



Title	腭充実性偽乳頭腫瘍における超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体と次世代シーケンサーを用いたCTNNB1遺伝子変異解析に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	久保田, 良政
Description	配架番号 : 2205
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12101号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61580
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshimasa_Kubota_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 久保田 良政

主査 准教授 神山 俊哉
審査担当者 副査 教授 坂本 直哉
副査 教授 平野 聡
副査 准教授 濱田 淳一

学 位 論 文 題 名

膵充実性偽乳頭腫瘍における超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体と次世代シーケンサーを用いた
CTNNB1 遺伝子変異解析に関する研究

(CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using
endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing)

膵充実性偽乳頭腫瘍（SPN）は若年女性に好発する稀な腫瘍である。予後は良好であるが、約15%に転移を認め、外科的切除が第一選択となる。典型的には石灰化を有し、充実成分と嚢胞成分からなる腫瘍である。組織学的には結合性の弱い monomorphic な上皮細胞が、充実性および線維血管軸を中心として偽乳頭状構造を形成する。免疫組織化学的には β -catenin に対する染色性が特徴的であり、正常細胞では細胞膜が染まるのに対し、腫瘍細胞では細胞質や核が濃染される。 β -catenin 遺伝子である CTNNB1 の exon3 にミスセンス変異を認めることが報告されている。 β -catenin には細胞接着因子としての働きと、Wnt シグナル伝達経路における転写制御因子としての働きをもつ。超音波内視鏡下穿刺吸引生検（EUS-FNA）は膵の充実性腫瘍の診断において安全かつ有効な方法であり、SPN の術前診断の正診率に関しては 75%-100%と報告されている。次世代シーケンシング（NGS）の出現により、短時間・低コスト、かつ少量の検体からのシーケンシング可能となった。これまでに EUS-FNA 検体を用いた NGS による変異解析の報告なく、本研究では、EUS-FNA 検体を用いた NGS による変異解析の可否を調べるために、膵疾患検体における CTNNB1 の exon3 の変異解析を行った。

北海道大学病院において 2008 年 12 月から 2013 年 6 月の間に、膵疾患に対して EUS-FNA を施行した 38 症例を用いて解析を行った。疾患の内訳は SPN が 7 例、膵癌が 16 例、膵神経内分泌腫瘍（PNET）が 11 例、膵腺房細胞癌が 1 例、膵炎が 3 例であった。NGS の結果、SPN 症例は全例で CTNNB1 の exon3 にミスセンス変異を認めた。PNET 症例では 1 例にのみミスセンス変異を認めた。その他の症例・疾患では変異を認めなかった。SPN 6 症例において NGS で解析

を行ったものと同じの検体を用いて **direct sequencing** を行ったが、**1** 例のみで変異の検出が可能であった。

結論として、**SPN** をはじめとした膵 **EUS-FNA** 検体を用いた **NGS** による異解析が十分に可能であった。

審査にあたり、まず副査の濱田准教授から本文中に同意書、倫理委員会の記載漏れについて指摘があり、申請者は、追記すると回答。次いで **Direct sequencing** での変異検出について、波形上検出可能ではないかとの指摘があり、申請者は、変異箇所を認識していれば可能であるが、拾い上げは解析ソフトを用いて行ったため、検出不能としたと回答。また変異頻度と腫瘍の割合に関して質問があり、**SPN** の **CTNNB1** 変異は **gain of function** であり、全ての腫瘍細胞の片 **allele** に変異があると考えられるため変異頻度の **2** 倍が腫瘍の割合であると説明。病理像を見ているものと、変異解析をしているものは別穿刺であるため、病理学的には確認していないと回答した。更に、本文中に **1** か所誤字を指摘していただいた。次に副査の平野教授からは本結果の **SPN** 診断に対する意義について質問があった。申請者は、もともと典型例では年齢、性別、画像で診断可能であり、また免疫染色まで施行可能な十分量の検体が得られている場合には特に付加価値はないが、検体量が少ない場合に補助的に有効である可能性を説明した。**EUS-FNA** 検体と **NGS** を用いた、変異解析が十分に可能であったことを示したことに意義がある研究であったと回答した。**SPN** 以外の症例の変異解析を行った意義についても質問があり、申請者は、既報では **CTNNB1** 変異の報告がなく、**negative control** として行ったと回答した。**Negative control** であれば **direct sequencing** も行った方がより良かったとご指摘いただいた。次に副査の坂本教授からは、本研究で変異を認めた **PNET** 症例で **β-Catenin** 染色が細胞膜に陽性であったことについて質問があり、申請者は **E-cadherin** により **β-Catenin** の核への移行が阻害されるとする報告があると回答。それに対し、肝細胞癌などでも変異がみられることがあるが、免疫染色で細胞質や細胞膜が陽性となることなく、他に大きな **deletion** なども起こり、元々分解が起こりやすく、結果として正常 **allele** からの正常タンパクが細胞膜に分布している可能性につきご教授いただいた。主査の神山准教授からは手術未施行例のその後について質問があり、論文作成後に他院で手術を検討されたと回答した。また転移を起こしうる症例を鑑別できるような候補の変異があるかとの質問があった。現在までに候補となる変異の報告はないものの、分子学的に悪性度の診断がつけば手術の必要性、時期について検討しうる。特に若年者に多い疾患であり学校を休むことや体に傷がつくことを考えると、ある程度経過を見ることができ症例を判別できれば有用である、と回答した。

この論文は、**EUS-FNA** 検体を用いた **NGS** による変異解析が十分に可能であったことを示した点において高く評価され、今後の **EUS-FNA** による診断の補助や分子学的背景による最良の治療選択が可能となることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。