HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	丸川, 活司
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2422 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13257号
Issue Date	2018-06-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/71257
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuji_Marukawa_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要約）

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（要約）

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

【はじめに】

浸潤性膵管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%と極めて予後不良の難治性消化器癌の代表である．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が，長期生存が期待できず，患者の多くは初回診断時に切除不能な状態にある．早期で完全切除可能な膵癌は非常に少ないことに加え，切除された膵癌の再発率は 70～90%と高く，術後早期に再発をきたす患者が多い．

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，必要不可欠な手法となっている．膵癌の予後改善には，非切除症例における治療成績の向上が求められているが，薬物療法はその中心的役割を担っており，分子サブタイピング法の確立は急務である．最近では膵癌においても，網羅的遺伝子解析による遺伝子発現プロファイリングが試みられ，数種の遺伝子発現シグネチャーにより，膵癌は classical（CL）タイプ，quasimesenchymal（QM）タイプ，exocrine-like（EL）タイプの 3 亜型に分類され，膵癌の標準治療薬に対する感受性予測が可能であると報告された．頻度が高く主要な 2 つのサブタイプ（CL タイプと QM タイプ）では，CL タイプに比し QM タイプは予後不良であること，また，ゲムシタビンへは QM タイプが，エルロチニブへは CL タイプがより高い感受性を示すことが示された．このような背景から，治療方針の決定等に資する病理確定診断において，上記のサブタイピングを組み込んだ新規分子病理診断法の確立は決めて重要な課題といえる．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．膵癌の組織マイクロアレイ（TMA）を用い，各分子の発現と臨床病理学的意義について，IHC による検討を行い，さらに endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration （EUS-FNA）で採取された膵癌検体を用いて，予後予測診断に関する検証を行なった．

【対象と方法】

対象症例は 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，膵癌と病理診断された 195 症例のうち，術前治療未施行であり，かつホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織の利用が可能であった 155 例を対象とした．TMA は 1 症例につき FFPE ブロックの数か所（腫瘍部位 2～4 か所，正常部位 2 か所）から，組織標本マイクロアレイヤーを用いて採取し，TMA パラフィンブロックを作製した．また，TMA ブロックを用いた IHC 染色の解析は，

各因子ごとの染色強度を 4 段階にスコア化し，各強度の細胞占有率（%）を乗算した和を総スコアとした H score を用いた．解析対象分子は，既報の網羅的

遺伝子発現解析より選択されたシグニチャー分子のうち，それらの機能等に着目し，CL タイプ 6 分子（TSPAN8，S100P，MUC13，TFF1，TFF3，LGALS4）と，QM タイプ 6 分子（CAV1，KRT14，S100A2，NT5E，PHLDA1，HK2）を選択し，各分子の発現と予後を含む臨床病理学的因子との関係を解析した．また，マーカー分子の発現状態を指標に症例選択を行い，レーザーマイクロダイセクション（LCM）を用いて FFPE 組織の腫瘍 RNA 抽出し，マイクロアレイ解析を行い，それら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分子である，42 遺伝子を用いてクラスター解析した後，各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かを検証し，IHC サブタイピングのマーカーパネルの妥当性を評価した．さらに 2011 年から 2015 年に北海道大学病院・消化器内科にて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 症例を対象とし，サロゲートマーカーであることが示唆された候補分子と予後との関係を解析した．

【結果】

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によって，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（p=0.048）．また，予後不良因子とされる QM タイプの CAV1（p<0.001），NT5E（p<0.001），S100A2（p=0.034）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ことが示された．（p=0.003，ハザード比=1.959，95％信頼区間：1.25-3.06）また，IHC サブタイピングによって CL/QM タイプに分けられた CL タイプ 14 症例，QM タイプ 13 症例より RNA を抽出し，マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行なった結果，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，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を検証できた．予後不良因子とされる QM タイプ膵癌の IHC サロゲートマーカーの候補分子として，NT5E および CAV1 が示唆され，EUS-FNA 検体を用いて検討した結果，NT5E 陽性群（OS;p=0.011）および CAV1 陽性群（OS;p=0.009）で有意な生存期間の短縮が認められた．

【考察】

IHC で発現が確認された TFF1、CAV1、NT5E および S100A2 は，CL/QM タイプのシグニチャー分子として膵癌患者の予後を予測する有用なサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された．本研究結果は，膵癌の病理診断において適切なパネルの IHC 検索を加えることにより，患者の予後予測のみならず，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．特に，EUS-FNA で採取された微小な生検検体においても有用性が検証され，患者の予後予測のみならず，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り，今後膵癌の術前診断への応用が期待される．

【まとめ】

網羅的遺伝子発現解析結果に基づき，膵癌の術前診断・治療戦略に資する IHC サブタイピング法の開発を試みた．本研究は膵癌の術後再発症例や非切除

症例における治療成績の向上にも寄与し，結果，膵癌患者の予後予測のみならず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．