HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	鼻副鼻腔内反性乳頭腫の悪性転化に関わる遺伝子変異の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	安川, 真一郎
Description	配架番号：2413
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13034号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70562
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shinichiro_Yasukawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

（様式９）

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　安川　真一郎

学 位 論 文 題 名

鼻副鼻腔内反性乳頭腫の悪性転化に関わる遺伝子変異の検討

（Investigation of genetic mutation involved in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma.）

【背景と目的】　鼻・副鼻腔領域には多彩な良悪性腫瘍が発生する。良性腫瘍の代表例は鼻副鼻腔乳頭腫であり、組織学的に外反性、円柱上皮性、内反性の３タイプに分かれる。内反性乳頭腫は鼻副鼻腔乳頭腫全体の約半数を占め、癌病変合併は、同時性 7.1%、異時性 3.6%と報告されており、臨床的には悪性腫瘍として考えられている。しかし、どのような腫瘍が悪性化するかを肉眼的・画像的に完全に判断することは現在のところ不可能である。

現在、次世代遺伝子シークエンサー（Next Generation Sequencer, NGS）は研究面で幅広く用いられており、多くの疾患において責任遺伝子の同定が進んでいる。近年アンプリコンシークエンスで標的遺伝子を効率よく検索することができるようになり、臨床応用が可能となってきた。現在のところ、内反性乳頭腫の悪性化に関与する変異遺伝子に関して報告は少ない。我々は、内反性乳頭腫の悪性化に関与する変異遺伝子を同定することで、将来的な内反性乳頭腫の悪性転化の危険性を予測できる可能性があると考えた。

そこで、内反性乳頭腫、異型性組織、扁平上皮癌の変異遺伝子を比較することによって、内反性乳頭腫の悪性化に関与する変異遺伝子の同定を試みることとした。

【対象と方法】　北海道大学病院耳鼻咽喉科・頭頚部外科にて切除された鼻副鼻腔内反性乳頭腫および扁平上皮癌の 29 症例をターゲットアンプリコンシークエンスによる遺伝子解析の対象とした。本実験は北海道大学病院臨床研究管理部の倫理委員会による承認のもと行われた（承認番号 017-0092）。組織型の内訳は内反性乳頭腫のみの症例が 10 例、内反性乳頭腫に一部異型性を伴う症例が 8 例、扁平上皮癌のみの症例が 6 例、扁平上皮癌に内反性乳頭腫を伴う症例が 5 例であった。

H&E 標本にて腫瘍含有割合が最も高い領域を確認し、その FFPE 組織から 10μm に薄切した切片を 5 枚ずつ作成した。H&E 標本を参考に、同切片の腫瘍含有割合が高い領域を肉眼にて確認した。腫瘍含有割合が高い領域のみを削り取り、ゲノム DNA 抽出に用いた。アンプリコンシークエンスパネルとして TruSight Tumor 26(illumina,　San Diego, CA, USA)を用いた。これは、肺、大腸、メラノーマ、胃、および卵巣などの固形腫瘍に関連が深いとされる 26 遺伝子の 175 アンプリコン領域をシークエンスするものとなっている。

ゲノム DNA 抽出後、polymerase chain reaction(PCR)法にて標的遺伝子を増幅した。PCR 産物にアダプターライゲーションを行い、DNA ライブラリとした。同ライブラリを PCR 増幅させ、Miseq（Illumina）でシークエンスした。Miseq から得られた FastQ ファイルを illumina より提供されている解析サーバー、BaseSpace Variant Studio version2,2 で解析し、変異を検出した。一塩基多型と、塩基の挿入/欠失を検出した。

【結果と考察】　全例において 1 個以上の変異遺伝子が検出され、合計 129 個のアミノ酸

変異を伴う変異遺伝子が検出された。また、内反性乳頭腫群、異形成群、扁平上皮癌群の順に変異遺伝子の数は増加していた。*PDGFRA*、*PIK3CA*、*KRAS*、*APC*、*NRAS*、*STK11* の 6 遺伝子は 3 群間で変異遺伝子の出現率に差を認めた。*PDGFRA* 遺伝子と *STK11* 遺伝子は内反性乳頭腫群と異形成群では変異が少ないが、扁平上皮癌群では有意に多く認めた。特に、*STK11* 遺伝子は内反性乳頭腫群と異形成群において変異を認めなかった。*KRAS* 遺伝子は内反性乳頭腫群では変異が少ないが、異形成群と扁平上皮癌群では同等に多く認めた。*PIK3CA* 遺伝子、*APC* 遺伝子、*NRAS* 遺伝子では内反性乳頭腫群＜異形成群＜扁平上皮癌群の順に変異が多くなり、特に *APC* 遺伝子と *NRAS* 遺伝子は内反性乳頭腫群において変異を認めなかった。*TP53* 遺伝子はどの群においても高頻度の遺伝子変異を認めたが、3 群間での差はなかった。

次に、内反性乳頭腫と異形成または扁平上皮癌組織が共存している症例での、同一症例における両組織での変異遺伝子の違いを検討した。異形成群では、内反性乳頭腫または異形成のいずれかの組織に変異を認めた遺伝子はのべ 39 個認めたが、その内、内反性乳頭腫のみに認めた変異遺伝子は 4 個（10%）、逆に異形成のみに認めた変異遺伝子は 6 個（15%）であった。各遺伝子別に検討したが一定の傾向は認めず、大部分は変異遺伝子が一致していた。扁平上皮癌群では、内反性乳頭腫または扁平上皮癌のいずれかの組織に変異を認めた遺伝子はのべ 29 個認めたが、その内、内反性乳頭腫のみに認めた変異遺伝子は 1 個（3%）、逆に扁平上皮癌のみに認めた変異遺伝子は 2 個（7%）であった。各遺伝子別に検討したが一定の傾向は認めず、大部分は変異遺伝子が一致していた。

さらに、内反性乳頭腫群、異形成群、内反性乳頭腫を伴う扁平上皮癌群における内反性乳頭腫組織の変異遺伝子を比較検討した。その結果 *KRAS* 遺伝子、*APC* 遺伝子、*NRAS* 遺伝子、*STK11* 遺伝子において 3 群間で変異遺伝子の出現率に差を認めた。この 4 遺伝子の変異は、内反性乳頭腫群では *KRAS* 遺伝子に変異を認めた 1 症例のみであったが、扁平上皮癌を伴った内反性乳頭腫では全症例で 2 遺伝子以上の変異を認めた。検出された変異遺伝子の平均個数は、内反性乳頭腫群では 2.9 個、異形成群の内反性乳頭腫組織部位では 4.0 個、扁平上皮癌群の内反性乳頭腫組織では 5.4 個であったが、この 4 つの遺伝子のみに注目すると、内反性乳頭腫群では 0.1 個、異形成群の内反性乳頭腫組織部位では 1.3 個、扁平上皮癌群の内反性乳頭腫組織では 2.2 個と 3 群間での変異陽性率に大きな差を認めた。これらの遺伝子は内反性乳頭腫の悪性転化への関与が強く示唆された。このことから、術前に行った内反性乳頭腫の生検組織における KRAS 遺伝子、APC 遺伝子、NRAS 遺伝子、STK11 遺伝子の変異を解析することで、内反性乳頭腫内に扁平上皮癌の存在や、将来的な内反性乳頭腫の悪性転化の危険性を予測できる可能性があると考えられた。

【結論】　NGS を用いたターゲットアンプリコンシークエンスによる解析により、内反性乳頭腫の悪性転化には複数の変異遺伝子（PDGFRA、PIK3CA、KRAS、APC、NRAS、STK11、TP53）が関与している可能性が示唆された。また、内反性乳頭腫群、異形成群、内反性乳頭腫を伴う扁平上皮癌群における内反性乳頭腫組織の変異遺伝子の解析の結果、KRAS 遺伝子、APC 遺伝子、NRAS 遺伝子、STK11 遺伝子で変異率に大きな差を認めた。

本研究結果をもとに、術前に行った内反性乳頭腫の生検組織における KRAS 遺伝子、APC 遺伝子、NRAS 遺伝子、STK11 遺伝子の変異を解析することで、内反性乳頭腫内に扁平上皮癌の存在や、将来的な内反性乳頭腫の悪性転化の危険性を予測できる可能性がある。それにより、術前に悪性組織の混在の有無が判明でき、適切な切除ラインの設定や不必要な拡大切除の回避ができる可能性が示唆された。