

論文の内容の要旨

論文題目 膵神経内分泌腫瘍におけるクロマチンリモデリング因子異常と腫瘍進展・予後との関連

氏名 安永 瑛一

1. 背景

膵神経内分泌腫瘍 (Pancreatic Neuroendocrine Tumor; PanNET) は多様な臨床的特徴を有し、多くは緩徐な進行を示すが、広範な浸潤や転移を来す症例もある。腫瘍の悪性度や予後を予測しうる生物学的マーカーの探索と活用が望まれる。

近年、*DAXX*、*ATRX*、*SETD2* といったクロマチンリモデリング関連遺伝子の変異が、再発リスクの高い PanNET の指標として注目されている。これらの変異は免疫染色法による *DAXX*、*ATRX*、*H3K36me3* 発現消失と対応し、発現消失は高い増殖能や侵襲性、転移再発率と関連する予後不良因子であることが報告されているが、日常診療にその評価をいかに組み込むかは十分検討されていない。

クロマチンリモデリング異常と腫瘍発生・進展との関連については、クロマチンリモデリング異常を有する PanNET の転写因子やホルモンの発現が膵ラ氏島 α 細胞に近いことが報告されているほか、クロマチンリモデリング異常は腫瘍発生の過程で生じる可能性が示唆されている。PanNET は転移再発を長期にわたり繰り返す腫瘍であり、その過程でのクロマチンリモデリング異常の変遷を把握することは重要である。また、PanNET の薬物治療標的分子である *SSTR* の発現と、クロマチンリモデリング異常との関連は未だ検討されていない。

本研究では、PanNET 切除例の *DAXX*/*ATRX*/*H3K36me3* 発現消失の腫瘍内不均一性に着目し、膵ラ氏島 α/β 細胞に特徴的な転写因子、ホルモン、*SSTR* の発現との関連や、転移再発腫瘍におけるクロマチンリモデリング因子発現との関連を詳細に検討することで、クロマチンリモデリング異常の見られる PanNET の性質や、PanNET の進展におけるクロマチンリモデリング異常の意義を新たな視点から探索した。また、クロマチンリモデリング異常の評価を日常病理診断に組み込むべく、予後予測アルゴリズムを検討した。

2. 方法

東京大学医学部附属病院で 1988~2017 年に原発腫瘍が切除された PanNET 連続症例 117 例を対象とし、原発腫瘍とその転移再発腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋検体の代表 1 ブロック分を薄切した組織切片に、*DAXX*、*ATRX*、*H3K36me3* の免疫染色を行い、発現消失の有無と腫瘍内不均一性を検討した。腫瘍内不均一性のある原発腫瘍では、代表 1 割面全体の組織切片に免疫染色を追加し、各成分の分布や割合を検討した。原発腫瘍に対し、ラ氏島構成細胞に特徴的な転写因子 (*ARX*、*PDX1*)、ホルモン (*glucagon*、*insulin*)、*SSTR* (*SSTR2*、*SSTR5*) の免疫染色を行い、特に *DAXX*、*ATRX*、*H3K36me3* 発現の腫瘍内不均一性が見られた症例では、全ての発

現パターンを含む代表 1 ブロック分の組織切片に免疫染色を行い、各成分での転写因子、ホルモン、SSTR の発現を評価した。また、比較のため、同時期に切除された胃・十二指腸 NET 連続症例 40 例の原発腫瘍とその転移再発腫瘍の 1 ブロック分の組織切片にも、DAXX、ATRX、H3K36me3 の免疫染色を行った。

3. 結果

PanNET 症例のうち、DAXX、ATRX、H3K36me3 のいずれも評価可能な原発腫瘍 111 例中 18 例 (16.2%) で、少なくとも 1 因子に発現消失が見られた。うち 9 例では、発現消失の腫瘍内不均一性を示した。一方、胃・十二指腸 NET では、いずれの因子も評価可能な 37 例全例で発現が保持されていた。

DAXX/ATRX/H3K36me3 発現消失群は、高い増殖能や局所侵襲性、転移と有意に相関し、腫瘍径が大きくなると発現消失頻度が増す傾向にあった。多変量解析では WHO grade 2 と腫瘍径 > 2 cm が発現消失と有意に相関していた。また、発現消失は無再発生存期間を有意に短縮させる因子となった。高い増殖能 (WHO 分類 grade 2) または 2 cm を超える腫瘍においても、発現消失群は短い無再発生存期間を示した。以上を踏まえ、WHO grade、腫瘍径に加え、免疫染色による DAXX、ATRX の評価を組み込むことで、再発リスクに応じた症例の層別化が可能となることを明らかとし、新たな術後再発予測アルゴリズムを考案した。

DAXX/ATRX/H3K36me3 発現消失群は、 α 細胞様の転写因子・ホルモン発現 (ARX 陽性、PDX1 陰性、insulin 陰性)、SSTR2 陽性と相関していた。SSTR2 陰性は、 β 細胞様の転写因子・ホルモン発現 (ARX 陰性、PDX1 陽性、glucagon 陰性、insulin 陽性) と相関していた。

DAXX/ATRX/H3K36me3 の発現に腫瘍内不均一性のある原発腫瘍 9 例のうち、2 例で DAXX と ATRX の両者に腫瘍内不均一性が見られ、両者の発現消失領域は相互排他的であった。H3K36me3 発現消失が見られた 5 例はいずれも不均一な消失を示し、DAXX/ATRX のいずれかの発現消失が見られた領域の一部でのみ H3K36me3 の発現が消失していた。転写因子とホルモンの発現が評価可能な 8 例では、いずれもびまん性に ARX 陽性かつ PDX1 陰性を示した。ホルモン発現は、DAXX、ATRX、H3K36me3 の発現パターンが異なる領域間で差が見られない症例が多かったが、ATRX と insulin の発現に相関が窺われる症例が 1 例あった。

原発腫瘍で DAXX/ATRX/H3K36me3 の発現が均一な症例では、原発腫瘍と異なるクロマチンリモデリング異常が転移再発腫瘍で新たに出現した症例は見られなかった。原発腫瘍で DAXX/ATRX/H3K36me3 の発現に腫瘍内不均一性があった症例では、転移再発腫瘍の発現パターンは、原発腫瘍内のいずれかの発現パターンと合致していたが、転移臓器や切除時期により転移再発腫瘍での発現パターンが異なる症例や、同一の転移再発腫瘍内で腫瘍内不均一性を示す症例もあった。

4. 考察

本研究での発現消失頻度は、欧米や中国の報告での遺伝子変異頻度や免疫染色の発現消失頻

度よりも低いですが、韓国の報告と近く、遺伝的背景の地域差を反映している可能性がある。また、発現消失は前腸由来消化器 NET では PanNET にほぼ特異的と考えられた。

PanNET 原発腫瘍で腫瘍径を増すにつれて発現消失が高頻度に見られたことや、一部の症例で発現消失の腫瘍内不均一性を示したことから、クロマチンリモデリング異常は腫瘍発生の過程で生じたと推測される。発現消失群は転移再発の強力なリスク因子であり、DAXX/ATRX 発現の免疫染色評価を加えて考案した術後再発予測アルゴリズムは、原発腫瘍の所見のみから術後再発リスク予測を可能とする、実臨床において有用な指標と考えられる。

DAXX/ATRX/H3K36me3 発現消失 PanNET の半数に腫瘍内不均一性が見られ、異なる発現パターンを有する成分が特徴的な分布を示すものもあった。DAXX/ATRX/H3K36me3 発現消失群は転写因子発現が α 細胞に近いことが示唆され、腫瘍内不均一性のある腫瘍でもびまん性に α 細胞様の転写因子発現が見られたことから、 α 細胞様の転写因子発現を示す細胞にクロマチンリモデリング異常が起こりやすい可能性が示唆された。また、腫瘍内不均一性のある一部の症例ではクロマチンリモデリング異常がホルモン発現に影響する可能性が示唆された。DAXX/ATRX/H3K36me3 の腫瘍内不均一性のある症例で SSTR の発現は均一であり、クロマチンリモデリング異常と SSTR 発現に直接の関連はないことが示唆された。PanNET 原発腫瘍における DAXX/ATRX/H3K36me3 の発現パターンと比べ、転移再発腫瘍で新たな発現異常が付加された症例は見られず、腫瘍内不均一性のある症例では転移臓器や再発時期によって発現パターンが変化する症例を初めて見出した。

本研究の課題として、免疫染色のみの評価であることが挙げられる。先行研究から DAXX/ATRX/H3K36me3 発現消失例の多くは DAXX/ATRX/SETD2 の変異をそれぞれ有すると考えられているが、変異が確認されない発現消失例もあり、発現消失の機序を明らかにする必要がある。腫瘍内不均一性のある症例でも、原発腫瘍内の各成分や転移再発腫瘍での遺伝子変異やメチル化の状態などを比較することでその意義に迫りたい。他のクロマチンリモデリング因子についても相互の関連性や腫瘍内不均一性を検討することが、クロマチンリモデリング異常の包括的な理解につながるであろう。

5. 結論

本研究では、PanNET の転移再発と関連する因子であるクロマチンリモデリング因子発現消失の評価を組み込んだ、実臨床に応用可能な再発予測アルゴリズムを考案した。また、クロマチンリモデリング因子発現の腫瘍内不均一性を詳細に解析した初の研究であり、PanNET の腫瘍発生・進展におけるクロマチンリモデリング異常の意義の一端を新たな視点から示した。今後は、DAXX/ATRX/H3K36me3 以外のクロマチンリモデリング因子の検討や、より詳細な分子生物学的手法による解析により、PanNET におけるクロマチンリモデリング異常の包括的な理解、さらには新たな治療アプローチの創出につながることを期待される。