



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
Description	配架番号 : 2422
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13257号
Issue Date	2018-06-29
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13257
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90391
Type	doctoral thesis
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会発表目録	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
総括および結論	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。

1. 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.
2. 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。

1. 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」
2. 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年生存率がわずかに約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者が多く、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). 膀胱癌においても, 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群に分子サブタイプ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, 分子サブタイプ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サブタイプ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。

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 5 μ m 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 EnVision™ 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。

表 1 使用した特異抗体

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

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 (Bachem 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 μm) に厚さ 10 μm 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。

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

臨床病理学的因子	N
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	
≤2cm / >2cm	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	
N0 / N1	34 / 121
pStage (UICC)	
I / II / III / IV	3 / 136 / 4 / 12

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.

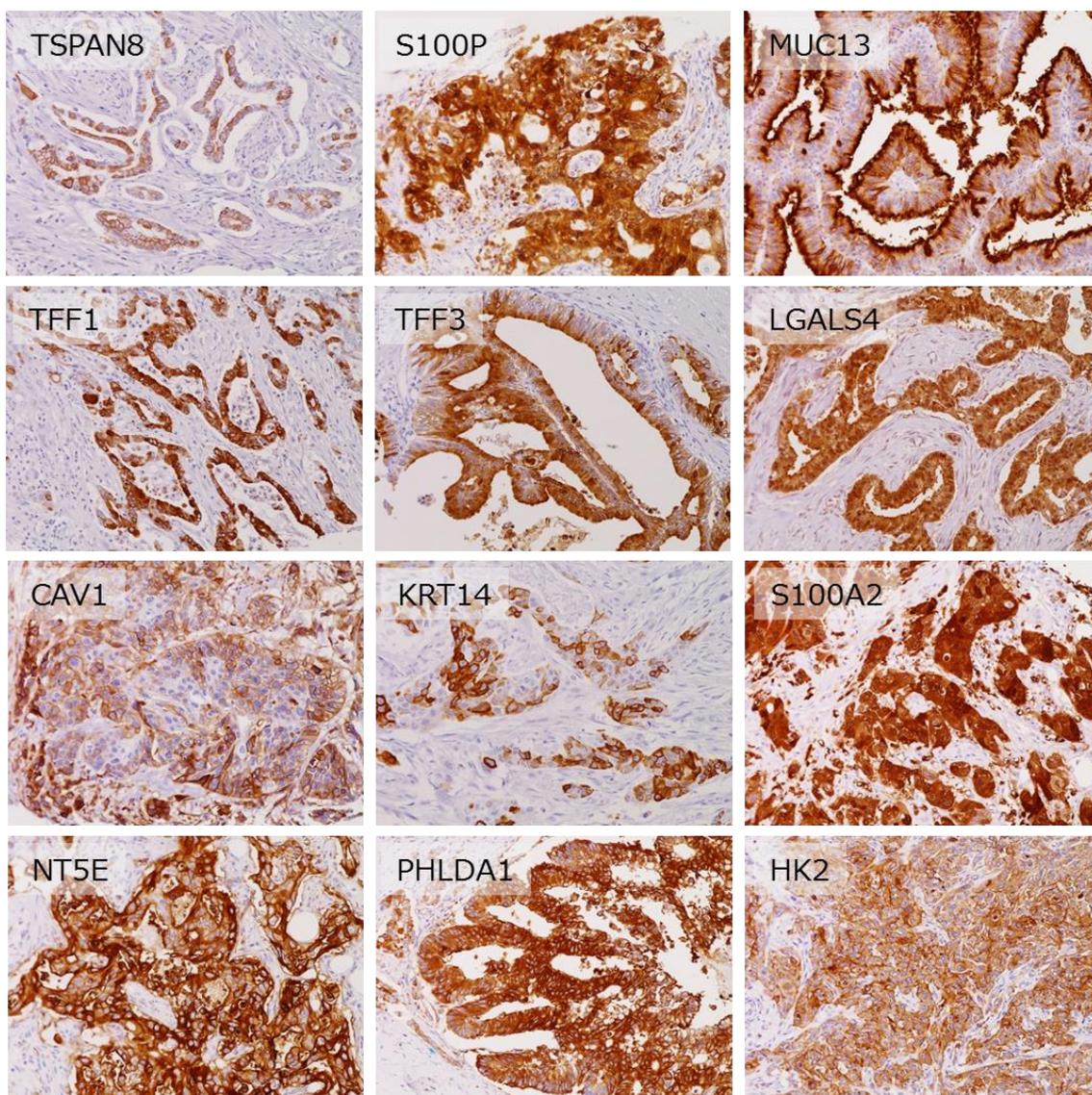


図1 膵癌における CL/QM タイプのシグニチャー分子の発現パターン
CLタイプ (TSPAN8, S100P, MUC13, TFF1, TFF3, LGALS4) の陽性像
QMタイプ (CAV1, KRT14, S100A2, NT5E, PHLDA1, HK2) の陽性像

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 2 cm 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) .

表3 CLタイプ^o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

変量	カテゴリー	総 N	TSPAN8			S100P			MUC13			TFF1			TFF3			LGALS4		
			陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	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)	0.031*	47	(52)	0.176	38	(42)	0.049*
	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	R0	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	≤2cm	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)	0.033*	16	(73)	0.011*	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	N0	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)	I	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
	II	136	37	(27)		67	(49)		67	(49)		70	(51)		64	(47)		67	(49)	
	III	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)	

*:p<0.05 (χ²検定)

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

変量	カテゴリー	総 N	CAV1			KRT14			S100A2			NT5E			PHLDA1			HK2		
			陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値	陽性	(%)	p 値
年齢	≤60	52	16	(31)	0.017*	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)	0.019*	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)	0.001*	0	(0)	0.139	3	(14)	0.001*	4	(18)	0.011*	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)	0.005*	1	(4)	0.203	10	(38)	0.410	9	(35)	0.211	17	(65)	0.079	20	(77)	0.002*
	+	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)	
	T3	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	N0	34	3	(9)	0.065	2	(6)	0.283	11	(32)	0.075	13	(38)	0.319	22	(65)	0.047*	17	(50)	0.897
	N1	121	28	(23)		15	(12)		60	(50)		57	(47)		54	(45)		58	(48)	
pStage (UICC)	I	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
	II	136	27	(20)		13	(10)		60	(44)		63	(46)		68	(50)		65	(48)	
	III	4	0	(0)		1	(25)		1	(25)		1	(25)		2	(50)		0	(0)	
	IV	12	4	(33)		2	(17)		7	(58)		5	(42)		4	(33)		8	(67)	

*: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。

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

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

OS, DFS と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。

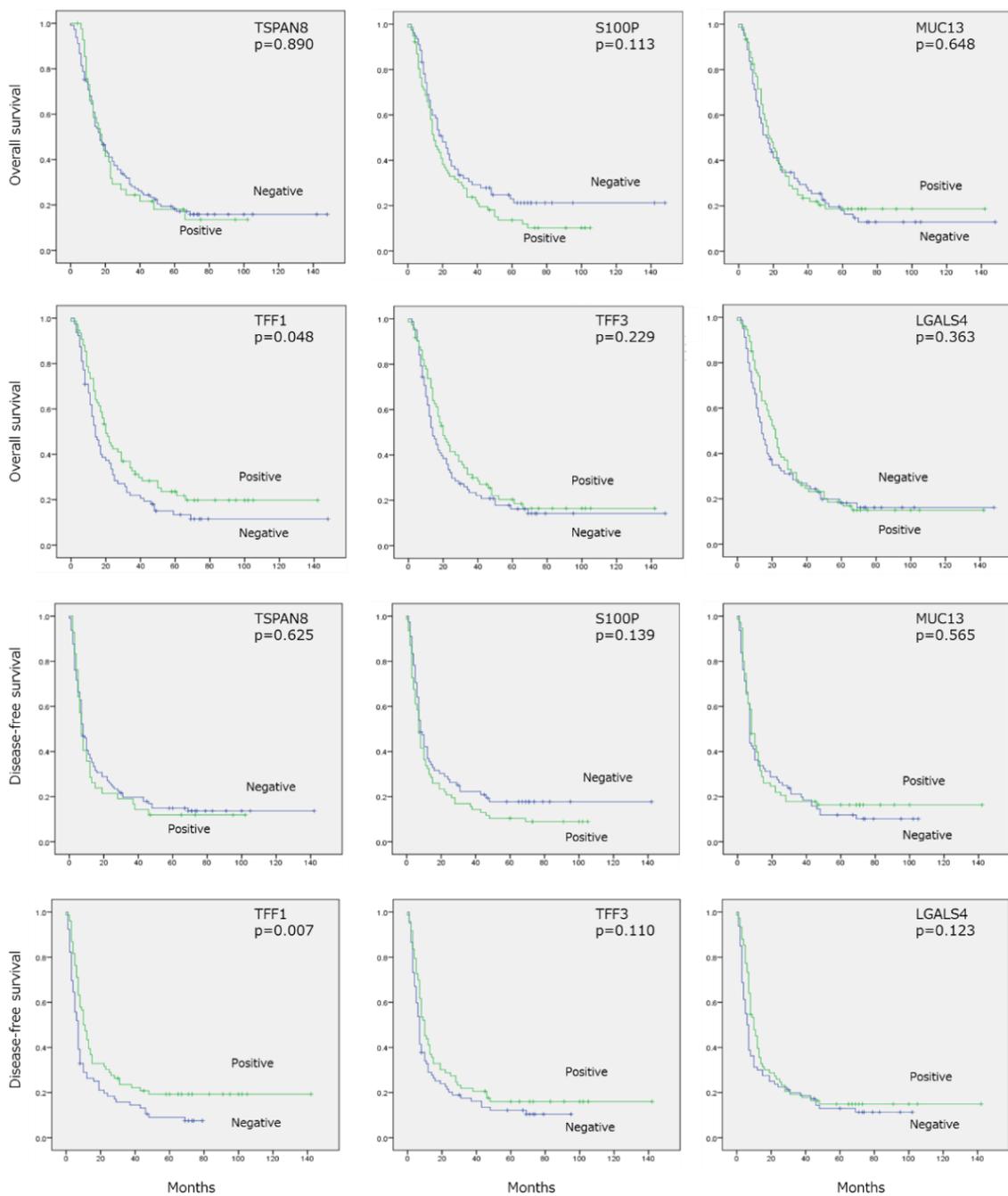


図2 CLタイプ因子の発現と患者予後（全生存期間と無再発生存期間）の関係
 6種類のCLタイプ分子マーカー発現による全生存期間および無再発生存期間の予後解析からみたKaplan-Meier生存曲線では、全生存期間および無再発生存期間のlog-rank検定においてTFF-1陽性症例に統計学的有意差が認められた(p=0.007)。

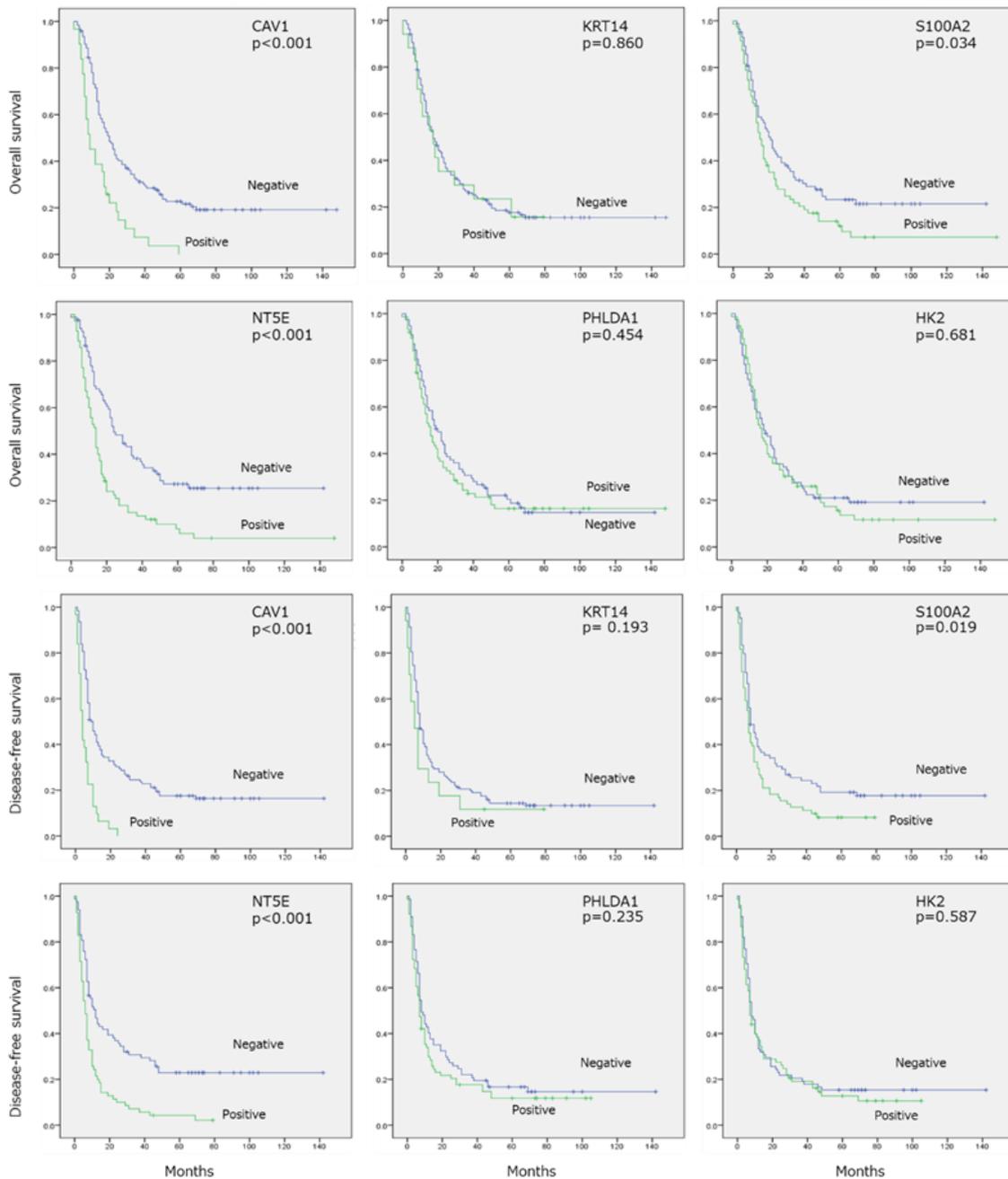


図3 QMタイプ因子の発現と患者予後（全生存期間と無再発生存期間）の関係
 6種類のQMタイプ分子マーカー発現による全生存期間および無再発生存期間の予後解析からみたKaplan-Meier生存曲線では、全生存期間および無再発生存期間のlog-rank検定においてCAV1, NT5E, S100A2の陽性症例に統計学的有意差が認められた（各々 $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.019$ ）。

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.

表 6 膵癌患者 155 症例における全生存期間に及ぼす因子

因子	単変量解析		多変量解析	
	p 値	ハザード比	95%信頼区間	p 値
年齢 (≤60 歳/>60 歳)	0.649			
性別	<u>0.008</u>	0.773	0.51-1.14	0.201
腫瘍部位 (頭部/体尾部)	<u>0.050</u>	0.714	0.48-1.03	0.077
局所癌遺残	<u>0.008</u>	1.002	0.99-1.01	0.665
腫瘍サイズ (≤2cm/>2cm)	<u><0.001</u>	3.092	1.75-5.90	<u><0.001</u>
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	<u>0.048</u>	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	<u>0.034</u>	0.891	0.58-1.35	0.590
NT5E	<u><0.001</u>	1.959	1.25-3.06	<u>0.003</u>
PHLDA1	0.454			
HK II	0.681			

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.

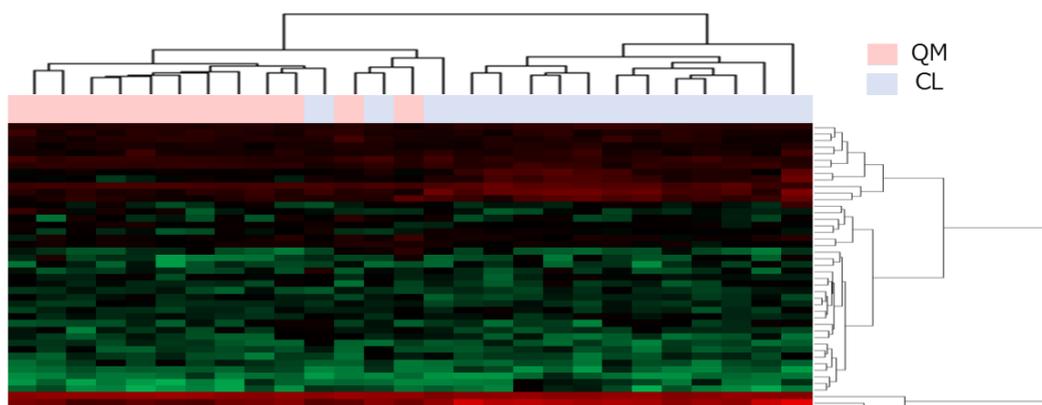


図 4 マイクロアレイ解析を用いた IHC-CL/IHC-QM タイプ膵癌におけるシグニチャー遺伝子 39 種の遺伝子発現に基づくクラスター解析
FFPE 組織検体から抽出した RNA での本マイクロアレイ解析では, 検出ダイナミックレンジが相対的に狭小化したため, 各遺伝子の発現ごとにレンジ補正を行ったヒートマップを示している.

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。

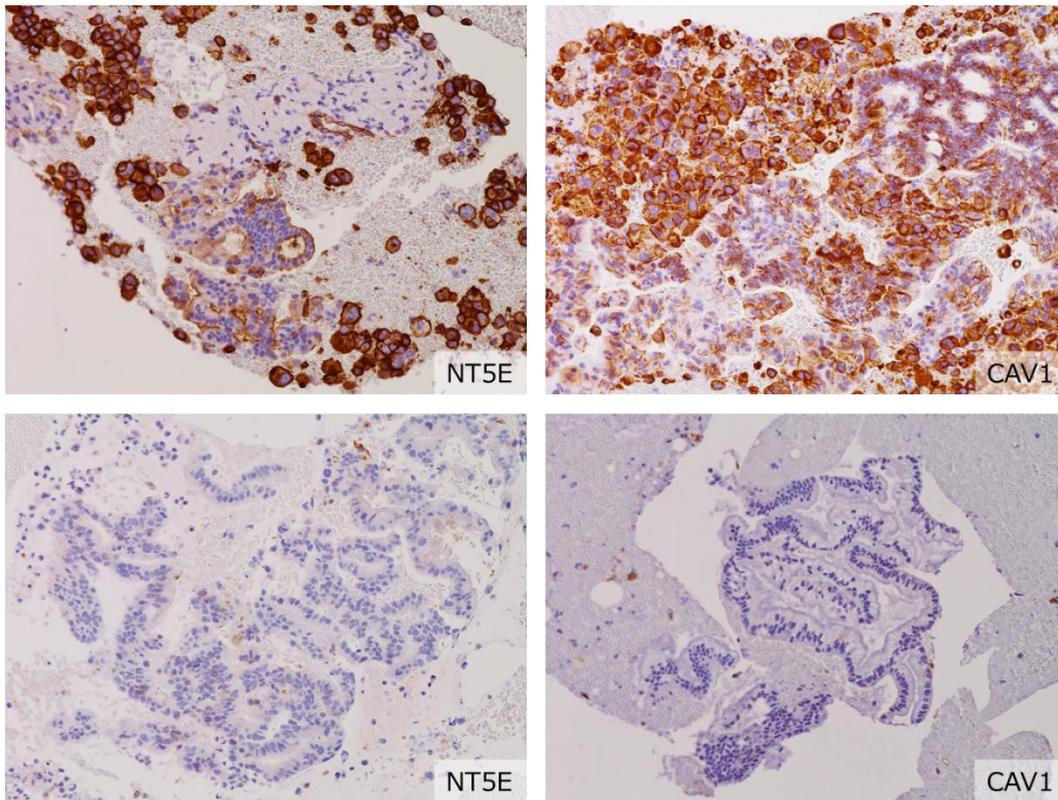


図5 膵癌のEUS-FNA検体を用いたQMタイプ因子であるNT5EとCAV1の代表的な染色パターン
(上段：予後不良群，下段：予後良好群)

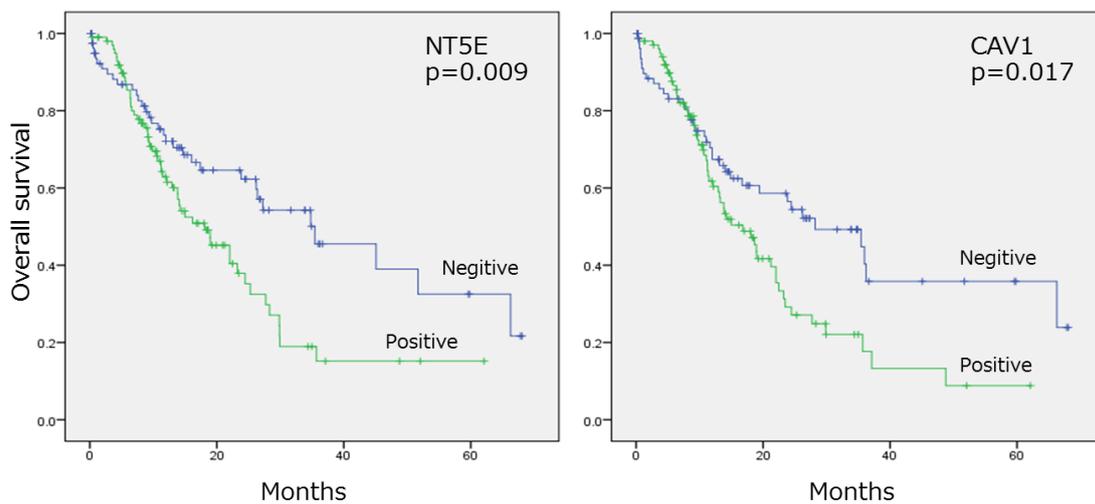


図6 EUS-FNA検体を対象としたNT5E, CAV1の発現と患者予後との関係
QMタイプ因子であるNT5E, CAV1の発現による患者全生存期間のKaplan-Meier生存曲線では、両因子ともに全生存期間のlog-rank検定において患者予後に統計学的有意差がみられ、高発現群に対して有意な生存期間の短縮が認められた。

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 陰性群の 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) .

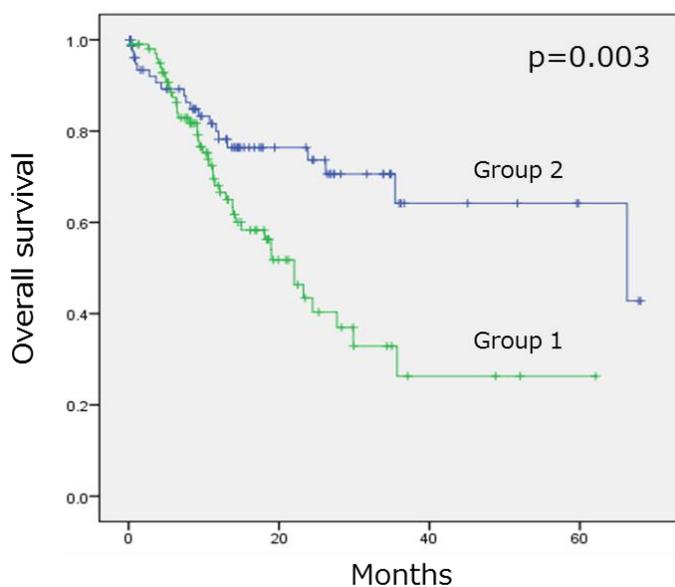


図 7 NT5E/CAV1 の発現状態に基づく EUS-FNA 膵癌症例の全生存曲線
 Group1 : NT5E 陽性/CAV1 陽性群
 Group2 : NT5E 陽性/CAV1 陰性群, NT5E 陰性/CAV1 陽性群, NT5E 陰性/CAV1 陰性群
 Group1 と Group2 の 2 群に分けた患者全生存期間の Kaplan-Meier 生存曲線と log-rank 検定から NT5E 陽性/CAV1 陽性群は, もう一方の群に比較し有意な生存期間の短縮が認められた.

考察

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) (Burriss 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。一方、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 HIF1 α は、乳癌の予後不良因子で且つ QM タイプのシグニ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、*HIF1 α* 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/basal-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、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げられた 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、本研究における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
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
栗谷将城助教，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.
- Burriss, 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-1alpha 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., Sauntharajah, 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-1alpha 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.