像検査で膵がんを検出するといっても、その陰影、すなわち「影」を見るにすぎない。膵がんの「影」を見る方法として、現在、超音波検査、CT (コンピュータ断層撮影装置)、MRI (磁気共鳴画像診断装置) などが用いられている。超音波検査は比較的手軽で、検診として用いられることも多いが、残念ながら膵がんの診断能は病変のサイズや部位、被験者の体格 (皮下脂肪厚) などにも左右され、早期の膵がんを満足のいく感度で検出できるとは言いがたい。一方CTは、膵がんを疑う患者さんにおける診断法として中心的な役割を果たしているが、膵がんの診断には造影剤を静脈内投与して撮影することが望ましく、またそもそも放射線被曝が少なからずあり、侵襲 (体に対する負担) が少なくない (図1A、1B)。また、造影剤を用いたCTの場合でも膵がんの病変検出能は79%と報告されており²⁾、決して完全な検査とは言えない。MRIも重要な検査方法ではあるが、造影CTを凌駕するような優れた検出力とは言いがたいのが事実である。

近年、PET (Positron Emission Tomography) 検査という方法が頻用されるようになってきている (図1C、1D)。PET検査は、がん細胞が正常細胞よりも多くのブドウ糖を取り込むという性質に基づいた検査法であり、ブドウ糖に類似した物質に放射線同位元素を付けた薬剤を静脈内に投与し、それが取り込まれた部位を描出する方法である。PET検査はどんながんでも検出できるかのような誤解をされることがあるが、実際には膵がんの診断においてPET検査とCT検査を比較した場合、同等程度の診断能を有しているものの、放射線被曝が無視でき



* Hidetoshi EGUCHI

1966年12月生まれ
大阪大学医学部 (1992年)
大阪大学大学院医学系研究科修了
(2000年)
現在、大阪大学大学院医学系研究科
外科学講座・消化器外科学 教授
博士 (医学) 専門 / 消化器外科学
TEL : 06-6879-3251
FAX : 06-6879-3259
E-mail : heguchi@gesurg.med.osaka-u.ac.jp

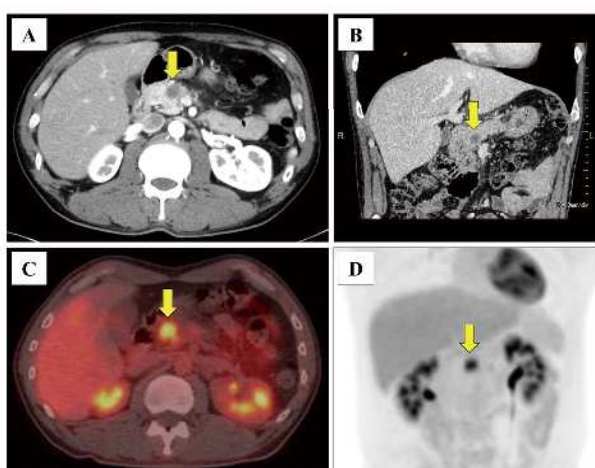


図 1: 造影 CT および PET-CT による膵がんの描出
 (A) 造影 CT にて膵内に直径 1.7cm の比較的小さな膵がんを認める。(B) 造影 CT の前額断画像による膵がんの描出。(C) 上記 (A) の病変を PET-CT で撮影したもの。本症例のように PET-CT で明瞭に膵がんが描出できることもあるが、不明瞭な症例もある。(D) PET の前額断画像による膵がんの描出。

ない点、検査費用が高額である点にも留意すべきである。また PET 検査は自己免疫性膵炎などでも陽性になることが知られており、膵がんにおける特異度はそれほど高くはなく、過信は禁物である。

近年、超音波内視鏡 (endoscopic ultrasound:EUS) という機器がしばしば用いられるようになってきている。EUS は内視鏡の先端に超音波探触子が付いている装置で、膵臓に近接した部位に超音波探触子を誘導して観察できるため、高い空間分解能を有している。膵臓の画像診断において有用な検査で、熟練した施行医が行えば膵がんの存在診断能や質的診断能は CT よりも優れているとされている。しかし EUS は侵襲的検査であるため、検査を行うかどうかは慎重に判断する必要があり、また実施したとしても施行医の技術により診断能が左右される可能性があり、施行可能な施設も限られているのが実情である。

【膵がんの産物を末梢血で検出する試み】

膵がんに限らず、がんの検出のために腫瘍マーカーを測定することは、検診や実臨床で盛んに行われている。腫瘍マーカーとは、腫瘍から血液中やその他の体液中に出る蛋白質や酵素、ホルモンなどであり、実に様々な物質が実臨床で測定されている。しかし注意すべきことは、全てのがんで腫瘍マーカーが上昇するとは限らないこと、および腫瘍マーカー

が上昇していても腫瘍ではないこともありえることである。例えば膵がんの腫瘍マーカーとして CA19-9 がしばしば用いられるが、膵がんの検出感度は決して高くなく、とくにステージ IA 膵がんの場合は 5 割程度と報告されている³⁾。腫瘍マーカー以外に、血液やその他の体液中でがんを検出する方法として、(1) がん細胞そのものを検出する、(2) がん細胞から出る DNA を検出する、(3) がん細胞から出る RNA を検出する、などのアプローチも積極的に研究されている (図 2)。

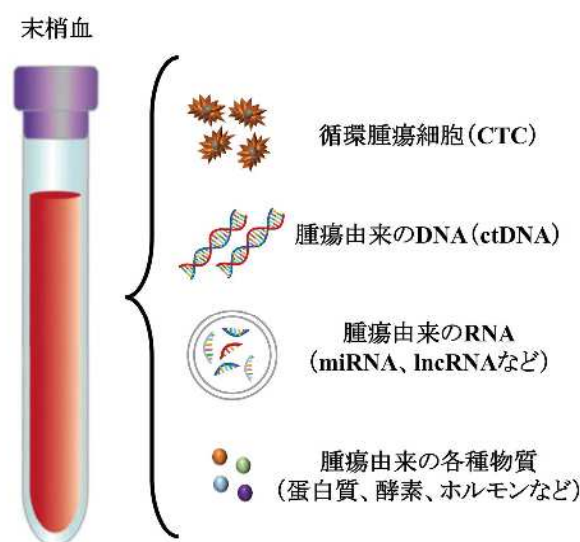


図 2: 末梢血でがん診断を行う試み

がん患者の末梢血中には、がん病巣または転移巣から血液中に流出しているがん細胞が微量に存在していることが報告されており、そのような細胞を血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells: CTC) と呼ぶ。また、がん細胞由来の DNA 断片も末梢血中に存在し、それを ctDNA (circulating tumor DNA) と呼ぶ。さらにはがん細胞由来の RNA も末梢血中に存在している。そのうちマイクロ RNA (miRNA) は腫瘍マーカーとして注目されており、miRNA の多くはエクソソームと呼ばれる細胞外小胞に包まれて血中に放出されると考えられている。一方、がん細胞由来の蛋白質や酵素などの各種物質は様々な測定系が開発されており、腫瘍マーカーとして実臨床で利用されている。

1. がん細胞そのものを末梢血で検出する

がん患者のがん病巣または転移巣から血液中に流出しているがん細胞を血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells: CTC) という。がん患者の血液中にそのような細胞が存在することは 1869 年に Thomas Ashworth によって報告され⁴⁾、その後、がんの転移に関わる重要な細胞であることが多数報

告されている。一方で、CTC は比較的早期がんの患者でも血液中に認められることが明らかになっており⁵⁾、末梢血を用いてそのような細胞を簡便に検出できれば、がんの診断に有用であることは容易に想像される。

一般的には CTC は極めて細胞数が少ないため、CTC を検出し詳しく調べるためには CTC の濃縮と分離の技術が必要となる。これまで血液 1ml あたり数個という CTC を検出しようとする様々な試みがなされてきた。代表的なものとしては、上皮性のがん細胞に発現している EpCAM をマーカーとして CTC を濃縮する方法が頻用されており、CellSearch システムは EpCAM をマーカーとして CTC を測定する装置として 2004 年に米国食品医薬局 (FDA) から承認を受けている。それ以外にも、がん細胞でテロメラーゼ活性が亢進していることに着目したテロメスキャンや、腫瘍細胞のサイズ、重さ、電荷の違いなどの物理特性の違いを利用した CTC 検出方法として、CTC-iChip システムや ClearCell システムなど、多数の CTC 検出・分離装置が開発されている。

2. がん細胞の DNA を末梢血で検出する

ヒトの体を構成する細胞、とりわけ血球系の細胞がアポトーシスなどの細胞死を迎える際に、遊離 DNA 断片を血液中に放出することがあり、そのような DNA 断片を cfDNA (cell-free DNA) と呼ぶ。cfDNA の半減期は 16.5~144 分と報告されており、量的にも微量ではあるが、血液の中で検出することが可能である^{6,7)}。一方がん患者では、がん細胞由来の DNA 断片も血液中に存在することがあり、それを ctDNA (circulating tumor DNA) と呼ぶ。膵がんの ctDNA を対象とした研究では、膵がんでの変異頻度が高い KRAS 遺伝子を対象としてその変異 DNA を検出する試みがなされてきた。この方法では、ステージ II までの膵がん症例あるいは切除可能膵がんといった比較的早期に近い膵がん症例でも検出可能であることが報告されている^{8,9)}。

3. がん細胞の RNA (miRNA) を末梢血で検出する

悪性黒色腫患者の血液中に、血中を循環する RNA が存在することが 1996 年に初めて報告された¹⁰⁾。血中の RNA の多くはマイクロ RNA (miRNA)

および long non-coding RNA (lncRNA) であるが、なかでも miRNA は各種がんの早期診断に有用との報告が相次いでいる。我々は miRNA-21 が腫瘍マーカーとして使用可能かどうかを肝細胞がん患者の末梢血を用いて検討した (図 3)。肝細胞がん患者

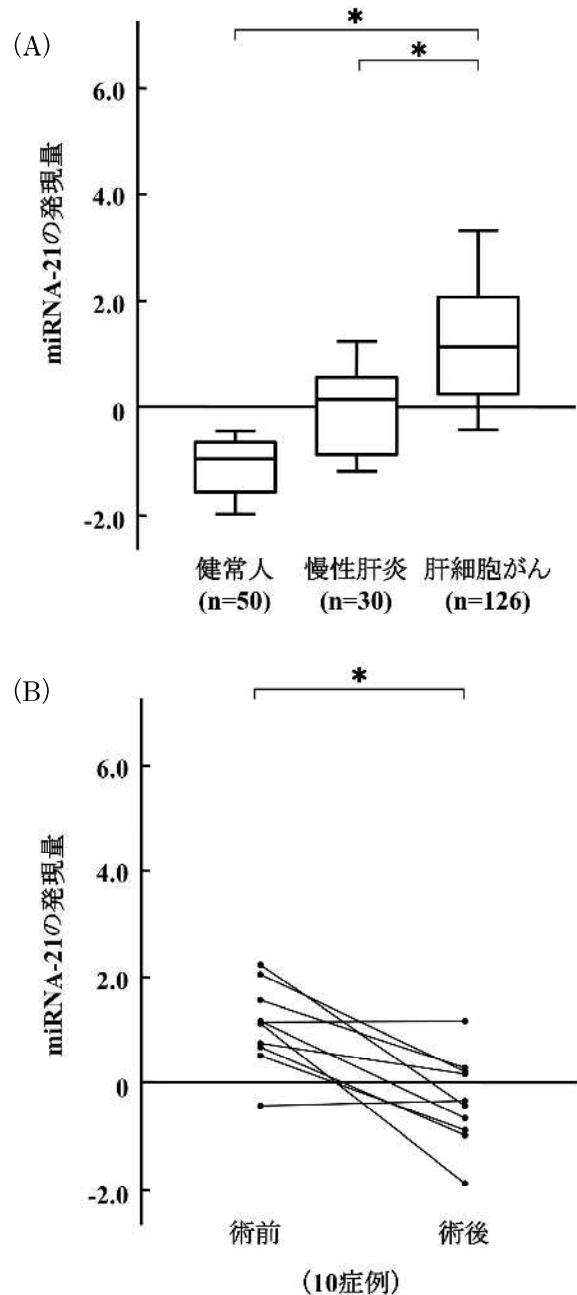


図 3: 肝細胞がん患者の末梢血中における miRNA-21 の発現量 (文献 11 より引用)
 (A) 肝細胞がん患者 (126 名)、慢性肝炎患者 (30 例)、健常人 (50 例) の末梢血中の miRNA-21 を qRT-PCR 法にて測定した。肝細胞がん患者では有意に発現量が上昇している。(B) 根治切除術を施行した肝細胞がん症例 (10 例) の術前末梢血と術後末梢血を用いて miRNA-21 を qRT-PCR 法にて測定したところ、術後には有意に低下していた。* $p < 0.05$

126名、慢性肝炎患者30名、健常人50名の血液を用いて qRT-PCR 法で測定したところ、健常人と肝細胞がん患者では感度 87.3%、特異度 92.0% で鑑別可能であり、肝細胞がん患者と慢性肝炎患者でもそれぞれ 61.1%、83.3% で鑑別可能であった¹¹⁾。さらに肝細胞がんの切除術前と術後の末梢血を用いて比較すると、切除術後には有意に miRNA-21 レベルが低下していた。同様の検討を胆管がんでも行い、既存の腫瘍マーカーと併用することにより、胆管がん患者をより高感度に識別できることを示した (図 4)¹²⁾。

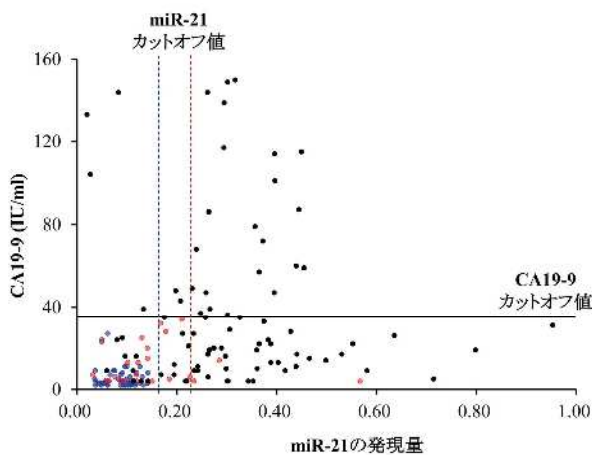


図 4: 胆道がん患者の末梢血における miRNA-21 の発現量と CA19-9 値の相関 (文献 12 より引用)

胆道がん患者 (黒印)、良性胆道疾患患者 (赤印)、健常人 (青印) の末梢血を用いて、miRNA-21 の発現量と CA19-9 値の相関をプロットした。miRNA-21 発現量と CA19-9 値を組み合わせて判定することにより、健常人と胆道がん患者の識別、および良性胆道疾患患者と胆道がん患者の識別が可能であった。なお miRNA-21 のカットオフ値として、健常人と胆道がん患者の識別には 0.17 を (青色破線)、良性胆道疾患患者と胆道がん患者の識別には 0.23 (赤色破線) を用いた。

miRNA はエクソソーム、アポトーシス小体、血小板で運搬されていると考えられており、中でもエクソソームという分泌小胞に内包された miRNA は、各種のがんで早期がん診断マーカーとしての価値が注目されている。ただしエクソソームは健常な細胞からも分泌されており、特に腫瘍の体積が小さい早期の膵がんを対象とした場合には、がん組織からのエクソソームの分泌量が極めて少ないため検出が困難であった。そこで我々は、質量分析器 (MALDI-TOF-MS) を用いて、がん病巣において化学修飾を受けた miRNA を簡便に検出する方法を

開発した¹³⁾。この方法を用いてがん患者および健常人の血液中の miRNA のアデニンのメチル化を測定したところ、がん患者の血液に含まれる miRNA はアデニンのメチル化率が上昇していることが明らかとなった。この方法を用いてステージ I、II の膵がん患者の miRNA のアデニンのメチル化率を測定したところ、健常人に比べて有意にメチル化率が上昇していることが示された。この方法を用いれば、現在臨床で使用されている腫瘍マーカーである CA19-9 や CEA に比べて、より効率的にがんを検出することができる可能性が示唆された (図 5)。

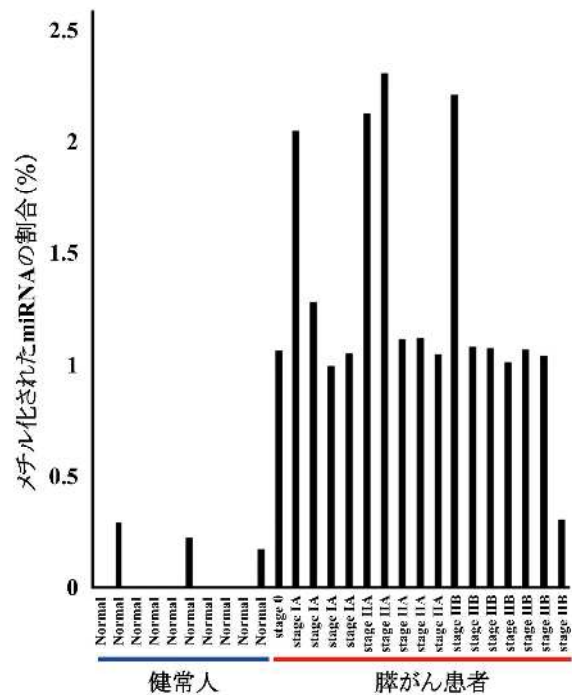


図 5: miRNA のメチル化率の測定による膵がんの早期発見法 (文献 13 より引用)

比較的早期の膵がん患者 (ステージ IIB 以下、17 名) と健常人 (10 名) の末梢血を用いて、miRNA-17-5p のメチル化率を測定したところ、極めて効率よく膵がん患者を同定することができた。

【まとめ】

がんの早期発見は依然として重要なテーマであり、とりわけ膵がんの早期発見は臨床的に喫緊の課題である。より正確に、そして低侵襲に膵がんを発見できる方法の開発に我々もさらに邁進する所存である。

参考文献

1. 国立がん研究センターがん対策情報センターがん情報サービス
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
2. Sofuni A, *et al.*, Differential diagnosis of pancreatic tumors using ultrasound contrast imaging. *J Gastroenterol.* 2005; 40: 518-25.
3. Liu J, *et al.*, Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2012; 131: 683-91.
4. Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aus Med J* 1869; 14: 146-9.
5. Mimori K, *et al.*, Hematogenous metastasis in gastric cancer requires isolated tumor cells and expression of vascular endothelial growth factor receptor-1. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 2609-16.
6. Lo YM, *et al.*, Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999; 64: 218-24.
7. Diehl F, *et al.*, Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008; 14: 985-90.
8. Brychta N, *et al.*, Detection of KRAS mutations in circulating tumor DNA by digital PCR in early stages of pancreatic cancer. *Clin Chem.* 2016; 62: 1482-91.
9. Hadano N, *et al.*, Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2016; 115: 59-65.
10. Stevens GL, *et al.*, Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; 5: 293-6.
11. Tomimaru Y, *et al.*, Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012; 56: 167-75.
12. Kishimoto T, *et al.*, Plasma miR-21 is a novel diagnostic biomarker for biliary tract cancer. *Cancer Sci.* 2013; 104: 1626-31.
13. Konno M, *et al.*, Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers. *Nat Commun.* 2019; 10: 3888.

