

Title	遺伝子発現プロファイルに基づく膵癌の免疫組織化学的サブタイピング法の確立
Author(s)	丸川, 活司
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13257号
Issue Date	2018-06-29
DOI	10.14943/doctoral.k13257
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90391
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:2422
File Information	Katsuji_Marukawa.pdf



学位論文

遺伝子発現プロファイルに基づく膵癌の 免疫組織化学的サブタイピング法の確立 (Establishment of immunohistochemical subtyping of pancreatic cancer based on gene expression profile)

2018年6月

北海道大学

丸川 活司

学位論文

遺伝子発現プロファイルに基づく膵癌の 免疫組織化学的サブタイピング法の確立 (Establishment of immunohistochemical subtyping of pancreatic cancer based on gene expression profile)

2018年6月

北海道大学

丸川 活司

目	次	

発表論文	目	録	お	よ	び	学	슻	発	表	目	録		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1頁
緒言·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	2頁
略語表	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4頁
実験方法		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	6頁
実験結果	:	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	9頁
考察·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	24 頁
総括およ	Ũ	結	論		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	27 頁
謝辞 •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	28 頁
引用文献		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	29 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である.

 Katsuji Marukawa, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka, Asami Morooka, Daisuke Sato, Takeo Nitta, Toru Nakamura, Satoshi Hirano, Yoshihiro Matsuno. Clinicopathological Significance of MUC13 Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC)

Hum Pathol, in submission.

 Katsuji Marukawa, Tomoko Mitsuhashi, Yutaka Hatanaka, Asami Morooka, Daisuke Sato, Takeo Nitta, Yoichi M. Ito, Satoshi Hirano, Yoshihiro Matsuno. Establishment of immunohistochemical subtyping of pancreatic cancer based on gene expression profile.

Oncotarget, in submission.

本研究の一部は以下の学会で発表した.

- 丸川 活司,畑中 豊,諸岡 亜早美,佐藤 大介,清水 知浩,畑中 佳奈子, 中村 透,三橋 智子,平野 聡,松野 吉宏 第104回日本病理学会総会 2015 年 5 月 1 日 名古屋国際会議場 「膵管癌における MUC13 発現の臨床病理学的検討」
- Marukawa K, Mitsuhashi T, Hatanaka Y, Morooka A, Sato D, Nitta T, Nakamura T, Hirano S, Matsuno Y. Clinicopathological significance of MUC13 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC); the positive prognostic marker and possible candidate for molecular targeted therapy.
 2016 Annual Meeting, United States and Canadian Academy of Pathology, March

12-18, 2016, Washington State Convention Center, Seattle, WA, USA (poster)

緒言

浸潤性膵管癌(膵癌)は罹患者数と死亡者数がほぼ同数で,5年生存率がわずか約 7%程度の極めて予後不良の難治性消化器癌の代表である.PETやMDCT,MRP,EUS,ERP などの画像診断技術の向上やEUS-FNA検査技術の開発により,膵腫瘍の発見,質的診 断は飛躍的に向上している.しかしながら,長期生存が期待できず,その背景として, 早期で発見される完全切除可能な膵癌は非常に少なく,切除可能な症例は約20%程度 に留まり(Matsuno et al., 2004),多くの患者は初回診断時に手術切除不能な状態と なっていることが挙げられる.また,たとえ切除されても再発率は70~90%と高く, 術後早期に再発をきたす患者が多い(Ryan et al., 2014).一般的に膵癌は先進国の男 性に罹患数が多く,2015年のアメリカ合衆国における癌の死亡数では男女ともに第4 位となっている(Siegel et al., 2015).本邦での膵癌患者の死亡率は男女ともに,1997 年以降増加傾向を示し,2014年の人口動態統計においても膵癌は4位となっている (Katanoda et al., 2015).

膵切除可能な膵癌に対し、術前治療を組み合わせることにより生存期間が延長する ことが報告されている(Brown et al., 2008).近年では術前MDCT 画像所見に基づいて、 術前治療の対象となる膵癌を切除可能膵癌と切除可能境界膵癌を門脈因子、動脈因子 に起因するものに分類し、術前補助療法や術後補助療法を組み合わせることにより、 予後の改善が得られてきている(Shimada et al., 2006)(Ito et al., 2014)(Kato et al., 2013).また、切除不能膵癌に対しても、EUS-FNA で採取された生検検体から病 理組織学的エビデンスが得られれば、積極的な化学療法や放射線療法がおこなわれて いる.さらに膵癌治療法においては、S1、nabPTX(ナブパクリタキセル)、ゲムシタビ ン、FOLFIRINOX などの抗癌剤治療の選択肢が増え、加えて新規抗癌剤も開発され用い られるようになり、徐々に治療成績が向上している(Girard et al., 2010)(Shibuya et al., 2011).

膵癌患者のさらなる予後改善のためには、薬物療法を中心とする非切除治療の治療 成績の向上が不可欠となっており、新規の分子標的治療の導入に期待が高まっている. 一方で病理診断分野ではこれに対応しうる臨床的有用性の高い、新たな診断体系の確 立が求められ、膵癌の分子生物学的な病態把握とこれまでに蓄積された情報の整理・ 統合が不可欠となっている.既に乳癌では遺伝子発現プロファイリングに基づく、免 疫組織化学的手法 immunohistochemistry (IHC)を用いたサブタイピング法が病理診 断で日常的に用いられており、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PgR)、 HER2 の IHC を用いてその発現態度によって luminal タイプ、HER2 タイプ、トリプルネ ガティブタイプに分類することにより、薬物療法の治療選択において大きな成果を上 げている(Cheang et al., 2009). 膵癌においても,近年,網羅的遺伝子発現解析から 数種の遺伝子発現シグニチャー分子群により, classical (CL) タイプ, quasimesenchymal (QM) タイプ, exocrine-like (EL) タイプの3群に分子サブタイピ ングする試みが報告され,頻度が高く主要な2サブタイプであるCL タイプとQM タイ プ間では,QM タイプがCL タイプに比べて予後不良であること,さらには抗癌剤や分 子標的治療薬への治療感受性が異なることが示された(Collisson et al., 2011).

そこで本研究では、分子サブタイピングに資する分子として、網羅的遺伝子発現解 析より選択されたシグニチャー構成分子の中でも、予後に有意差のみられる CL タイプ と QM タイプの複数の分子に着目し、これら遺伝子発現を代替(サロゲート)する IHC サブタイピング法の確立に関する検討を行った.

略語表

本文中お。	よび図中で使用した略語は以下のとおりである.
ALK	anaplastic lymphoma kinase
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRCA1	breast cancer susceptibility gene I
BRCA2	breast cancer susceptibility gene II
CAV1	caveolin 1
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CL	classical (subtype)
DFS	disease-free survival
DNA	deoxyribonucleic acid
DPC4	deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
EGFR	epidermal growth factor receptor
EL	exocrine-like (subtype)
ER	estrogen receptor
ERP	endoscopic retrograde pancreatography
EUS	endoscopic ultrasound
EUS-FNA	$endoscopic \ ultrasound-guided \ fine \ needle \ aspiration$
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
HE	hematoxylin and eosin
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2
HIF	hypoxia inducible factor
HK2	hexokinase 2
ICGC	international cancer genome consortium
IHC	immunohistochemistry
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRT14	keratin 14
LGALS4	galectin 4
LMD	laser microdissection

MDCT	multiple detector computed tomography
MRP	magnetic resonance perfusion
MUC	mucin
NT5E	ecto-5'-nucleotidase
OS	overall survival
PALB2	partner and localizer of BRCA2
PET	positron emission tomography
PgR	progesterone receptor
PHLDA1	pleckstrin homology-like domain family A member 1
QM	quasimesenchymal (subtype)
RNA	ribonucleic acid
ROS1	c-ros oncogene 1
S100A2	S100 calcium-binding protein A2
S100P	S100 calcium-binding protein P
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4
TAC	transcriptome analysis console
TFF	trefoil factor
TMA	tissue microarray
TSPAN8	tetraspanin-8
UICC	union for international cancer control

実験方法

1) 対象症例

2000 年から 2011 年に北海道大学病院・消化器外科 II にて外科的切除され,浸潤性 膵管癌と病理診断された 195 症例のうち,術前治療未施行であった 155 症例を対象と し,後ろ向きコホート研究を行なった.外科切除標本のホルマリン固定パラフィン包 埋(formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) ブロックを用い,組織マイクロアレ イ(tissue microarray; TMA)を作製した.研究対象患者については,手術施行時の 年齢,性別,発生部位,局所癌遺残の有無,腫瘍サイズ,腫瘍グレード,リンパ管侵 襲,静脈侵襲,神経浸潤の有無,pT 因子,pN 因子,pStage,術後生存期間の各項目に 関して,診療記録に基づき調査を行なった.また,病理診断,病理病期分類はWHO 分 類およびUnion for International Cancer Control: UICC (7th edition) に基づい て行った.

また 2011 年から 2015 年に北海道大学病院・消化器内科にて, EUS-FNA 施行により 膵臓から生検採取され, 膵癌と病理診断された 213 症例を対象とし, 後ろ向きコホー ト研究を行なった.研究対象患者については, 生検施行時の年齢, 性別, 腫瘍部位, 腫瘍サイズ, 生検後の生存期間の各項目に関して,診療記録に基づき調査を行なった.

本研究は北海道大学病院倫理委員会に承認を得たプロトコールに基づき,過去の手 術検体,生検検体を用いることから,研究利用に対し包括同意を得た患者を対象とし た.また,研究の遂行に当たり,患者情報はすべて連結可能なかたちで匿名化し,本 研究の実施にあたっては北海道大学病院の自主臨床研究倫理審査委員会の承諾を得た.

2) 浸潤性膵管癌組織マイクロアレイ (TMA) 作製

各症例の選択部位は、Hematoxylin and Eosin(HE)染色標本において、各症例の 代表的な組織細胞形態を呈する、分枝膵管を含む正常組織2か所、腫瘍領域から2~4 か所ずつ選択し印をつけ、同部に相当するパラフィンブロックの部位を、径2.0mmの 中空針をセットした組織マイクロアレイヤー JF-4 (Sakura Finetek Japan)で円柱状 にくり抜き(コア)、予め円柱状に穴を空けたレシピエントパラフィンブロックにこ のコアを埋め組むことにより、TMA ブロックを作製した.また、TMA ブロックは薄切後 にHE 染色を行ない腫瘍細胞の有無を確認した.

 $\mathbf{6}$

3) 免疫組織化学(IHC) 染色法

TMA ブロックおよび EUS-FNA で採取された生検検体のホルマリン固定・パラフィン 包埋 (FFPE) ブロックはいずれも厚さ 5µm に薄切した.薄切切片を脱パラフィンし, 水洗後,抗原賦活化処理装置 (PTLink Dako) により EnVisionTM FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (Dako, pH9.0) もしくは LOW pH (Dako, pH6.1) 中で 95°Cにて 20 分 間加熱し,抗原を賦活化した.また,S100P の抗原賦活化は Proteinase K を用いた. 賦活化操作後,下記の抗体 (表 1) と 30 分間反応させ,Envision Flex System (Dako) を用いたポリマー法にて抗原を検出した.IHC 染色には自動免疫染色装置

(Autostainer Link, Dako) を使用した.

Protein	Gene	Source	Clone	Dilution	Antigen retrieval
Tetraspanin-8	TSPAN8	Abcam	PAb	1:400	High pH
S100P	S100P	BD	16/S100P	1:400	Proteinase K
MUC13	MUC13	Millipore	2E11.1	1:2000	High pH
Trefoil factor 1	TFF1	Abcam	EPR3972	1:500	Low pH
Trefoil factor 3	TFF3	Abcam	EPR3974	1:1000	Low pH
Galectin-4	LGALS4	SIGMA	1E8	1:1000	High pH
5'-nucleotidase	NT5E	CST	D7F9A	1:1000	High pH
Caveolin-1	CAV1	Abcam	E249	1:200	High pH
Keratin 14	KRT14	Novocastra	LL002	1:100	High pH
S100A2	S100A2	Abcam	EPR5392	1:1000	High pH
Pleckstrin homology-like domain family A member 1	PHLDA1	Abcam	EPR6674	1:600	High pH
Hexokinase-2	HK2	CST	C65G5	1:200	High pH

表1 使用した特異抗体

4) IHC 染色の評価法

IHC 染色標本は 2 名の病理医によって判定し, TMA 検体および EUS-FNA 検体を用いた IHC の結果は, 次のように評価した:各因子の染色強度を光学顕微鏡下にてスコア 0 点(陰性),スコア 1 点(弱),スコア 2 点(中),スコア 3 点(強)の4 段階にスコア化し,各強度の腫瘍細胞全体に占める占有率(%)を乗算した和(スコア 0 × a % スコア 1 × b %+スコア 2 × c %+スコア 3 × d %)を総スコア (H score)として判定し(Behrens et al., 2008),各リガンドの総スコアの中央値ならびに 30 をカットオフ値として,低発現および高発現の 2 群に分類した.

5) 統計学的解析

各因子の発現と各臨床病理学的因子との関係について、Pearson's χ^2 testを用い て検証した.また各因子の発現と生存期間の解析は、全生存期間(OS)と無再発生存 期間(DFS)を Kaplan-Meier 法で算出し、log-rank 検定を用いて生存曲線の比較を 行った.さらに生存期間に関与する複数因子の影響を単変量解析および多変量解析

(Coxの比例ハザードモデル)を用いて解析した.またいずれの解析も P<0.05 で有意 差ありと判定した.統計学的検討は全て,統計ソフトIBM SPSS Statistics V22.0を用 いて行った.

6) DNA マイクロアレイ解析

膵癌は豊富な細胞外基質を伴う線維性間質反応(desmoplasia)を病理組織学的特徴とし、腫瘍細胞以外の細胞が豊富に介在するため(Bachen et al., 2005)、レーザー・マイクロダイセクション(LMD、LMD6500; Leica 社)を使用し、腫瘍細胞部分のエンリッチメントを行った. LMDを行うFFPE 組織標本をメンブレンスライド(PEN-Membrane 2.0 μ m)に厚さ 10 μ m の薄切切片を載せ、伸展、乾燥後、脱パラフィン、脱水後にクレシルバイオレット染色を行ない十分乾燥させた。最終的に切片から RNA を採取することを目的とするため、細心の注意を払い、顕微鏡下で 4000 個以上の腫瘍細胞を採取し、総 RNA 量が 500ng となるように RNA を採取した.

LMD で採取した細胞より ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) にて total RNA を抽出し, GeneChip WT Pico Reagent Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA) を用いてビオチンラベル化・断片化された ss-cDNA を合成し た. ss-cDNA は Affymetrix 社の GeneChip[™] Human Transcriptome Array 2.0 (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA) に供した. 得られたデータは同 Affymetrix 社より提供されて いる EC (Expression Console) および TAC (Transcriptome Analysis Console) を使 用し解析した(Shi et al., 2006) (Sato et al., 2009) (Akiyama et al., 2015).

実験結果

1. 外科的切除膵癌の患者背景

外科的切除された膵癌組織から TMA 作製に用いた 155 症例の臨床病理学的背景を表 2 に示す.症例の年齢は平均 65.2 歳 (43~89 歳) で,性別は男性 91 例,女性 64 例 (男 女比 1.4:1) であった. 膵癌の発生部位は頭部が 94 例,体尾部が 61 例,腫瘍サイズ は 2 cm以下が 27 例, 2 cmを越えるものが 128 例,腫瘍グレードは G1 が 22 例, G2 が 111 例,G3 が 22 例,pStage (UICC)別には Stage Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ,Ⅳがそれぞれ 3 例, 136 例,4 例,12 例で,全症例の生存期間中央値は 17 か月であった.

臨床病理学的因子	Ν
年齢	
≤60 歳 / >60 歳	52 / 103
性別	
男性 / 女性	91 / 64
腫瘍部位	
頭部 / 体尾部	94 / 61
局所癌遺残	
なし / あり	127 / 22
腫瘍サイズ	
$\leq 2 \mathrm{cm}$ / $> 2 \mathrm{cm}$	27 /128
腫瘍グレード	
G1 / G2 / G3	22 / 111 / 22
リンパ管侵襲	
なし / あり	54 /101
静脈侵襲	
なし / あり	26 / 129
神経周囲侵襲	
なし / あり	16 / 139
pT 因子	
T1 / T2 / T3 / T4	$3 \ / \ 3 \ / \ 145 \ / \ 4$
pN 因子	
NO / N1	34 / 121
pStage (UICC)	
I / II / III / IV	3 / 136 / 4 / 12

表2 TMA に用いた浸潤性膵管癌外科的切除症例の臨床病理学的背景

2. 膵癌における CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現

TMA を用いた IHC における CL/QM タイプのシグニチャー分子の特徴的な染色パター ンを図1に示す.CL タイプの S100P, LGALS4 は腫瘍細胞の核と細胞質に陽性像を示し, MUC13 は腫瘍細胞の管腔表面(細胞膜)および細胞質, TFF1, TFF3, TSPAN8 は細胞膜, 細胞質に陽性像を示した.また,QM タイプの分子である NT5E は CL タイプの MUC13 と 同様に腫瘍細胞の管腔表面(細胞膜) や細胞質に陽性像を示し,その他の QM タイプで ある CAV1, KRT14, PHLDA1, HK2 は腫瘍細胞の細胞膜および細胞質, S100A2 は腫瘍細 胞の核と細胞質に,それぞれ陽性像を示した.



図1 膵癌における CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現パターン CL タイプ (TSPAN8, S100P, MUC13, TFF1, TFF3, LGALS4)の陽性像 QM タイプ (CAV1, KRT14, S100A2, NT5E, PHLDA1, HK2)の陽性像

3. CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現と臨床病理学的特徴

CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現と臨床病理学的因子との関連について検討 した(表3,4に示す). CAV1(p=0.017), S100A2(p=0.034)の発現と年齢との間に有意 な関連性がみられ、60歳以下で陽性率が高かった. また TFF1 (p=0.031), LGALS4 (p=0.049), NT5E(p=0.016)の発現と性別の間にも有意な関連性がみられ、CLタイプ のシグニチャー分子である TFF1, LGALS4 は女性で各々の陽性率が高く, QM タイプの シグニチャー分子 NT5E は男性で陽性率が高かった. CL タイプのシグニチャー分子 MUC13 (p=0.033), TFF1 (p=0.011)の発現と腫瘍グレードとの間にも有意な関連性が 認められ, 腫瘍グレードが低グレード群で陽性率が高かった. 一方, QM タイプのシグ ニチャー分子では、CAV1 (p=0.001)、NT5E (p=0.011)、S100A2 (p=0.001)の発現と 腫瘍グレードとの間に有意な関連性が認められ、高グレード群でそれぞれの分子の陽 性率が高かった.また CAV1 の発現は腫瘍サイズ (p=0.019),静脈侵襲 (p=0.005), リンパ管侵襲(p=0.004)との間に有意な相関が認められ,腫瘍サイズが2cm以上,静脈 侵襲、リンパ管侵襲がある症例で陽性率が高かった. さらに、HK2の発現と静脈侵襲 との間にも相関が認められ、静脈侵襲がある場合に陽性率が低下した(p=0.002).さ らに、PHLDA1の発現とpN因子との間にも有意な相関が認められ、リンパ節転移があ ると陽性率が低かった(p=0.047).その他の検討した臨床病理学的因子には関連性は認 められなかった(表3,4).

亦具	. 11 قب جديد	総	TSPAN	8		S100P	1		MUC13			TFF1			TFF3			LGALS	4	
<u> </u>	<i>x</i> 72y-	N	陽性	(%)	p值	陽性	(%)	p值	陽性	(%)	p值	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p值	陽性	(%)	p値
年齢	≤60	52	12	(23)	0.424	26	(50)	0.954	26	(50)	0.775	30	(58)	0.125	27	(52)	0.392	27	(52)	0.531
	>60	103	30	(29)		51	(50)		49	(48)		46	(45)		46	(46)		48	(47)	
性別	男	91	25	(27)	0.900	44	(48)	0.693	42	(46)	0.507	38	(42)	<u>0. 031*</u>	47	(52)	0.176	38	(42)	<u>0. 049*</u>
	女	64	17	(27)		33	(52)		33	(52)		38	(59)		26	(41)		37	(58)	
腫瘍部位	頭 部	94	26	(28)	0.845	43	(46)	0.224	49	(52)	0.247	48	(51)	0.530	43	(46)	0.676	43	(46)	0.414
	体 尾 部	61	16	(26)		34	(56)		26	(43)		28	(46)		30	(49)		32	(52)	
局所癌遺残	RO	127	33	(26)	0.433	62	(49)	0.482	62	(49)	0.521	62	(49)	0.650	62	(49)	0.623	63	(50)	0.284
	R1	22	6	(27)		13	(59)		9	(41)		10	(45)		9	(41)		11	(50)	
腫瘍サイズ	$\leq 2 \mathrm{cm}$	27	4	(15)	0.114	14	(52)	0.804	14	(52)	0.691	16	(59)	0.242	16	(59)	0.164	14	(52)	0.692
	>2cm	128	38	(30)		63	(49)		61	(48)		60	(47)		57	(45)		61	(48)	
腫瘍グレード	1	22	5	(23)	0.882	12	(55)	0.833	12	(55)	<u>0. 033*</u>	16	(73)	<u>0. 011*</u>	12	(55)	0.265	11	(50)	0.476
	2	111	31	(28)		55	(50)		58	(52)		54	(49)		54	(49)		56	(50)	
	3	22	6	(27)		10	(45)		5	(23)		6	(27)		7	(32)		8	(36)	
静脈侵襲	-	26	6	(23)	0.613	12	(46)	0.694	12	(46)	0.802	12	(46)	0.748	15	(58)	0.236	14	(54)	0.542
	+	129	36	(28)		65	(50)		63	(49)		64	(50)		58	(45)		61	(47)	
リンパ管侵襲	-	54	18	(33)	0.202	25	(46)	0.538	28	(52)	0.528	29	(54)	0.395	27	(50)	0.597	27	(50)	0.769
	+	101	24	(34)		52	(51)		47	(47)		47	(47)		46	(46)		48	(48)	
神経周囲侵襲	-	16	3	(19)	0.597	8	(50)	0.609	9	(56)	0.509	9	(56)	0.520	11	(69)	0.125	7	(44)	0.572
	+	139	39	(28)		69	(50)		66	(47)		67	(48)		62	(45)		68	(49)	
pT 因子	T1	3	1	(33)	0.988	2	(67)	0.343	1	(33)	0.237	2	(67)	0.656	2	(67)	0.685	2	(67)	0.226
	T2	3	1	(33)		0	(0)		0	(100)		1	(33)		1	(33)		0	(0)	
	T3	145	39	(27)		73	(50)		71	(49)		72	(50)		69	(48)		70	(48)	
	T4	4	1	(25)		2	(50)		3	(75)		1	(25)		1	(25)		3	(75)	
pN 因子	NO	34	6	(18)	0.160	16	(47)	0.730	19	(56)	0.322	20	(59)	0.196	18	(53)	0.440	17	(50)	0.322
	N1	121	36	(30)		61	(50)		56	(46)		56	(46)		55	(45)		56	(46)	
pStage (UICC)	Ι	3	1	(33)	0.992	1	(33)	0.876	1	(33)	0.469	1	(33)	0.436	2	(67)	0.733	1	(33)	0.469
	П	136	37	(27)		67	(49)		67	(49)		70	(51)		64	(47)		67	(49)	
	Ш	4	1	(25)		2	(50)		3	(75)		1	(25)		1	(25)		3	(75)	
	IV	12	3	(25)		7	(58)		4	(33)		4	(33)		6	(50)		4	(33)	

表3 CLタイプのシグニチャー分子の発現と臨床病理学的因子との関連性

*:p<0.05 (χ²検定)

亦目		総	CAV1			KRT14			S100A	2		NT5E			PHLDA	L		HK2		
没里	<i>X7</i> - y -	N	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p值	陽性	(%)	p 値
年齢	≤60	52	16	(31)	<u>0. 017*</u>	8	(15)	0.211	30	(58)	0. 034*	26	(50)	0.358	22	(42)	0.252	25	(48)	1.000
	>60	103	15	(15)		9	(9)		41	(40)		44	(43)		54	(52)		50	(49)	
性別	男	91	15	(16)	0.191	13	(14)	0.115	42	(46)	0.917	48	(53)	0.016*	42	(46)	0.469	39	(43)	0.129
	女	64	16	(25)		4	(6)		29	(45)		22	(34)		34	(53)		36	(56)	
腫瘍部位	頭 部	94	18	(19)	0.742	9	(10)	0.490	46	(49)	0.331	46	(49)	0.195	28	(30)	0.447	50	(53)	0.105
	体尾部	61	13	(21)		8	(13)		25	(41)		24	(39)		28	(46)		25	(41)	
局所癌遺残	R0	127	25	(20)	0.327	14	(11)	0.870	58	(46)	0.255	59	(46)	0.778	60	(47)	0.480	62	(49)	0.709
	R1	22	6	(27)		2	(9)		12	(55)		9	(41)		13	(59)		11	(50)	
腫瘍サイズ	≤2cm	27	1	(4)	<u>0. 019*</u>	4	(15)	0.482	11	(41)	0.561	11	(41)	0.565	12	(44)	0.549	14	(52)	0.746
	>2cm	128	30	(23)		13	(10)		60	(47)		59	(46)		64	(50)		61	(48)	
腫瘍グレード	1	22	0	(0)	<u>0. 001*</u>	0	(0)	0.139	3	(14)	<u>0. 001*</u>	4	(18)	<u>0. 011*</u>	8	(36)	0.500	13	(59)	0.440
	2	111	21	(19)		13	(12)		53	(48)		52	(47)		56	(50)		52	(47)	
	3	22	10	(45)		4	(18)		15	(68)		14	(64)		12	(55)		10	(45)	
静脈侵襲	-	26	0	(0)	<u>0. 005*</u>	1	(4)	0.203	10	(38)	0.410	9	(35)	0.211	17	(65)	0.079	20	(77)	<u>0. 002*</u>
	+	129	31	(24)		16	(12)		61	(47)		61	(47)		59	(46)		55	(43)	
リンパ管侵襲	-	54	4	(7)	0.004*	6	(11)	0.967	24	(44)	0.804	22	(41)	0.358	25	(46)	0.537	30	(56)	0.232
	+	101	27	(27)		11	(11)		47	(47)		48	(48)		51	(50)		45	(45)	
神経周囲侵襲	-	16	1	(6)	0.301	2	(13)	0.921	7	(44)	0.546	5	(31)	0.268	8	(50)	0.609	10	(63)	0.332
	+	139	30	(22)		15	(11)		63	(45)		64	(46)		68	(49)		65	(47)	
pT 因子	T1	3	0	(0)	0.445	1	(33)	0.428	2	(67)	0.625	1	(33)	0.308	2	(67)	0.881	2	(67)	0.202
	T2	3	0	(0)		0	(0)		2	(67)		0	(0)		1	(33)		2	(67)	
	Т3	145	31	(21)		15	(10)		66	(46)		68	(47)		71	(49)		71	(49)	
	T4	4	0	(0)		1	(25)		1	(25)		1	(25)		2	(50)		0	(0)	
pN 因子	NO	34	3	(9)	0.065	2	(6)	0.283	11	(32)	0.075	13	(38)	0.319	22	(65)	<u>0. 047*</u>	17	(50)	0.897
	N1	121	28	(23)		15	(12)		60	(50)		57	(47)		54	(45)		58	(48)	
pStage (UICC)	Ι	3	0	(0)	0.379	1	(33)	0.389	3	(100)	0.160	1	(33)	0.790	2	(67)	0.639	2	(67)	0.126
(3100)	П	136	27	(20)		13	(10)		60	(44)		63	(46)		68	(50)		65	(48)	
	Ш	4	0	(0)		1	(25)		1	(25)		1	(25)		2	(50)		0	(0)	
	IV	12	4	(33)		2	(17)		7	(58)		Ъ	(42)		4	(33)		8	(67)	

表4 QMタイプのシグニチャー分子の発現と臨床病理学的因子との関連性

*:p<0.05 (χ²検定)

4. CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現と予後との関連性

155 症例全てにおいて生存分析を行なった.他病死および追跡不能症例については死亡日あるいは最終生存確認日までを観察期間とし、打ち切り症例とした.全症例における CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現と予後との関連性を解析した結果を表 5 に示す.結果,CL タイプではカットオフ値を中央値とした場合に TFF1 の発現と OS (p=0.048),DFS (p=0.007)に有意な関連性を認め、カットオフ値 30.0 では MUC13 の発現と DFS (p=0.031)に、S100P の発現と OS

(p=0.044)にと、有意な関連性を認めた.また、QM タイプでは、カットオフ値 に関係なく、CAV1 と NT5E の両因子の発現と OS (p<0.001)、DFS (p<0.001)に 有意な関連性を認めた.

			カットオフ値									
シグニラ	チャー分子	med	ian	score30								
		OS	DFS	OS	DFS							
	TSPAN8	0.890	0.625	0.611	0.451							
	S100P	0.113	0.139	0.044	0.065							
CI turno	MUC13	0.648	0.565	0.072	0.031							
CL type	TFF1	0.048	0.007	0.499	0.232							
	TFF3	0.229	0.110	0.069	0.061							
	LGALS4	0.363	0.123	0.727	0.257							
	CAV1	0.000	0.000	0.003	0.000							
	KRT14	0.860	0.193	0.742	0.659							
OM turns	S100A2	0.034	0.019	0.047	0.014							
QM type	NT5E	0.000	0.000	0.000	0.000							
	PHLDA1	0.454	0.235	0.882	0.996							
	HK2	0.681	0.587	0.303	0.354							

表 5	CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現に基づく膵癌症例の
	無再発生存期間および全生存期間における統計学的解析結果

OS, DFS ともにカットオフ値を中央値とした場合の Kaplan-Meier 曲線を図 2,
3 に示す.まず,全症例における CL タイプのシグニチャー分子の発現を全生存 期間(OS),無再発生存期間(DFS)の予後解析からみた Kaplan-Meier 曲線(図 2) では,全生存期間(OS)の log-rank 検定において,TFF1 陽性症例は統計学的有意

差を認め(p=0.048), 生存期間中央値は陽性群で 20.0 か月, 陰性群 14.0 か月と 有意な生存期間の延長がみられた.また, log-rank 検定では統計学的有意差を 認めなかったものの, S100Pの陽性群で生存期間短縮傾向がみられ, QM タイプ に比べ予後良好である CL タイプとしては対照的な結果となった因子もあった. 次に, QM タイプのシグニチャー分子の発現を全生存期間 (OS), 無再発生存期間 (DFS)の予後解析からみた Kaplan-Meier 曲線 (図 3) では,全生存期間 (OS)と無 再発生存期間 (DFS)の log-rank 検定において, CAV1 (OS:p<0.001, DFS:p<0.001), NT5E (OS:p<0.001, DFS:p<0.001), S100A2 (OS:p=0.034, DFS:p=0.019)の陽性 症例は統計学的有意差が認められた.CAV1の生存期間中央値は陽性群で 15.0 か 月,陰性群 21.0 か月,NT5E は陽性群で 14.0 か月,陰性群で 24.0 か月,S100A2 は陽性群で 15.0 か月,陰性群 21.0 か月と各々に有意な生存期間の短縮がみら れた.



図2 CLタイプ因子の発現と患者予後(全生存期間と無再発生存期間)の関係 6 種類のCLタイプ分子マーカー発現による全生存期間および無再発生存期間の予後解 析からみた Kaplan-Meier 生存曲線では,全生存期間および無再発生存期間のlog-rank 検定において TFF-1 陽性症例に統計学的有意差が認められた(p=0.007).



図3 QM タイプ因子の発現と患者予後(全生存期間と無再発生存期間)の関係 6 種類の QM タイプ分子マーカー発現による全生存期間および無再発生存期間の予後解 析からみた Kaplan-Meier 生存曲線では,全生存期間および無再発生存期間の log-rank 検定において CAV1, NT5E, S100A2 の陽性症例に統計学的有意差が認められた(各々 p<0.001, p<0.001, p=0.019).

5. CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現と生存期間に関する単変量および多 変量解析

log-rank 検定を用いた単変量解析の結果(表 6)では、12項目の臨床病理学的因子のうち性別(p=0.008)、腫瘍部位(p=0.050)、局所癌遺残(p=0.008)、 腫瘍サイズ(p<0.001)、腫瘍グレード(p=0.009)、リンパ管侵襲(p<0.001)、 静脈侵襲(p=0.025)、神経周囲侵襲(p<0.001)、pN因子(p<0.001)の9項目 の臨床病理学的因子で統計学的有意差が認められた.また、CL/QMタイプのシグ ニチャー分子の12分子のうち、CLタイプのTFF1(p=0.048)、QMタイプのCAV1 (p<0.001)、S100A2(p=0.034)、NT5E(p<0.001)の4分子で統計学的有意差 が認められた.

次に、これら9項目の臨床病理学的因子とCL/QMタイプのシグニチャー分子の4分子についてCoxの比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行なった.その結果、臨床病理学的因子である腫瘍サイズ(p<0.001,ハザード比=3.092,95%信頼区間:1.75-5.90)とQMタイプのシグニチャー分子であるNT5E(p=0.003,ハザード比=1.959,95%信頼区間:1.25-3.06)が独立した予後規定因子として検出された.

	単変量解析		多変量解析	
因子	p 値	ハザード比	95%信頼区間	p値
年齢(≤60歳/>60歳)	0.649			
性別	0.008	0.773	0.51-1.14	0.201
腫瘍部位(頭部/体尾部)	0.050	0.714	0.48-1.03	0.077
局所癌遺残	0.008	1.002	0.99-1.01	0.665
腫瘍サイズ(≤2cm/>2cm)	<0.001	3.092	1.75-5.90	<0.001
腫瘍グレード(G1/G2/G3)	<u>0.009</u>	1.083	0.72-1.61	0.693
リンパ管侵襲	<u><0.001</u>	1.365	0.87-2.16	0.168
静脈侵襲	<u>0.025</u>	1.110	0.62-2.07	0.730
神経周囲侵襲	<u><0.001</u>	0.982	0.96-1.01	0.190
pT 因子	0.782			
pN 因子	<u><0.001</u>	1.353	0.81-2.33	0.244
pStage (UICC)	0.711			
TSPAN8	0.890			
S100p	0.113			
MUC13	0.648			
TFF1	0.048	1.044	0.67-1.61	0.844
TFF3	0.229			
LGALS4	0.363			
CAV1	<u><0.001</u>	1.383	0.82-2.30	0.219
KRT14	0.860			
S100a2	0.034	0.891	0.58-1.35	0.590
NT5E	<0.001	1.959	1.25-3.06	0.003
PHLDA1	0.454			
HK II	0.681			

表6 膵癌患者 155 症例における全生存期間に及ぼす因子

6. 遺伝子発現プロファイル解析による IHC フェノタイプとの一致性の検証

上記予後解析によって有意差が認められた S100P, TFF1, CAV1, S100A2, NT5E の5分子をIHC サブタイピングマーカー候補分子とし,これらのIHC 発現状態 によってサブタイピングされた症例が,遺伝子発現プロファイルに基づく CL タ イプもしくは QM タイプの遺伝子発現シグニチャーを,それぞれ有するかをマイ クロアレイ解析により検証した(図4).S100P, TFF1, CAV1, S100A2, NT5Eの 5分子をIHC サブタイピングマーカー候補分子として,これらの発現パターン (S100P/TFF1 高発現かつ CAV1/S100A2/NT5E 低発現を IHC-CL タイプ,S100P/TFF1 低発現かつ CAV1/S100A2/NT5E 高発現を IHC-QM タイプ)に基づき,TMA155 症例 の中から 27 症例(CL タイプ 14 症例,QM タイプ 13 症例)を選択した.マイク ロアレイ解析により得られた遺伝子発現プロファイルをもとに,Collisson らが 報告した CL/QM タイプシグニチャー42 遺伝子を用いてクラスター解析を行った ところ,IHC-CL タイプ 14 症例中 12 例が,IHC-QM タイプ 13 症例全例がそれぞ れ主要クラスターへクラスタリングされた.



図4 マイクロアレイ解析を用いた IHC-CL/IHC-QM タイプ膵癌における シグニチャー遺伝子 39 種の遺伝子発現に基づくクラスター解析 FFPE 組織検体から抽出した RNA での本マイクロアレイ解析では、検出ダイナミックレ ンジが相対的に狭小化したため、各遺伝子の発現ごとにレンジ補正を行ったヒートマッ プを示している. 7. EUS-FNA 生検施行 TS1/TS2 膵癌の患者背景

膵癌治療開始前の確定診断を目的として採取された EUS-FNA 検体 183 症例の うち,診療上手術適応が考慮される TS1(主病巣の最大径が 20mm 以下)および TS2(20mm を越え 40mm 以下)患者の臨床病理学的背景を表 7 に示す.症例の年 齢は平均 67.8歳(41~89歳)で,性別は男性 109例,女性 74例(男女比 1.5:1) であった. 腫瘍の発生部位は頭部が 103例,体尾部が 80例, TS 分類では,TS1 が 47例,TS2 が 136例であった.全症例の生存期間中央値は 12.0 か月であった.

表7 EUS-FNABの検討に用いた膵癌症例(183例)の臨床病理学的背景

臨床病理学的因子	N
年齢	
≤60歳 / >60歳	34 / 149
性別	
男性 / 女性	109 / 74
腫瘍部位	
頭部 / 体尾部	103 / 80
TS 分類	
TS1/TS2	47/136

8. EUS-FNA 検体を対象とした NT5E, CAV1 の発現と予後との関連性

IHC サブタイピングマーカー5 分子のうち,予後との関連性において統計学的 比重が高かった IHC-QM マーカーである NT5E と CAV1 について, TS1/TS2 膵癌 183 症例を用い EUS-FNA 検体を用いた予後予測診断に関する検証を行なった.NT5E は腫瘍細胞の管腔表面(細胞膜)や細胞質に陽性像を示し,CAV1 は腫瘍細胞の 細胞膜および細胞質に,それぞれ陽性像を示した(図5).また,NT5Eのみ陽 性は 25 例(13.7%),CAV1 陽性のみ 32 例(17.5%),両分子共に陽性もしくは 陰性はそれぞれ 63 例(34.4%)であった.

Kaplan-Meier 法による全生存曲線(OS)の検討で,NT5E,CAV1ともに高発現 群に対して有意な生存期間の短縮を認めた(図6).全生存期間の中央値では, NT5E 高発現群で18.0か月,低発現群で35.4か月,CAV1においても高発現群で 16.8か月,低発現群で28.2か月であった.また,log-rank 検定の結果からも NT5E 陽性群(p=0.009),CAV1 陽性群(p=0.017)と,陰性群と比較して有意な 生存期間の短縮が認められた.



図 5 膵癌の EUS-FNA 検体を用いた QM タイプ因子である NT5E と CAV1 の 代表的な染色パターン (上段:予後不良群,下段:予後良好群)



図6 EUS-FNA 検体を対象とした NT5E, CAV1 の発現と患者予後との関係 QM タイプ因子である NT5E, CAV1 の発現による患者全生存期間の Kaplan-Meier 生存曲 線では,両因子ともに全生存期間の log-rank 検定において患者予後に統計学的有意差 がみられ,高発現群に対して有意な生存期間の短縮が認められた.

NT5E と CAV1 発現について発現状態を NT5E 陽性/CAV1 陽性群の Group1 と NT5E 陽性/CAV1 陰性群, NT5E 陰性/CAV1 陽性群, NT5E 陰性/CAV1 陽性群の Group2 の 2 群分け OS について生存解析を行ったところ, Group1 となった場合の生存期間の中央値は 22.0 か月, それ以外の群で 66.2 か月と高発現群で優位な生存期間の短縮が認められた.また, log-rank 検定から NT5E 陽性/CAV1 陽性群は, もう一方の群に比較し有意な生存期間の短縮を示した(p=0.003) (図 7).



図7 NT5E/CAV1の発現状態に基づく EUS-FNA 膵癌症例の全生存曲線 Group1:NT5E 陽性/CAV1 陽性群

Group2:NT5E 陽性/CAV1 陰性群,NT5E 陰性/CAV1 陽性群,NT5E 陰性/CAV1 陰性群 Group1 と Group2 の 2 群に分けた患者全生存期間の Kaplan-Meier 生存曲線と log-rank 検定から NT5E 陽性/CAV1 陽性群は、もう一方の群に比較し有意な生存期間の短縮が認 められた.

近年の遺伝子解析技術の進歩に伴い、大規模なゲノム解析により複数の癌腫 でドライバー遺伝子異常が同定され、それに対する分子標的治療やコンパニオ ン診断の臨床開発・導入が進んでいる.特に悪性黒色腫 (BRAF 変異),肺癌 (EGFR 変異, ALK 転座, ROS1 転座, BRAF 変異),乳癌や胃癌(HER2 増幅)などでは標準 的な治療法や診断法の一つとなり,生存期間の大幅な延長がもたらされている. しかし、他の消化器癌における治療予後改善とは対照的に、膵癌においては新 規の化学療法や分子標的治療でも大きな改善をみていない(Jones et al., 2008) (Biankin et al., 2012) (Burris et al., 1997) (Kindler et al., 2010) (Moore et al., 2007)(Long et al., 2016)(Hahn et al., 1996).膵癌におけるゲノ ム解析は、Jones らのサンガー法による膵癌 24 症例における全エクソン・シー ケンス解析 (Jones et al., 2008) から始まり, ICGC (International Cancer Genome Consortium)の欧米豪のグループから報告された全エクソン(Biankin et al., 2012)や全ゲノム・シーケンス解析(Waddell et al., 2015)の結果から、その全 貌が明らかになりつつあるが(Witkiewicz et al., 2015), 膵癌の主たる遺伝子 異常は極めて限定的であり, KRAS, CDKN2A/P16, TP53, SMAD/DPC4 の4遺伝子 が主要なドライバー遺伝子として報告されたが(Yachida et al., 2012),いず れの遺伝子も現時点では治療標的とは言えない. 膵癌においても他のがん種と 同様にプラチナ製剤に奏効を示す DNA 損傷・修復パスウェイ (BRCA1, BRCA2, PALB2) の遺伝子変異などが低頻度ながら認められるものの(Waddell et al., 2015),既存の分子標的治療薬に対し薬物応答性を示す actionable な遺伝子変 異を有する症例割合が少なく、治療に直結した遺伝子変異に基づく分子サブタ イピングはいまだ確立していない.

一方、最近の研究で膵癌の網羅的な遺伝子発現解析が行われ、この遺伝子発 現プロファイリングに基づく分子サブタイピングも試みられ注目されている. Collisson らはこの解析に基づいて膵癌の3種類のサブタイプ (CL, QM, EL)を定 義し,臨床転帰と治療効果に違いがあることを証明した.中でも主要な2サブ タイプである CL タイプに比べ QM タイプは予後不良であることが示された (Suzuoki et al., 2002). また注目すべきは膵癌の標準治療薬に対する感受性 予測が可能であるとされている点で, QM タイプはゲムシタビンに対し, CL タイ プはエルロチニブに対して、それぞれより高い感受性を示すことを明らかにし た(Collisson et al., 2011). さらにその後の研究で, 膵癌細胞株を用いた代 謝プロファイリングによるサブタイプ分類が試みられ,glycolytic タイプ, lipogenic タイプ, slow proliferating タイプの3つのサブタイプへの分類が 試みられた(Waddell et al., 2015). このうちの glycolytic タイプではホスホ エノールピルビン酸やグリセルアルデヒド-3-リン酸などの解糖系に関する酵 素発現が上昇し、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドなどの酸化還元に関 する酵素発現が低下しており、QMタイプと相関することが報告されている. -方, lipogenic タイプではオレイン酸やパルミチン酸など脂質代謝物の発現が上 昇しており、CLタイプと相関することが示されている. この2つのサブタイプ

では代謝阻害剤への異なる感受性が示されており、膵癌治療の新たな可能性が 示唆されている(Kim et al., 2007).特にQMタイプのシグニチャー分子のひと つであるHK2は解糖系の第一段階を触媒する律速酵素として働き、グルコース をグルコース-6-リン酸に分解する酵素で、正常組織よりも悪性腫瘍で活性が高 く、低酸素・低グルコースで発現亢進することが報告されている.低酸素に導 かれ、癌組織の悪性度を決定している因子として知られているHIF1αは、乳癌 の予後不良因子で且つQMタイプのシグネチャー遺伝子でもあるHK2発現と密接 に関与している(Brown and Wilson, 2004)(Semenza, 2012)(Sato-Tadano et al., 2013).また、HIF1αの下流には、同じくQMタイプのシグニチャー遺伝子であ るNT5Eがあり、これらはglycolyticなQMタイプの機能的特徴に結びついてい る可能性が考えられる.

本研究では、Collissonらが報告した CL/QM タイプのシグニチャーを構成する 42の分子(遺伝子)の中から、上述する視点に基づき IHC を用いた診断法への 代替(サロゲート)が可能と考えられる 12 分子を選択し, TMA を用いた予後を 指標としたスクリーニングを行った. その結果, S100P, TFF1, CAV1, S100A2, NT5Eの5分子がIHCサブタイピングマーカー候補分子として絞り込まれた(表 6). さらにこれら5分子のIHC発現状態に基づき, IHC-CLおよびIHC-QMタイ プとして分類された27症例について、マイクロアレイ解析による遺伝子発現プ ロファイリングを行ったところ, Collisson らのシグニチャー構成遺伝子により 2 群化が可能であることがクラスター解析の結果検証された.検討した 27 症例 のうち, IHC-CL タイプ2症例が遺伝子発現プロファイル上 QM サブタイプに含ま れた. 乳癌においては、すでに遺伝子発現プロファイリングに基づく intrinsic subtype (luminal/HER2/basel-like)の IHC 法によるサロゲートが行われている が、両者が完全一致しないことから(Goldhirsch et al., 2011) (Sorlie et al., 2001) (Goldhirsch et al., 2013), 本検討における遺伝子発現プロファイルの 結果と IHC によるサブタイピングの結果が完全一致しなかったことは、許容し 得る事象と考えられる.また、本研究で用いた膵癌の FFPE 組織検体から抽出し た RNA は、相対的に低品質であったため、マイクロアレイ上の蛍光強度のダイ ナミックレンジが低下していたことから,こうした技術的な点が2群化の結果 に影響した可能性も考えられる. 今後高品質の FFPE 組織検体の検証が可能な別 の症例コホートでの追加検証が望ましいと思われる. RNA を用いた遺伝子発現プ ロファイルによるサブタイピングは検体の質にも大きく左右される(Minca et al., 2014) (Pikor et al., 2011) (Tyekucheva et al., 2015)ことは基より, 費用が高額であることから診療上のハードルが高いことと、膵癌は間質成分が 広範囲に存在するためLMDによるエンリッチメントが必須となることからも, IHC によるタンパク発現でサロゲート評価ができることは臨床での実用化を考 える上で、極めて重要と思われる.

臨床病理学的因子と CL/QM タイプ分子の発現との生存に関する複数因子の影響を多変量解析したところ,腫瘍サイズと NT5E 発現に統計学的有意差が認められ,独立した予後予測因子である可能性が示された. 膵癌治療において QM タイプに対するゲムシタビンの有用性が報告されている¹³ことから,今回,独立した予後予測因子として挙がった QM タイプ因子である NT5E の発現と膵癌治療予

後との関係が非常に興味深い.近年がん免疫療法においても制御性T細胞に NT5E が発現していることが注目され(Zarek et al., 2008),本検討結果は PD-L1 発現などが免疫治療効果予測にならない膵癌において,分子標的療法のみなら ず免疫療法の効果予測マーカーになる可能性も示唆された.また,NT5Eの発現 は、epidermal growth factor receptor (EGFR)発現との正の相関があること や、NT5E が EGFR 発現の調節を介して腫瘍細胞の遊走および浸潤を促進すること が報告されており(Gao et al., 2014),さらに NT5E は癌細胞の増殖や遊走への 関連や、乳癌、卵巣癌などとの予後との関連性も報告され、新たな癌治療のタ ーゲットとなり得るとして注目されている(Lu et al., 2013)(Loi et al., 2013) (Turcotte et al., 2015).本研究からさらに、NT5E はゲムシタビンなど特定の 治療薬に対して高い感受性が期待される QM タイプの分子サロゲートマーカーの ひとつになることも期待された.

これらの結果を踏まえ、手術適応膵癌患者に対する個別化治療を想定し、本 分子サブタイピング法の術前生検への適用性を確認するため、EUS-FNA 検体に対 する NT5E、CAV1 の IHC 解析を行った.両分子の発現評価は、微小な EUS-FNA 検 体においても日常診療上可能であり、また切除材料の結果と同様に有意な生存 期間の短縮が認められ、予後不良な亜群を特徴づける分子サブタイプマーカー として診断実用化に期待できる結果であった.さらに、これらサブタイプがゲ ムシタビンにおける治療効果予測因子となる可能性があり、今後はゲムシタビ ンを用いた術後化学療法施行症例での CAV1、NT5E の発現と再発率や予後に関す る検討を行いたい.

膵癌の治療予後改善のためには、新たな早期診断や治療戦略の確立が急務で、 現在膵癌では術前化学療法が行われているが、その感受性・抵抗性は様々であ り、薬剤の適切な選択が重要となっている.遺伝子サブタイピングや IHC サロ ゲートマーカーなどを適切に利用した分子病理診断法の確立は、患者予後の推 定のみならず、薬物治療への感受性予測を通じて治療方針を決定するうえで今 後重要な役割を持つと思われる.

総括および結論

本研究から以下のような新知見を得た.

- (1) 免疫組織化学的手法による,膵癌CL/QMタイプのシグニチャー分子の発現 と予後との関連性から,CLタイプのTFF1高発現群において有意な生存期 間の延長を確認できた.また,予後不良因子であるQMタイプのCAV1,NT5E, S100A2の高発現群で有意な生存期間の短縮が認められた.さらに,臨床 病理学的因子を含めた多変量解析からNT5Eの発現は膵癌患者の予後を予 測する独立した因子である可能性が示され,QMタイプのIHCサロゲートマ ーカーのひとつとなり得る可能性が示唆された.
- (2) IHCサブタイピングによって分けられたCL/QMタイプ各々の症例より核酸を抽出し、マイクロアレイ解析による遺伝子発現解析を行なった.結果、遺伝子発現プロファイルとIHCフェノタイプとの一致性を確認することができ、IHCサブタイピングのマーカーパネルとしての妥当性についても評価することができた.また、本研究においての膵癌症例の遺伝子発現が既報の遺伝子シグニチャーと一致していることも確認できた.
- (3) 膵癌EUS-FNA検体を対象にQMタイプのIHCサブタイピングマーカーとして 抽出されたCAV1とNT5Eを染色した結果,両分子の発現と生存期間に有意 な関連性を認め,生存期間の短縮から予後不良のサブタイプ分子として 有用であることが示唆された.

これらの結果は、膵癌の病理診断において免疫組織化学的検索を加えるこ とにより、患者の予後推定のみならず、今後進むであろう膵癌薬物治療の個 別化に向けた診断法開発に寄与する可能性がある.

謝 辞

稿を終えるにあたり本研究の機会を与えていただいた,北海道大学大学院医 学院分子診断病理学教室 松野吉宏教授に深く感謝致します.研究において直 接ご指導頂いた,北海道大学病院ゲノム・コンパニオン診断研究部門 畑中豊 特任講師,北海道大学病院病理診断科 三橋智子准教授,北海道大学病院病理 部 諸岡亜早美技師に深く感謝申し上げます.また,予後をはじめとする臨床 データの解析・集積に快くご協力くださった北海道大学大学院医学研究院 社 会医学講座 医学統計学教室 伊藤陽一准教授,北海道大学病院消化器内科 桒谷将城助教,北海道大学病院消化器外科 II 佐藤大介先生,新田健雄先生, 中村透助教,土川貴裕講師,平野聡教授に感謝申し上げます. 最後に,本研究を支えてくださった北海道大学病院病理診断科,北海道大学病 院病理部の皆様に心より御礼申し上げます.

引用文献

Akiyama, H., Ueda, Y., Nobumasa, H., Ooshima, H., Ishizawa, Y., Kitahiro, K., Miyagawa, I., Watanabe, K., Nakamura, T., Tanaka, R., *et al.* (2015). A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms. Analytical biochemistry *472*, 75-83.

Bachem, M.G., Schunemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Beger, H., Buck, A., Zhou, S., Schmid-Kotsas, A., and Adler, G. (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. Gastroenterology *128*, 907-921.

Behrens, C., Lin, H.Y., Lee, J.J., Raso, M.G., Hong, W.K., Wistuba, II, and Lotan, R. (2008). Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the pathogenesis of lung cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14, 6014-6022.

Biankin, A.V., Waddell, N., Kassahn, K.S., Gingras, M.C., Muthuswamy, L.B., Johns, A.L., Miller, D.K., Wilson, P.J., Patch, A.M., Wu, J., *et al.* (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. Nature *491*, 399-405.

Brown, J.M., and Wilson, W.R. (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. Nature reviews Cancer 4, 437-447.

Brown, K. M., Siripurapu, V., Davidson, M., Cohen, S. J., Konski, A., Watson, J. C., Li, T., Ciocca, V., Cooper, H., and Hoffman, J.P. (2008). Chemoradiation followed by chemotherapy before resection for borderline pancreatic adenocarcinoma. American journal of surgery *195*, 318-321.

Burris, H.A., 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., *et al.* (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *15*, 2403-2413. Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., *et al.* (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. Journal of the National Cancer Institute *101*, 736-750.

Collisson, E.A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W.J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G.E., Jakkula, L., *et al.* (2011). Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. Nature medicine *17*, 500-503.

Gao, Z.W., Dong, K., and Zhang, H.Z. (2014). The roles of CD73 in cancer. BioMed research international *2014*, 460654.

Girard, N., Mornex, F., Bossard, N., Ychou, M., Chauffert, B., and Wautot, V. (2010). Estimating optimal dose of twice-weekly gemcitabine for concurrent chemoradiotherapy in unresectable pancreatic carcinoma: mature results of GEMRT-01 Phase I trial. International journal of radiation oncology, biology, physics 77, 1426-1432.

Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thurlimann, B., and Senn, H.J. (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 24, 2206-2223.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thurlimann, B., and Senn, H.J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology 22, 1736-1747.

Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., *et al.* (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science (New York, NY) *271*, 350-353.

Ito, Y., Miyashiro, I., Ito, H., Hosono, S., Chihara, D., Nakata-Yamada, K., Nakayama, M., Matsuzaka, M., Hattori, M., Sugiyama, H., *et al.* (2014). Long-term survival and conditional survival of cancer patients in Japan

using population-based cancer registry data. Cancer science *105*, 1480-1486.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., *et al.* (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. Science (New York, NY) *321*, 1801-1806.

Katanoda, K., Hori, M., Matsuda, T., Shibata, A., Nishino, Y., Hattori, M., Soda, M., Ioka, A., Sobue, T., and Nishimoto, H. (2015). An updated report on the trends in cancer incidence and mortality in Japan, 1958-2013. Japanese journal of clinical oncology *45*, 390-401.

Kato, H., Usui, M., Isaji, S., Nagakawa, T., Wada, K., Unno, M., Nakao, A., Miyakawa, S., and Ohta, T. (2013). Clinical features and treatment outcome of borderline resectable pancreatic head/body cancer: a multi-institutional survey by the Japanese Society of Pancreatic Surgery. Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences *20*, 601-610.

Kim, J.W., Gao, P., Liu, Y.C., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. Molecular and cellular biology *27*, 7381-7393.

Kindler, H.L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Sutherland, S., Schrag, D., Hurwitz, H., Innocenti, F., Mulcahy, M.F., O'Reilly, E., Wozniak, T.F., *et al.* (2010). Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *28*, 3617-3622.

Loi, S., Pommey, S., Haibe-Kains, B., Beavis, P.A., Darcy, P.K., Smyth, M.J., and Stagg, J. (2013). CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 11091-11096.

Long, J., Liu, Z., Wu, X., Xu, Y., and Ge, C. (2016). Gene expression profile analysis of pancreatic cancer based on microarray data. Molecular medicine reports *13*, 3913-3919.

Lu, X.X., Chen, Y.T., Feng, B., Mao, X.B., Yu, B., and Chu, X.Y. (2013). Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-lalpha in gastric carcinoma. World journal of gastroenterology *19*, 1912-1918.

Matsuno, S., Egawa, S., Fukuyama, S., Motoi, F., Sunamura, M., Isaji, S., Imaizumi, T., Okada, S., Kato, H., Suda, K.*, et al.* (2004). Pancreatic Cancer Registry in Japan: 20 years of experience. Pancreas *28*, 219-230.

Minca, E.C., Tubbs, R.R., Portier, B.P., Wang, Z., Lanigan, C., Aronow, M.E., Triozzi, P.L., Singh, A., Cook, J.R., Saunthararajah, Y., *et al.* (2014). Genomic microarray analysis on formalin-fixed paraffin-embedded material for uveal melanoma prognostication. Cancer genetics *207*, 306-315.

Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H. J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., *et al.* (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *25*, 1960-1966.

Pikor, L.A., Enfield, K.S., Cameron, H., and Lam, W.L. (2011). DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. Journal of visualized experiments : JoVE.

Ryan, D.P., Hong, T.S., and Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. The New England journal of medicine *371*, 1039-1049.

Sato-Tadano, A., Suzuki, T., Amari, M., Takagi, K., Miki, Y., Tamaki, K., Watanabe, M., Ishida, T., Sasano, H., and Ohuchi, N. (2013). Hexokinase II in breast carcinoma: a potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-lalpha and Ki-67. Cancer science *104*, 1380-1388.

Sato, F., Tsuchiya, S., Terasawa, K., and Tsujimoto, G. (2009). Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. PloS one *4*, e5540.

Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. Trends in pharmacological sciences *33*, 207-214.

Shi, L., Reid, L.H., Jones, W.D., Shippy, R., Warrington, J.A., Baker, S.C., Collins, P.J., de Longueville, F., Kawasaki, E.S., Lee, K.Y., *et al.* (2006). The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. Nature biotechnology *24*, 1151-1161.

Shibuya, K., Oya, N., Fujii, T., Doi, R., Nakamura, A., Matsuo, Y., Mitsumori, M., and Hiraoka, M. (2011). Phase II study of radiation therapy combined with weekly low-dose gemcitabine for locally advanced, unresectable pancreatic cancer. American journal of clinical oncology *34*, 115-119.

Shimada, K., Sakamoto, Y., Sano, T., and Kosuge, T. (2006). Prognostic factors after distal pancreatectomy with extended lymphadenectomy for invasive pancreatic adenocarcinoma of the body and tail. Surgery *139*, 288-295.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. CA: a cancer journal for clinicians *65*, 5-29.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 10869-10874.

Suzuoki, M., Miyamoto, M., Kato, K., Hiraoka, K., Oshikiri, T., Nakakubo, Y., Fukunaga, A., Shichinohe, T., Shinohara, T., Itoh, T., *et al.* (2002). Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. British journal of cancer *87*, 1140-1144.

Turcotte, M., Spring, K., Pommey, S., Chouinard, G., Cousineau, I., George, J., Chen, G.M., Gendoo, D.M., Haibe-Kains, B., Karn, T., *et al.* (2015). CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. Cancer research *75*, 4494-4503.

Tyekucheva, S., Martin, N.E., Stack, E.C., Wei, W., Vathipadiekal, V., Waldron, L., Fiorentino, M., Lis, R.T., Stampfer, M.J., Loda, M., *et al.* (2015). Comparing Platforms for Messenger RNA Expression Profiling of Archival Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. The Journal of molecular diagnostics : JMD *17*, 374-381. Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., Kassahn, K.S., Bailey, P., Johns, A.L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., *et al.* (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. Nature *518*, 495-501.

Witkiewicz, A.K., McMillan, E.A., Balaji, U., Baek, G., Lin, W.C., Mansour, J., Mollaee, M., Wagner, K.U., Koduru, P., Yopp, A., *et al.* (2015). Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. Nature communications *6*, 6744.

Yachida, S., White, C.M., Naito, Y., Zhong, Y., Brosnan, J.A., Macgregor-Das, A.M., Morgan, R.A., Saunders, T., Laheru, D.A., Herman, J.M., *et al.* (2012). Clinical significance of the genetic landscape of pancreatic cancer and implications for identification of potential long-term survivors. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 18, 6339-6347.

Zarek, P.E., Huang, C.T., Lutz, E.R., Kowalski, J., Horton, M.R., Linden, J., Drake, C.G., and Powell, J.D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. Blood *111*, 251-259.

国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センターがん登録・統計 [Internet]. [cited 2016 Mar 10]. Available from: http://ganjoho.jp/reg_stat/index.html.