

博士論文

次世代シーケンサーを用いた腹膜偽粘液腫の
遺伝子解析と病態の解明

野口 玲

目次

略語.....	6
図表一覧.....	8
第一章 次世代シーケンサーを用いた腹膜偽粘液腫の遺伝子解析	
要旨.....	10
1 背景と目的	
1.1 腹膜偽粘液腫の概念.....	11
1.2 疫学.....	11
1.3 臨床経過.....	12
1.4 病理組織像.....	14
1.5 次世代シーケンサー.....	18
1.6 分子生物学的特徴.....	20
1.7 治療.....	23
1.8 本研究の目的.....	26
2 研究方法	
2.1 対象症例.....	27
2.2 臨床データ.....	28

2.3	アンプリコンシーケンス	
2.3.1	DNA 抽出.....	29
2.3.2	アンプリコンシーケンス.....	30
2.3.3	遺伝子変異データ解析.....	32
2.4	免疫組織化学染色.....	35
2.5	統計解析.....	36
3	結果	
3.1	患者背景.....	37
3.2	アンプリコンシーケンス解析	
3.2.1	腹膜偽粘液腫における体細胞変異の同定.....	40
3.2.2	DPAM と PMCA 間での遺伝子変異の比較.....	50
3.3	p53 免疫組織化学染色と TP53 遺伝子変異.....	52
4	考察	
4.1	KRAS.....	54
4.2	GNAS.....	55
4.3	TP53.....	57
4.4	PI3K-AKT pathway.....	58
4.5	新規遺伝子変異.....	59

4.6 予後.....	60
5 結論.....	61
第二章 免疫組織化学染色を用いた腹膜偽粘液腫細胞の特性に関する検討	
要旨.....	62
1 背景と目的	
1.1 gene expression profile による大腸がん分類.....	63
1.2 腹膜偽粘液腫の expression profile.....	65
1.3 本研究の目的.....	66
2 研究方法	
2.1 対象症例.....	67
2.2 臨床データ.....	68
2.3 免疫組織化学染色.....	70
2.4 統計解析.....	73
3 結果	
3.1 患者背景.....	74
3.2 免疫組織化学染色による発現解析	
3.2.1 免疫組織化学染色陽性率での発現解析.....	75
3.2.2 免疫組織化学染色スコアでの発現解析.....	81

4 考察	
4.1 TFF3.....	83
4.2 SLC26A3.....	86
5 結論.....	88
参考文献.....	89
謝辭.....	105

略語

CCR score : the completeness of cytoreduction score

CK : Cytokeratin

CMS : consensus molecular subtypes

CRC : colorectal cancer

CRS : cytoreductive surgery

DPAM : Disseminated peritoneal adenomucinosis

DRA : Down-regulated in adenoma

EPIC : early postoperative intraperitoneal chemotherapy

GIST : gastrointestinal stromal tumors

GNAS : Guanine nucleotide-binding protein, α -stimulating

HIPEC : hyperthermic intraperitoneal chemotherapy

IFF : intestinal trefoil factor

IPMN : intraductal papillary mucinous neoplasm

LAMN : low-grade appendiceal mucinous neoplasm

MACA : mucinous adenocarcinoma

MCP-H : high grade mucinous carcinoma peritonei

MCP-L : low grade mucinous carcinoma peritonei

NGS : Next generation sequencer

PMCA : Peritoneal mucinous carcinomatosis

PMCA-I/D : Peritoneal mucinous carcinomatosis with intermediate or “discordant”

feature

PMP : pseudomyxoma peritonei

TA : transit-amplifying

図表一覧

図 1	PMP の臨床像.....	13
図 2	PMP の組織像.....	17
図 3	PMP の治療.....	25
図 4	遺伝子変異判定の work flow.....	34
図 5	PMP の組織像と p53 免疫組織化学染色.....	53
図 6	PMP の TFF3・SLC26A3 の免疫組織化学染色.....	77
図 7	CRC の TFF3・SLC26A3 の免疫組織化学染色.....	78
図 8	PMP・CRC 間での染色スコア.....	82
表 1	Ion AmpliSeq Cancer Panel v2 の 50 がん関連遺伝子.....	31
表 2	患者情報.....	39
表 3	シーケンスサマリー.....	44
表 4	Variant analysis サマリー.....	44
表 5	Variant analysis.....	45
表 6	変異遺伝子.....	48
表 7	病的変異遺伝子リスト.....	49
表 8	遺伝子変異と p53 免疫組織化学染色.....	51
表 9	患者情報.....	69

表 10	免疫組織化学染色の評価法.....	72
表 11	症例毎の発現比較.....	79
表 12	PMP・CRC 間での染色陽性率の比較.....	80
表 13	DPAM・PMCA 間での染色陽性率の比較.....	80

第一章 次世代シーケンサーを用いた腹膜偽粘液腫の遺伝子解析

要旨

腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei: PMP) は、組織学的に低悪性度を示す播種性腹膜粘液腺腫症 (Disseminated peritoneal adenomucinosis: DPAM) と、高悪性度を示す腹膜粘液性癌腫症 (Peritoneal mucinous carcinomatosis: PMCA) の2種類に分類される。本研究では、PMP の発生・進展メカニズムを明らかにするために、10例の DPAM と 8例の PMCA を対象として、次世代シーケンサーを用いてがん関連遺伝子の変異解析を行った。その結果、*KRAS*・*GNAS* 変異は DPAM、PMCA の両方に高頻度に認められ、*TP53*・*PI3K-AKT pathway* 関連遺伝子の変異は PMCA のみに同定された。これらの結果は、DPAM、PMCA の腫瘍発生、進展メカニズムを理解し、新たな治療戦略の開発に有用である。

1 背景と目的

1.1 腹膜偽粘液腫の概念

PMP は、1884 年に Werth らによって卵巣嚢胞腺腫破裂に伴ってゼラチン様物質が腹膜腔に充満している症例を通して'PMP'という言葉を用いて初めて報告された(1)。その後、1901 年に Fraenkel らが虫垂原発の腹膜偽粘液腫を最初に報告している(2)。現在、PMP は上皮性腫瘍細胞により産生された多量のゼラチン様物質が腹腔内に貯留している状態を示すものとして用いられる。原発巣は虫垂と卵巣が大多数を占め、他に頻度は少ないが、大腸・胆のう・胃・膵臓・卵管・肺・乳腺原発も報告されている(3)。いずれの場合も、原発腫瘍から腫瘍細胞が播種により腹膜に転移し、それらの細胞から分泌されるゼリー様物質が腹腔内に貯留し様々な症状を呈する。

1.2 疫学

発生率の人種差については報告がないが、Smeenk らがオランダ人での PMP の発症率は 100 万人に 1-2 人/年と報告している(4)。本邦での発症率は不明である。発症に関連する要因として全く不明である。

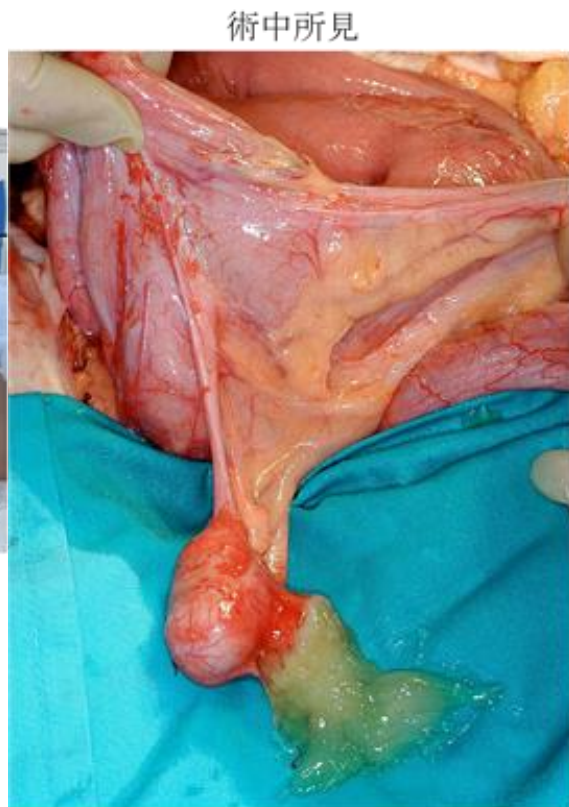
1.3 臨床経過

症状としては、腹痛や、食思不振、悪心嘔吐などの消化器症状で発症するものや、腹部腫瘤として発見されるもの、粘液性腫瘍細胞が産生するゼラチン様物質貯留から腹部膨満が出現して気づかれるものがある(5) (図 1)。その他、虫垂炎などの開腹術で偶然診断されることも少なくない。さらに進行すると腹腔内を腫瘍が圧迫することにより腸閉塞・腸管麻痺・腸管皮膚瘻の形成を来し、最終的に悪液質によって死の転帰を来すことが多い(6, 7)。

図 1 PMP の臨床像



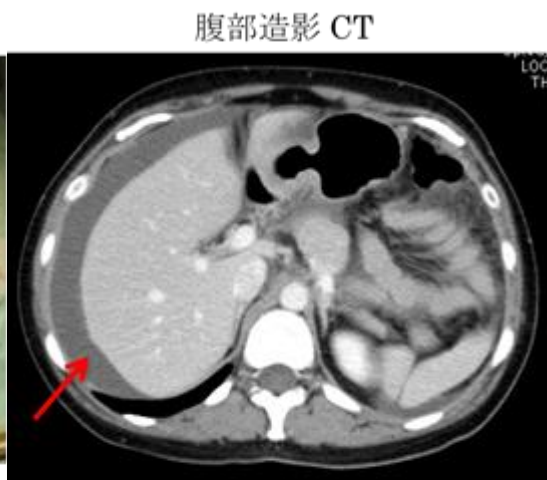
著明な腹部膨満



虫垂粘液産生腫瘍の穿孔



5000cc の粘液性腹水



Scalloping sign (ホタテの殻状変化) を軽度認め、粘液の存在を示唆

1.4 病理組織像

PMP は、病理学的に細胞学的異型と構造学的変化から何種類かのグループに分けられ、複数の研究者が異なる分類法を提唱している。1995 年に Ronnett らが、109 例の PMP 症例を 3 つのグループに分けた。Disseminated peritoneal adenomucinosis (DPAM)、Peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA)、Peritoneal mucinous carcinomatosis with intermediate or “discordant” feature (PMCA-I/D) の 3 通りで、DPAM は関連する虫垂腫瘍の有無に関わらず低異型度上皮細胞を含む多量の粘液貯留による腹膜病変、PMCA は虫垂粘液癌の有無に関わらず高度な細胞異型と構造変化を呈する上皮細胞を含む粘液大量貯留状態、PMCA-I/D は一部高悪性度の上皮細胞を呈する DPAM (DPAM と PMCA が混在している状態) と定義されている。そして、DPAM、PMCA、PMCA-I/D それぞれの割合は 69%、13%、18%であると報告されている(8)。一方 Misraji らは、2003 年に 107 例を 3 つのグループに分け、low-grade appendiceal mucinous neoplasm (LAMN)、mucinous adenocarcinomas (MACAs)、discordant の 3 つに分類し、それぞれ 82%、15%、3%であったと報告している(9)。Bradley らは 2006 年に 101 例の PMP を low grade mucinous carcinoma peritonei (MCP-L) (n=58)、high grade mucinous carcinoma peritonei (MCP-H) (n=43) の 2 つのグループに分け、それぞれ 58%、43%であったと報告している(10)。この Bradley らの分類では、Ronnett らの DPAM と singet

ring cell を認めない PMCA-I を MCP-L に分類し、MCP-H には PMCA と signet ring cell を認める PMCA-I を含んでいる。これらの分類は高悪性度群をどのよう
にわけるとにより定義が異なるが、基本的に低悪性度群と高悪性度群がある
という点で一致をみており、低悪性度群の分類は同じである。すなわち、核腫大
(nucleomegaly)、核重層化(nuclear stratification)、少核分裂像(rare mitotic figures)、
個細胞壊死(single cell necrosis)などの細胞異型所見を示し、絨毛様増殖(villiform
proliferation)、低乳頭状増殖(small papillary excrescences)の構造異型を呈するも
のを低悪性度群と診断されている。一方 高悪性度群は、間質浸潤・高細胞異型・
高構造異型の特徴を持つ群で、細胞異型では核重層化が目立ち(extensive full-
thickness nuclear stratification)、核クロマチン繊細(vesicular nuclei)、核形不整
(marked nuclear membrane irregularities)、核小体明瞭化(prominent nucleoli)、頻
核分裂像(brisk mitotic activity)などの所見を呈し、構造異型は複雑乳頭状増殖
(complex papillary fronds)、篩状構造(cribriform glandular spaces)などの所見を
呈する(図 2)。

これらの組織学的分類は PMP 患者の予後と関連していると報告されており、
5年生存率は Ronnett らの分類では DPAM: 68%、PMCA: 3%、PMCA-I/D: 21% (11)、
Misraji らの分類では LAMN: 86%、MACA: 44%、discordant: 33%で(9)、Bradley
らでは MCP-L: 62.5%、MCP-H: 37.7%であった(10)。これらの報告に示される通

り、組織学的分類が予後予測に有用であるが、高悪性度群の組織学的分類についてはまだ議論の残るところである。

本研究では Ronnett の分類を用いて評価している。今回のサンプルにおいては DPAM と PMCA のみで PMCA-I/D に該当する症例は含まれていなかった。

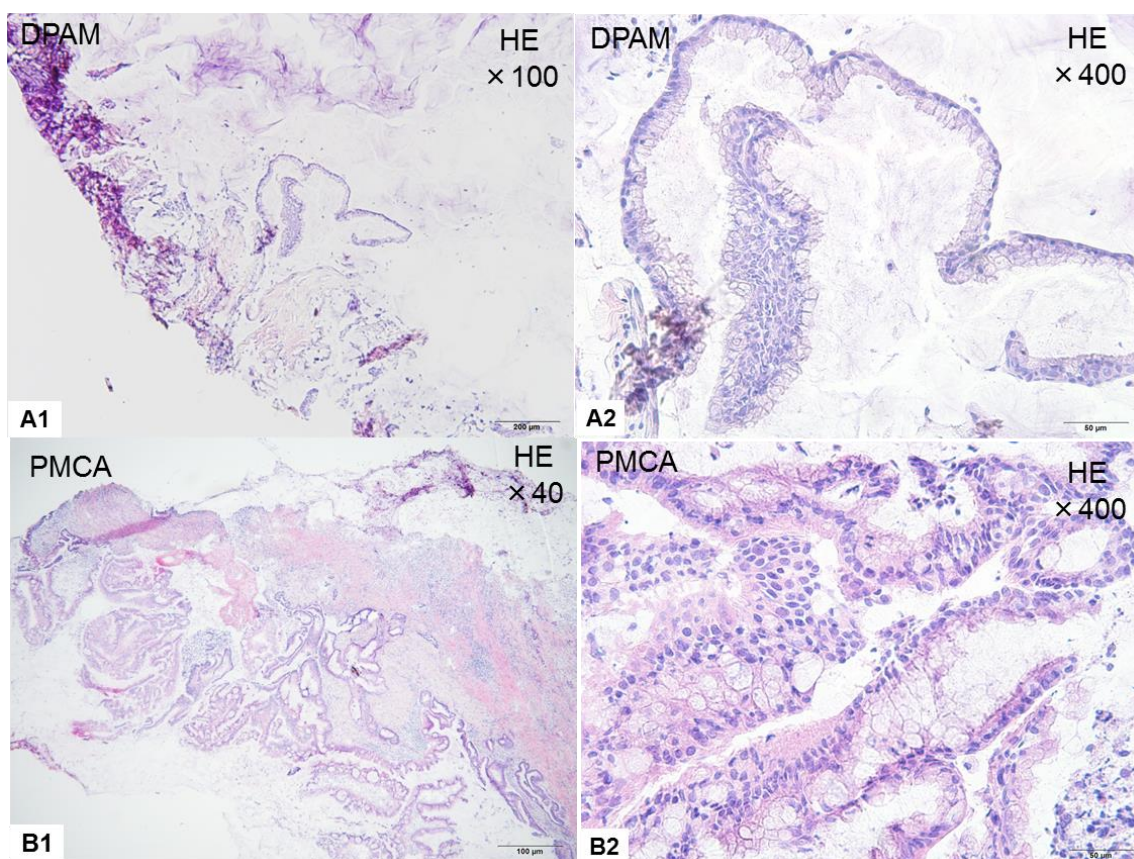


図2 PMPの組織像

A: DPAMの組織像。A1: 100倍拡大。A2: 400倍拡大。多房性嚢胞状の病変。内腔に多量の粘液が貯留している。嚢胞内腔は粘液を有する一層の円柱上皮に裏装されている。B: PMCAの組織像。B1: 40倍拡大。B2: 400倍拡大。多量の粘液を産生する円柱上皮様腫瘍細胞が乳頭状、腺管形成や篩状腺腔形成を示す。核の偽重層、核腫大、極性の喪失と間質浸潤を認める。

1.5 次世代シーケンサー

DNA シーケンスは DNA 内の核酸の配列を正確に決定する方法である。ここ 10 数年で DNA シーケンスの使用は世界中で研究や臨床において容易に用いることができるため、指数関数的に増加している。DNA シーケンスの初めてのプロジェクトとして Human Genome Project があり、これは 300 億円という莫大な資金と 13 年という時間を経て 2003 年に終了した。この Human Genome Project は第一次シーケンスである Sanger シーケンス法を用いて行われた。Sanger シーケンス法は 1975 年に Edward Sanger により発明され、DNA シーケンスの gold standard として確立され、現在も研究において頻繁に用いられている(12)。

この Human Genome Project が終わってから、安価で速くシーケンスできる方法への要求が非常に高まった。この要求こそ、第二世代シーケンシングもしくは次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing、NGS) の開発へと導いた。1990 年代中期から後期においていくつかの新しい DNA シーケンス法が開発され、2000 年に商業ベースの DNA シーケンサーが発売された。最初の NGS の原理は ”massively parallel signature sequencing” といい、ランダムに切断された数千万の DNA 断片の塩基配列を同時並行的に決定する方法であった。こ

れをもとに沢山の会社が様々な種類の次世代シーケンサーを開発販売している。

今回、我々が用いたのは ThermoFisher SCIENTIFIC の Ion Torrent Sequencing である。シーケンスはイオン半導体シーケンスを用いており、半導体チップにライブラリーをローディングし、DNA の polymerization の間に放出される水素イオンの検出に基づいてシーケンスをしている(13)。また本研究で Ion AmpliSeq Cancer Hotspot panel v2 という 50 がん関連遺伝子の 2300 個の hotspot をカバーした primer set を用いた。このパネルは 10ng という微量の DNA を用いて library 作成ができ、今回の対象疾患である PMP のように腫瘍細胞が粘液の中に浮遊し、他の固形がんと比較しても、マイクロダイセクションを用いて、腫瘍細胞のみを DNA 抽出を行うことが難しい場合に非常に有用である。

1.6 分子生物学的特徴

これまでにいくつかのグループが PMP の分子生物学的特徴を報告している。
KRAS 変異が高頻度で認められ (69-100%) (14-16)、Shetty らの報告では LG-PMP: 60% (15/25)、HG-PMP: 56.4% (22/39) と有意差は認められなかった(17)。

がんの発生において遺伝子解析により発がんメカニズム研究が進んでおり、代表的なものとして大腸がんの adenoma-carcinoma sequence がある(18)。これは *APC*、*KRAS*、*DCC*、*p53* などの遺伝子が順次異常を起こす結果、正常粘膜から段階的にがんが発生・進展していくというものである。大腸がんでは *KRAS* 遺伝子の変異が 40-50% 関与していると報告されている(19-21)。*KRAS* 遺伝子は v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog としても知られ、H-ras、N-ras、K-ras の ras がん遺伝子のひとつで、EGFR (上皮成長因子受容体) が出す細胞増殖のシグナルを核に伝達し、細胞増殖を進める機能を持つと考えられる。大腸がん同様に PMP においても遺伝子解析が行われている。大腸がんでは認められた *KRAS* 遺伝子は oncogene で PMP でも Szych らが 17 例の PMP のうち 17 例全て (100%) (15)、Zauber らは low grade PMP 31 例のうち 31 例全症例 (100%) (14)、Kabbani らは high grade PMP 16 例のうち 8 例 (50%) において変異を認めたと報告がある (22)。これらの報告からも大腸がんに比べて PMP は *KRAS* 変異が高頻度で認められ、*KRAS* が PMP の発がんに関わることがわかる。

GNAS (Guanine nucleotide-binding protein, α -stimulating) は細胞内シグナル伝達に関わる G タンパク質の 1 種をコードする遺伝子である。*GNAS* は intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN、膵管内乳頭粘液腫瘍) (23)や大腸における絨毛腺腫 (24)において高頻度に変異を認めている。*PMP* においても 2 疾患と共通する、著しい粘液産生能と病理学的に絨毛形成が共通する特徴を有していることから、Nishikawa らは *PMP* において *GNAS* 遺伝子についてシーケンス解析を行い、遺伝子変異を同定した(25)。彼らの報告では low grade *PMP* 32 例中 16 例 (50%) に変異を認めたものの、high grade *PMP* 3 例においては変異を認められなかった。Sio らも次世代シーケンサーを用いた 236 がん関連遺伝子のアンプリコンシーケンスを行い、low grade *PMP* 10 例中 4 例に *GNAS* 変異を認めた (40%) (26)。これらは COSMIC データベース(v74)の大腸がん (85/2220、3.8%) と比較すると明らかに頻度が高く、*PMP* が大腸がんとは異なる分子生物学的特徴を有することと、*PMP* の発がんメカニズムにおいて強く関連していることが示唆される。

がんの中でも最も高頻度に見られる遺伝子異常として *TP53* がん抑制遺伝子がある。*PMP* においても *P53* のタンパクレベルの発現について報告が多数ある。*P53* 発現について Kabbani らは 16 例の low grade *PMP* 症例において免疫組織化学染色で評価を行い、発現亢進の症例は認められなかった。一方、Shetty らも同

様に免疫組織化学染色で p53 の評価を行い、low grade PMP 104 例中 37 例 (35.5%)、high grade PMP 90 例中 49 例 (54.5%) (p=0.009) で有意に high grade PMP で p53 発現亢進を認めた。また Nummela からも 42 例の low grade PMP 中 3 例 (7.1%)、32 例の high grade PMP 中 10 例 (31.3%) で p53 亢進を認め、p53 が high grade において有意に発現が増加することを認めた。遺伝子レベルでは Sio らのデータでは 10 例の low grade PMP では TP53 において遺伝子変異を認めず、Nummela らのデータでも同様に 9 例の low grade PMP では TP53 変異を認めなかった。しかし、10 例の high grade PMP においては 1 例 TP53 変異を同定した(10%)。これらより低頻度であるものの high grade PMP 症例において TP53 変異があることが判明した。

近年次世代シーケンサーの登場により包括的に多数の遺伝子変異のシーケンスを行い、遺伝子変異の同定が革新的に進歩している。PMP での次世代シーケンサーを用いた包括的シーケンスが行われているが、いまだ症例数が少ない。また日本人の PMP の遺伝子解析は Nishikawa らにより行われているが、まだ報告が少ない。病態のメカニズムの詳細は不明なところも多い。

1.7 治療

腹膜偽粘液腫の治療として以前は粘液貯留による症状を緩和するために、繰り返しゼリーを除去する姑息的治療を行っていたが、いずれも長期的生存は望めず完治することはなかった。Gough らは、1957 年から 1983 年の間に連続する姑息治療と腹腔内放射線療法もしくは腹腔内化学療法が施行された 56 例の low grade PMP の 10 年生存率が 32%であったと報告した(27)。Nitecki らは high grade PMP で手術を施行した患者の 5 年生存率は 6%であったと報告している(28)。

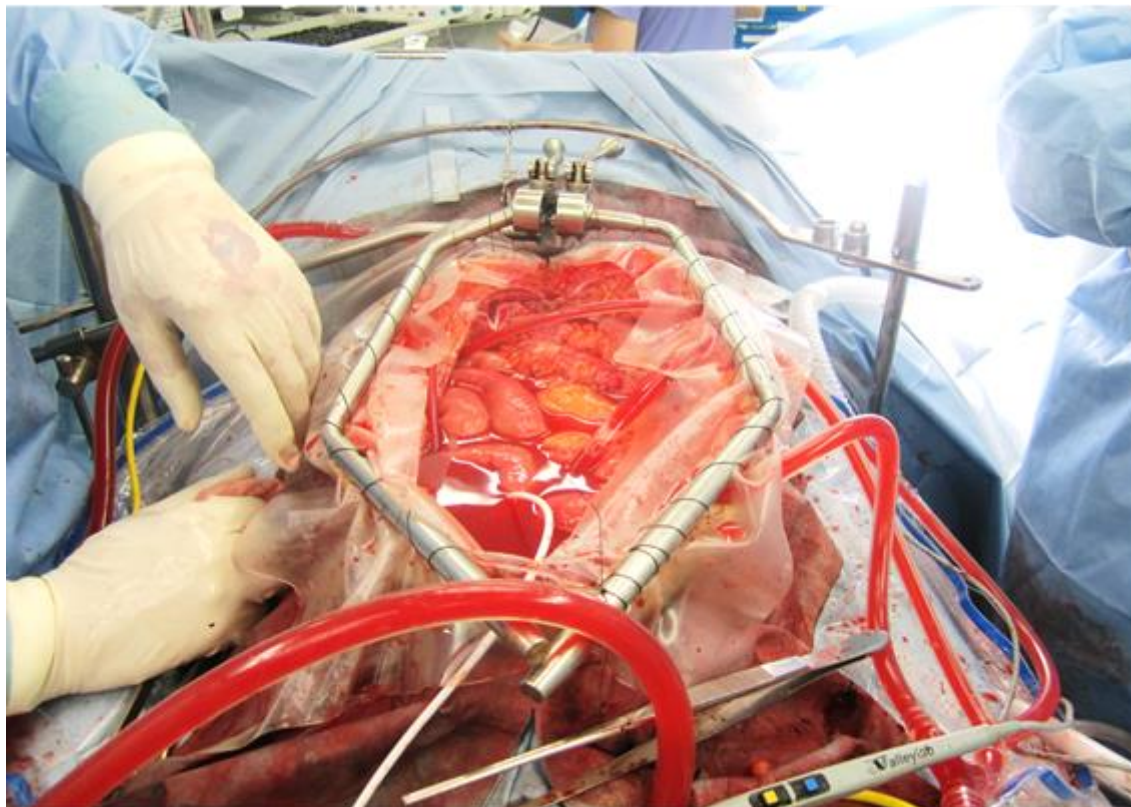
1990 年代に入り、肉眼的に腫瘍をできる限り除去する完全減量切除術 (cytoreductive surgery: CRS) と腹腔内に直接抗がん剤を投与する hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) と、early postoperative intraperitoneal chemotherapy (EPIC) という周術期腹腔内化学療法の複合治療が Sugarbaker らにより提唱された(29) (図 3)。彼らの報告によると、CRS+腹腔内化学療法による 385 例の PMP の 5 年生存率は、low grade PMP で 86%、high grade PMP では 50%であった。一方、CRS ができなかった場合の 5 年生存率は 20%、10 年生存は 0%であった(30)。

CRS+腹腔内化学療法により、PMP の予後は改善されたものの、CRS は合併症も多いため、実施できる術者、専門施設が少ないという問題がある。また CRS

が不可能であった症例、再発を繰り返す患者に対する効果的な化学療法が存在せず、今後の開発が必要である。

図 3 : PMP の治療

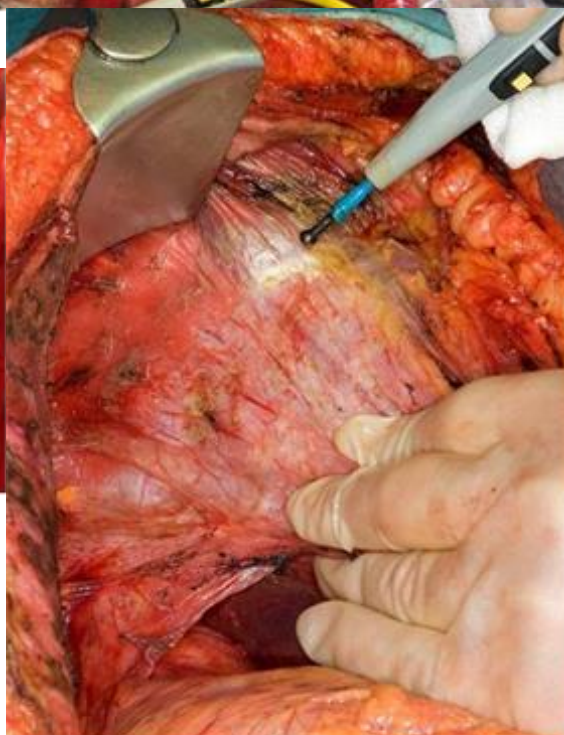
術中所見



術中腹腔内温熱化学療法



両側横隔膜下腹膜切除、肝被膜切除、
大網切除、脾摘終了後



右横隔膜下腹膜切除

1.8 本研究の目的

PMP は 100 万人に 1-2 人と稀少疾患であるため、多数の症例を対象とした遺伝子解析が行われておらず、その発症・進展メカニズムについては十分解明されていない。また、PMP は著しい粘液産生により放射線治療・化学療法に対して治療抵抗性を示し、術前化学療法は予後を不良にさせるという報告があり(31)、全身化学療法は確立されていない。現在は CRS+HIPEC+EPIC 治療により予後は改善されたが、いまだ CRS 不可能な PMP 症例や再発した PMP についての治療が確立していない。そのため、PMP の臨床病理学的特徴および分子生物学的特徴を明らかにすることは、PMP に対する分子標的治療薬の開発のためにも必須である。

本研究は、PMP の発生・進展のメカニズムを明らかにすることにより、難治性の PMP に対する新たな治療薬の開発やバイオマーカーの発見などに貢献することを目的としている。そのために、low grade PMP ・ high grade PMP 合わせて計 18 例の日本人 PMP 症例を対象として、50 がん関連遺伝子からなる遺伝子パネルを用いたアンプリコンシーケンスを行い、両群の PMP の遺伝子変異の特徴を明らかにすることを試みた。

2 研究方法

2.1 対象症例

国立国際医療研究センター病院下部消化管外科において、2012年1月1日から2014年12月31日の期間に外科的切除手術が行われたPMP全18例を対象とした。これらの患者から手術切除標本から腫瘍部組織と非腫瘍部組織（正常部大腸・または回腸粘膜組織）を採取した。組織はOCTコンパウンドで包埋した後に、-80°C超低温冷凍庫に保存した。PMPの診断はWHO分類に基づいて行われた(9)。18例中12例においては、原発である虫垂腫瘍を解析対象としたが、残りの6例については以前の手術により原発腫瘍が切除されていたため、転移巣を解析対象とした。コントロールとしては、同一患者の非腫瘍部組織を用いた。検体は国立国際医療センター病院にて連結可能匿名化したうえで、医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野の担当者に渡された。本研究は、東京大学医科学研究所および国立国際医療研究センターの倫理委員会の承認を得て行われた（審査番号: IMSUT-IRB #26-67、NCGM-A-000780）。患者には文書を用いて研究内容を説明し、書面で同意を得た。

2.2 臨床データ

患者の年齢、性別、既往歴やこれまでの治療歴、病歴、検査所見、治療内容、病理学的所見、予後などの臨床情報は、国立国際医療センター病院から入手した。

全症例中、12例で完全減量切除術（CRS: cytoreductive surgery）、5例で姑息的減量切除術（Debulking operation）、1例で試験開腹手術が施行された。術中化学療法は、CRSが行われた12症例と姑息的減量切除術症例中2症例に対して、腹腔内温熱化学療法（HIPEC: hyperthermic intraperitoneal chemotherapy）が行われた。用いられた抗がん剤はマイトマイシンC（10 mg/m²）で、41-42°C温熱療法との併用で施行された。術後化学療法はHIPECが実施された12 CRS症例のうち7例に対して、術後4日間腹腔内にフルオロウラシル（15 mg/kg）を投与する術後早期腹腔化学療法（EPIC: early postoperative intraperitoneal chemotherapy）が行われた。残存病変についてはCCR score（the completeness of cytoreduction score）を用いて評価した(32)。すなわち、CCR0では肉眼的残存病変はなし、CCR1では直径2.5 mm以上の残存病変がない状態、CCR2では直径2.5 mm-2.5 cmの結節病変を認める状態、CCR3は直径2.5 cm以上の結節が残存している状態を示す。病理学的検討が行われ、Ronnettらの提唱したPMPの分類を用いて、10例がDPAM、8例がPMCAと診断された(8)。

再発は画像診断に基づき、**PMP** と判断される新たな病変が見つかった場合に診断された。少なくとも二つの検査法により再発を確認している。生存期間は手術日から死亡日までの期間、無再発生存期間は、再発がある場合は手術日から再発日、再発がない場合は最終経過観察日までの期間と定義した。

2.3 アンプリコンシーケンス

2.3.1 DNA 抽出

腫瘍組織からの DNA 抽出は、マイクロダイセクション法を用いて行った。腫瘍組織の OCT 包埋凍結標本から 10 μm 厚で切片作製を行い、4%ホルマリンで 10 分間固定した。5 分間洗浄後ヘマトキシリン染色を行い、LMD 7000 (Leica) を用いてレーザーマイクロダイセクション法により腫瘍細胞を選択的に回収した。非腫瘍部組織の OCT 包埋凍結標本から 10 μm 厚で切片作製し、マイクロダイセクションを行わず、細胞を回収した。回収した細胞から、QIAamp DNA formalin-fixed, paraffin-embedded tissue kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。DNA 濃度測定には e-SPECT (Malcom) と Qubit2 fluorometer (Invitrogen) を使用した。抽出した DNA は-20°C で保存した。

2.3.2 アンブリコンシーケンス

シーケンスは Ion AmpliSeq Cancer Panel v2 (Life Technologies) を用いて行った。本パネルは、がんに関連する 50 遺伝子 207 領域をカバーするプライマーセットからなっている (表 1)。同社のプロトコールに従い、DNA 10 ng をテンプレートとして multiplex PCR によりライブラリーを作成した。続いて the OneTouch system を用いてライブラリーを濃縮・精製した後、300-500 Mb の throughput が得られる 316 チップにロードし、the Ion PGM™ System (Life Technologies) でシーケンスを行った。ヒトゲノム標準配列は GRCh37/hg19 をリファレンスとした。

表 1 Ion AmpliSeq Cancer Panel v2 の 50 がん関連遺伝子

遺伝子名	
<i>ABL1</i>	<i>IDH2</i>
<i>AKT1</i>	<i>JAK2</i>
<i>ALK</i>	<i>JAK3</i>
<i>APC</i>	<i>KDR</i>
<i>ATM</i>	<i>KIT</i>
<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>
<i>CDH1</i>	<i>MET</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>MLH1</i>
<i>CBF1R</i>	<i>MPL</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>NOTCH1</i>
<i>EGFR</i>	<i>NPM1</i>
<i>ERBB2</i>	<i>NRAS</i>
<i>ERBB4</i>	<i>PDGFRA</i>
<i>EZH2</i>	<i>PIK3CA</i>
<i>FBXW7</i>	<i>PTEN</i>
<i>FGFR1</i>	<i>PTPN11</i>
<i>FGFR2</i>	<i>RB1</i>
<i>FGFR3</i>	<i>RET</i>
<i>FLT3</i>	<i>SMAD4</i>
<i>GNA11</i>	<i>SMARCB1</i>
<i>GNAQ</i>	<i>SMO</i>
<i>GNAS</i>	<i>SRC</i>
<i>HNF1A</i>	<i>STK11</i>
<i>HRAS</i>	<i>TP53</i>
<i>IDH1</i>	<i>VHL</i>

2.3.3 遺伝子変異データ解析

シーケンスデータ解析は、Torrent Suite™ software (Life Technologies) に内蔵されている Variant Caller™ と Cloud system の Ion Reporter™ (Life Technologies) を用いて行った。遺伝子変異は下記の方法で同定した (図 4)。コールされた variant の中から、SNV については variant frequency が 2%以下のもの、indel については 5%以下の variant は除外した。腫瘍組織と非腫瘍組織ともにシーケンスの depth が 50 回以上の領域の variant の中から、非腫瘍部になく腫瘍部のみに認められる variant および、腫瘍部と非腫瘍部ともに variant が認められる場合には、Fisher's exact test で p 値が 0.01 以下を示す variant も体細胞変異とした。全ての体細胞変異は、Integrative Genomic Viewer (IGV、Broad Institute、USA) を用いてデータを可視化して確認した。ホモポリマー領域に存在する variant はシーケンスエラーとして除外した。

体細胞変異はその存在部位により、intron、splice site、exon の 3 グループに分類した。exon 領域の変異については、indels、nonsense mutation、synonymous mutation、non-synonymous mutation に分類した。病的意義 (pathological significance) については、以下のデータベースを用いて検討した。

- ClinVar <www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
- COSMIC <cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

- Human Gene Mutation Database (HGMD)

<<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/mut>>

- TP53 Database <p53.iarc.fr/TP53GeneVariations.aspx>

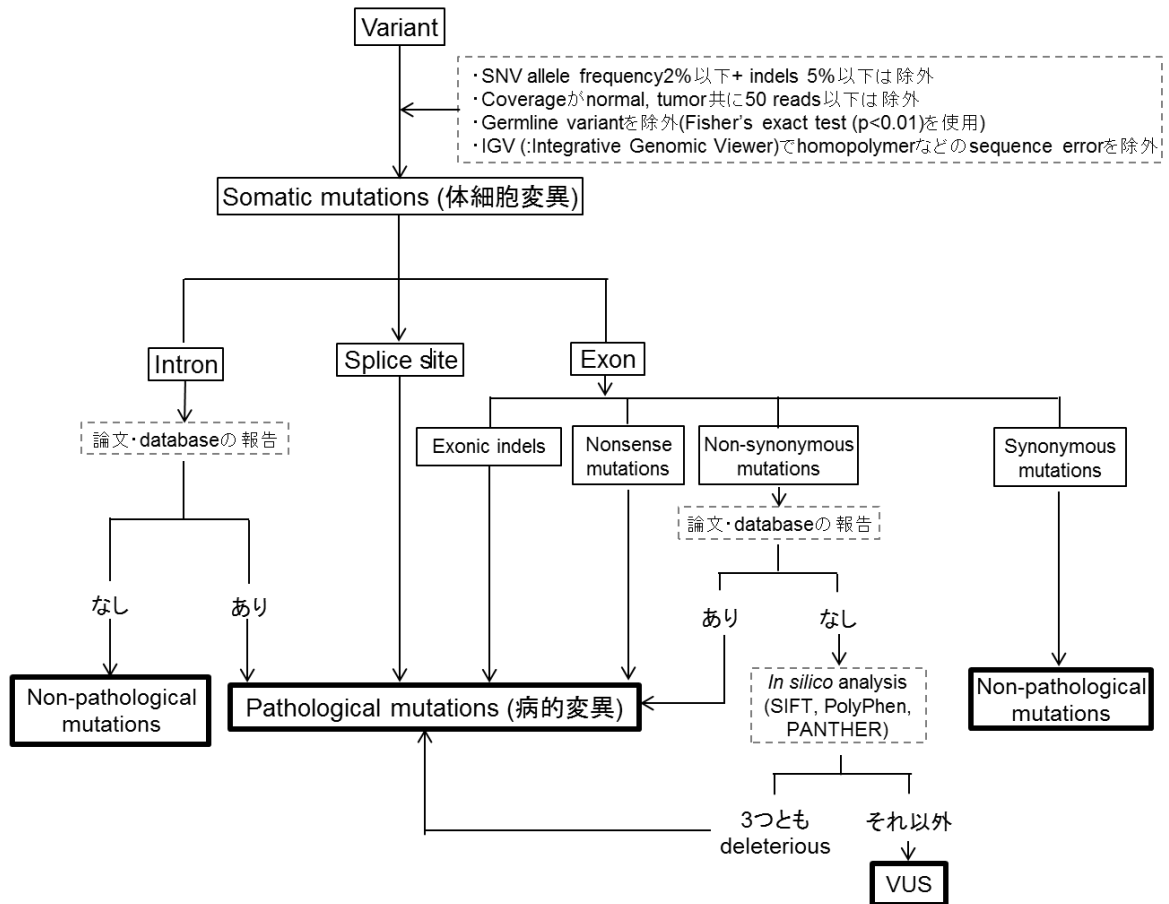
- dbSNP <www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp-ref.cgi>

- Human Genetic Variation Database (HGVD) in Kyoto University

<www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>

文献的な検索により発がんについて報告がある遺伝子変異と、ClinVar、COSMIC、ONCOMINE、HGMD、TP53 Database で病的変異と判定されている遺伝子変異、さらに nonsense mutation、splice site mutation、exonic indels は病的変異とした。これらの基準で判定できなかった missense mutation は、SIFT、PolyPhen、PANTHER の3つの *in silico* 解析を用いて機能への影響を評価した。これら3解析全てにおいて damaged/deleterious/pathological と判定された missense mutation は病的変異と判定した。これらで病的変異と判定されなかった missense mutation は variants of uncertain significance (VUS)、synonymous mutation は非病的変異と判定した。

図4 遺伝子変異判定のwork flow



2.4 免疫組織化学染色

パラフィン固定の組織ブロックから 5 μm 厚の切片を作成し、HE 染色と免疫組織化学染色を行った。

免疫組織化学染色は以下のプロトコールで行った。pH 6 クエン酸バッファー中で 118°C 10 分間のオートクレーブ処理を行い、抗原を賦活化した。ヤギ血清 Histofine SAB-PO (R) Kit (Nichirei, Tokyo, JAPAN) を用いて 1 時間ブロッキングを行い、一次抗体には抗 TP53 抗体 (DO-1, sc-126, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, U.S.A, 1:200) を用い、4°C で一晩反応させた。内因性ペルオキシダーゼ不活性化後 (H_2O_2 3%、10 分)、二次抗体は Dako ChemMate Envision kit/HRP, mouse/rabbit (Dako, Glostrup, Denmark) を使用し室温で 60 分反応させた。その後、Impact DAB 基質キット (K3466, VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, U.S.A) を用いてペルオキシダーゼ法による発色を行った。

染色の判定は TP53 の評価した論文をもとに一部修正して評価した(33, 34)。すなわち染色強度とその割合を評価し、normal、negative、excessive の 3 段階にスコアリングした。Negative は腫瘍細胞の核が全く染色されていない状態、Excessive は染色された腫瘍細胞が腫瘍細胞全体の 50%以上で、核が正常上皮よりも濃染される状態、Normal は Negative にも Excessive にもあてはまらない場

合、つまり染色された腫瘍細胞が腫瘍細胞全体の 50%以下で、核が正常上皮と比べて弱く染色される状態とした。

2.5 統計解析

関連解析の検定には Fisher's exact test を用いた。遺伝子変異の同定については $P < 0.01$ を有意差ありとした。

3 結果

3.1 患者背景

解析対象とした 18 例の PMP 患者の臨床病理学的情報を表 2 に示した。全て虫垂原発の PMP で、5 例はすでに前医で切除が行われていたため、転移巣を解析対象とした。初回手術が行われた 13 症例からは原発巣組織が得られたが、1 例は原発巣の腫瘍成分が少なかったため転移巣を解析した。組織学的な検討は Ronnett らの基準を参考にして行った(35)。その結果、low grade に相当する DPAM 10 例 (55.6%)、high grade に相当する PMCA は 8 例 (44.4%) であった。それぞれの特徴的な組織学的所見を図 2 に示す。印環細胞はムチンプールの中ではない腫瘍細胞を対象として、頻度と関係なく有無を検討したが、印環細胞はいずれの症例において認められなかった。患者の平均年齢は 65 歳 (31-82 歳)、男女ともに 9 人ずつであった。DPAM と PMCA 間で性別・年齢に有意差は認められなかった。治療は CRS+HIPEC が 5 人 (27.8%)、CRS+HIPEC+EPIC が 7 人 (38.9%)、debulking のみが 3 人 (16.7%)、debulking+HIPEC が 2 人 (11.1%)、exploratory laparotomy が 1 人 (5.6%) であった。CCR score については 0 が 5 人 (27.8%)、1 が 7 人 (38.9%)、2 が 6 人 (33.3%) であった。DPAM では 0 が 2 人 (20%)、1 が 4 人 (40%)、2 が 4 人 (40%)、PMCA では 0 が 3 人 (37.5%)、1 が 3 人 (37.5%)、2 が 2 人 (25%) で、2 群間で CCR score に有意差は認められなかつ

た (Wilcoxon 検定、 $p = 0.422$)。予後については再発が 2 人 (11.1%)、死亡が 4 人 (22.2%)、その他全員の 12 人 (66.7%) が生存であった。DPAM、PMCA ともに再発は 1 人、死亡は 2 人であり、Follow-up 期間が平均で 15 か月 (1-37 か月) と短いため、DPAM、PMCA2 群間での統計学的検討はできなかった。

表2 患者情報

患者番号	年齢	性別	手術歴	治療内容*	CCR**	予後	Follow-up (月)	組織学的分類***
1	51	女性	-	CRS + HIPEC	1	生存(再発+)	37	DPAM
2	82	男性	-	Debulking + HIPEC	2	死亡	14	DPAM
3	74	女性	-	CRS + HIPEC	0	生存	25	DPAM
4	77	女性	-	CRS + HIPEC	0	生存	24	DPAM
5	57	男性	-	Debulking	2	死亡	18	DPAM
6	31	女性	+	Exploratory laparotomy	2	生存	1	DPAM
7	76	男性	+	CRS + HIPEC	1	生存	5	DPAM
8	67	男性	+	CRS + HIPEC + EPIC	1	生存	18	DPAM
9	72	男性	-	Debulking + HIPEC	2	生存	16	DPAM
10	70	男性	-	CRS + HIPEC + EPIC	1	生存	12	DPAM
11	71	男性	-	CRS + HIPEC	1	死亡	31	PMCA
12	70	女性	-	CRS + HIPEC + EPIC	1	生存(再発+)	12	PMCA
13	47	女性	+	CRS + HIPEC + EPIC	1	死亡	8	PMCA
14	76	女性	-	Debulking	2	生存	13	PMCA
15	65	男性	+	Debulking	2	生存	12	PMCA
16	55	男性	-	CRS + HIPEC + EPIC	0	生存	11	PMCA
17	60	女性	-	CRS + HIPEC + EPIC	0	生存	9	PMCA
18	61	女性	-	CRS + HIPEC + EPIC	0	生存	10	PMCA

* CRS: cytoreductive surgery, 完全減量切除術, Debulking: 姑息的減量切除術, HIPEC: hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, 術中腹腔内温熱化学療法, EPIC: early post-operative intraperitoneal chemotherapy, 術後早期腹腔内化学療法

** CCR: completeness of cytoreduction

*** DPAM: disseminated peritoneal adenomucinosis, 播種性腹膜粘液腺腫症, PMCA: peritoneal mucinous carcinomatosis, 腹膜粘液性癌腫症

3.2 アンプリコンシーケンス解析

3.2.1 腹膜偽粘液腫における体細胞変異の同定

18 症例の PMP 患者の腫瘍組織と非腫瘍組織から抽出した DNA を用いて、multiplex PCR によるアンプリコンシーケンスを行った。Multiplex PCR は Ion AmpliSeq Cancer Panel v2 を用いて、50 遺伝子 207 領域を解析対象とした。1 サンプルあたりの throughput は約 22 Mb (表 3)、領域の数は 207 個で、各領域の平均 depth は 951 reads であった。そのうちの 203 領域 (98.3%) で depth が 100 read 以上であり、全領域で最低でも 20 reads はカバーされていた。シーケンスデータは Variant Caller と Ion Reporter を用いて変異解析を行った。その結果、体細胞変異の候補となる 62 個の variant がコールされた (表 4)。しかし、62 個のうち 24 個の variant は非腫瘍組織においても検出されていたため、統計学的解析を行ったが腫瘍組織と非腫瘍組織間で有意差がなく、これら 24 個の variant はミスコールとして除外された (表 5)。残る 38 個のバリエントの全てについて Integrative Genomics Viewer (IGV) (<https://www.broadinstitute.org/igv>) を用いて確認したところ、3 個の variant がホモポリマー内に位置し、シーケンスエラーである可能性が高いことが示された。残る 35 個の variant は、IGV から体細胞変異であることが確認された。これらの体細胞変異は 17 症例に認められ、変異を認めない症例は 1 例のみであった。35 個の体細胞変異はすべて exon 内に位置

し、33 個が non-synonymous mutation、1 個が deletion、1 個が insertion であった。

最も高頻度に変異が認められた遺伝子は *KRAS* で 18 症例中 14 例 (77.8%)、次は *GNAS* で 18 例中 8 例 (44.4%)、続いて *TP53* が 4 例 (22.2%)、*SMAD4* が 3 例 (16.7%)、残りが *AKT1*、*NRAS*、*PIK3CA*、*PDGFRA*、*RET*、*VHL* の各 1 例 (5.6%) ずつであった (表 6)。

KRAS の変異は、本 Panel の解析対象領域内の hot spot のうち codon 12 と codon 13 のみに、14 症例で missense mutation (p.G12D、p.G12V、p.G12S、p.G13D) が同定された (表 7)。*GNAS* の codon 201 に認められた変異はいずれも missense mutation で、全 8 個の変異のうち p.R201H が 6 個、p.R201C が 2 個であった。

これらの変異は腫瘍における体細胞変異を集めた Sanger 研究所の COSMIC データベースに登録されており、病的変異としてよく知られている変異である。

TP53 に認められた 4 変異 (p.R175H、p.G227R、p.P250L、p.R273C) はいずれも DNA-binding domain に位置する missense mutation で、IRAC のデータベースなどで病的変異と報告されている。*SMAD4* の 3 変異は、1 種類の insertion (c.1587dupA、p.L529LfsX48) と、1 種類の deletion (c.553_556delCCAC、p.P185QfsX16)、1 種類の missense mutation (p.C499R) である。Insertion (c.1587dupA、p.L529LfsX48) は、frame shift を起こして下流の 48 番目のアミノ酸に stop codon を生じ、deletion (c.553_556delCCAC、p.P185QfsX16) も frame shift を起こし 16

番目のアミノ酸で stop codon を生ずるため、いずれの変異も正常な SMAD4 タンパク質の機能異常を引き起こすことが予想された。また Insetionc.1587dupA, p.L529LfsX48 は HGMD に 1 例報告があり、Juvenile polyposis で同定されていた (Hattem *et al.*) (36)。これらの情報より c.1587dupA (p.L529LfsX48) と c.553_556delCCAC (p.P185QfsX16) は病的変異と判断した。p.C499R の missense mutation は、SMAD4 の病的変異の大多数が存在する MAD homology 2-domain (MH2) 内に存在し、COSMIC データベース (v74) に 2 例の報告があり、1 例は大腸がんで (Fleming N *et al.*) (37)、もう一例は PMP であった (Alakus *et al.*) (38)。また PolyPhen、SIFT、PANTHER の 3 種類の *in silico* 解析を行った結果、PolyPhen で probably damaging (score: 0.965)、SIFT で deleterious (score: 0)、PANTHER でも deleterious (subPSEC: -4.45、P_{deterious}: 0.810) と、全てで病的変異という解析結果で、機能変化が強く疑われた。これらの情報から p.C499R を病的変異と判定した。

PIK3CA の missense mutation (c.3127A>G、 p.M1043V) は、COSMIC データベース (v74) に 50 報の報告があり、病的変異と同定されている。AKT1 の missense mutation (c.49G>A、 p.E17K) は、COSMIC データベース(v74)にホットスポットとして登録され、296 報の報告があり、病的変異として同定されている。

また PDGFRA の missense mutation (c.1658C>T、 p.P553L) は、COSMIC デー

データベース (v74) に 1 例の報告があり、同症例は胃がん組織であった (Kai *et al.*) (39)。SMAD4 同様に 3 種類の tool を用いて *in silico* 解析を行い、PolyPhen で probably damaging (score: 1)、SIFT で deleterious (score: 0)、PANTHER でも deleterious (subPSEC: -6.28、P_{deterious}: 0.96) と全ての tool で病的意義が疑われた。これらの情報から、p.P553L も病的変異と判定した。NRAS 変異は 1 例に missense mutation (p.Q61K) を認め、この症例は KRAS 変異を有さない PMCA 症例であった。VHL については 1 例に missense mutation (c.430G>A、p.G144R) を同定した。この変異は COSMIC データベース (v74) において 1 例の報告があり、同症例は子宮内膜がん (reference なし) であった。HGMD では病的変異として報告され、2 報の報告があり、いずれも polycythemia (多血症) と erythrocytosis (赤血球増加症) の血液疾患であった (MLRandi *et al.*(40)、Bento *et al.*(41))。RET については 1 例で missense mutation (c.2651A>T、p.E884V) を認めた。COSMIC データベース (v74) で 1 例報告があり、胸腺がんであった (Hu Z *et al.* (42))。以上も含め、35 個の体細胞変異は全て病的変異と判断した

表3 シークエンスサマリー

Throughput(per 1 sample)	22Mb
average amplicon length	111bp
Total amplicon number	207 amplicons
Total aligned base reads	21,784,841
Total base reads on target	19,533,248
Percent base reads on target(%)	89.3
Average base coverage depth	886.8
Target base coverage at 1x(%)	100
Target base coverage at 20x(%)	99.8
Target base coverage at 100x(%)	97.9
Target base coverage at 500x(%)	65.4

表4 Variant analysis サマリー

Location	Type of alteration	Filtered out by Fisher*	Sequence errors**	Somatic mutations	Total variants
Exon	Missense	7	0	33	40
	Synonymous	7	0	0	7
	Nonsense	0	0	0	0
	deletion	0	3	1	4
	Insertion	0	0	1	1
Intron	Non-splice site	9	0	0	9
	Splice site	1	0	0	1
Total		24	3	35	62

表 5-1 Variant analysis

ID	Chr	Position	Gene	Location	Amino acid	Coding	p-value	IGV	Judge
12011	7	55249063	EGFR	exonic	p.Q742Q	c.2226G>A	0.687	両方	除外
12011	3	10188287	VHL	exonic	p.G144R	c.430G>A	1.466E-05	-	-
12011	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12N	c.35G>A	2.300E-07	-	-
12011	18	48581248	SMAD4	exonic	p.P185Q	c.553_556delCCAC	4.021e-22	-	-
12011	17	7578397	TP53	exonic	p.H178T	c.532_532delC	0.110	Homopolymer	除外
12019	17	7578397	TP53	exonic	p.H178T	c.532_532delC	0.895	Homopolymer	除外
12019	14	105246551	AKT1	exonic	p.E17K	c.49G>A	0.001	-	-
12020	10	43615572	RET	exonic	p.E884V	c.2651A>T	4.691E-05	-	-
12020	12	25398285	KRAS	exonic	p.G12S	c.34G>A	5.039E-34	-	-
13002	4	55980239	KDR	intron	-	c.798+54G>A	0.738	両方	除外
13002	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12D	c.35G>A	3.505E-37	-	-
13002	20	57484420	GNAS	exonic	p.R201C	c.601C>T	3.148E-38	-	-
13002	5	112176035	APC	exonic	p.A1582T	c.4744G>A	0.074	両方	除外
13005	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12V	c.35G>T	1.477E-14	-	-
13005	17	7579473	TP53	exonic	p.P72A	c.214C>G	5.4291E-05	両方	除外
13006	4	55980239	KDR	intron	-	c.798+54G>A	0.142	両方	除外
13013	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12V	c.35G>T	2.01963E-51	-	-
13013	17	7578397	TP53	exonic	p.H178T	c.532_532delC	0.325918	Homopolymer	除外
13014	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12D	c.35G>A	5.734E-242	-	-
13014	17	7577121	TP53	exonic	p.R273C	c.817C>T	1.538E-171	-	-
13014	18	48603034	SMAD4	exonic	p.R445R	c.1335A>G	0.0267	両方	除外
13014	5	112176035	APC	exonic	p.A1582T	c.4744G>A	0.177	両方	除外
13015	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12D	c.35G>A	7.18069E-12	-	-
13015	20	57484421	GNAS	exonic	p.R201H	c.602G>A	2.92603E-07	-	-
13016	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12V	c.35G>T	5.62434E-18	-	-
13016	20	57484421	GNAS	exonic	p.R201H	c.602G>A	9.52079E-08	-	-

表5-2 variant analysis

ID	Chr	Position	Gene	Location	Amino acid	Coding	p-value	IGV	Judge
14002	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12V	c.35G>T	1.768e-55	-	-
14002	17	7579473	TP53	exonic	p.P72A	c.214C>G	0.55	両方	除外
14002	18	48604764	SMAD4	exonic	p.H530T	c.1586_1587insA	2.626e-36	-	-
14002	20	57484420	GNAS	exonic	p.R201C	c.601C>T	1.759e-14	-	-
14002	3	10183852	VHL	exonic	p.R107R	c.321C>A	1	両方	除外
14003	3	178952072	PIK3CA	exonic	p.M1043V	c.3127A>G	3.475e-59	-	-
14003	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12V	c.35G>T	3.116e-33	-	-
14004	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12D	c.35G>A	1.209e-19	-	-
14004	18	48604673	SMAD4	exonic	p.C499R	c.1495T>C	2.35e-19	-	-
14004	20	57484421	GNAS	exonic	p.R201H	c.602G>A	8.603e-05	-	-
14005	20	57484421	GNAS	exonic	p.R201H	c.602G>A	0.01	-	-
14005	10	43609067	RET	exonic	p.T608S	c.1823C>G	0.375	両方	除外
14010	4	55141012	PDGFRA	exonic	p.P553L	c.1658C>T	5.53e-29	-	-
14010	18	48603034	SMAD4	exonic	p.R445R	c.1335A>G	0.182	両方	除外
14010	20	57484421	GNAS	exonic	p.R844H	c.2531G>A	2.60e-56	-	-
14010	4	55962546	KDR	intronic	-	c.2615-37_2615-36insC	0.96	両方	除外
14010	12	25398281	KRAS	exonic	p.G12V	c.34G>A	9.72e-121	-	-
14013	3	10183852	VHL	exonic	p.R107R	c.321C>A	1	両方	除外
14013	4	55980241	KDR	intronic	-	c.798+52C>A	0.454	両方	除外
14013	18	48603034	SMAD4	exonic	p.R445R	c.1335A>G	0.515	両方	除外
14013	20	57484421	GNAS	exonic	p.R844H	c.2531G>A	1.47e-21	-	-
14013	4	55962546	KDR	intronic	-	c.2615-37_2615-36insC	1	両方	除外
14013	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12V	c.35G>T	9.39e-62	-	-
14014	4	55980241	KDR	intronic	-	.798+52C>A	0.4098	両方	除外
14014	17	7577142	TP53	exonic	p.G227R	c.679G>C	8.413e-14	-	-
14014	17	7577528	TP53	exonic	p.P211L	c.632C>T	0.368	両方	除外
14014	12	25398284	KRAS	exonic	p.G12D	c.35G>A	1.02e-75	-	-

表5-3 variant analysis

ID	Chr	Position	Gene	Location	Amino acid	Coding	p-value	IGV	Judge
14014	17	7577532	TP53	exonic	p.P250L	c.749C>T	5.924e-48	-	-
14016	1	115256528	NRAS	exonic	p.Q61K	c.181C>A	3.125e-184	-	-
14016	4	55980241	KDR	intronic	-	c.798+52C>A	0.0679	両方	除外
14016	5	112176035	APC	exonic	p.A1582T	c.4744G>A	0.2885	両方	除外
14016	11	108200916	ATM	intronic	-	c.7308-24T>G	0.0246	両方	除外
14016	17	7578368	TP53	splice site	-	c.559+3G>T	0.639	両方	除外
14016	4	1806187	FGFR3	exonic	p.P404P	c.1212C>A	0.502	両方	除外
14016	4	55980239	KDR	intron	-	c.798+54G>A	0.0003	両方	除外
14016	17	7578406	TP53	exonic	p.R175H	c.524G>A	2.035e-219	-	-

表 6 変異遺伝子

Gene name	Number (n=35)	frequency (%) (n=18)
<i>KRAS</i>	14	77.8
<i>GNAS</i>	8	44.4
<i>TP53</i>	4	22.2
<i>SMAD4</i>	3	16.7
<i>PDGFRA</i>	1	5.6
<i>PIK3CA</i>	1	5.6
<i>RET</i>	1	5.6
<i>VHL</i>	1	5.6
<i>AKT1</i>	1	5.6
<i>NRAS</i>	1	5.6

表7 病的変異遺伝子リスト

Gene	Nucleotide	Amino acid	Type of mutation	Evidence*	No of cases
KRAS	c.34G>A	p.G12S	Missense	CSMC	1
	c.35G>A	p.G12D	Missense	CSMC	6
	c.35G>T	p.G12V	Missense	CSMC	6
	c.38G>A	p.G13D	Missense	CSMC	1
GNAS	c.601C>T	p.R201C	Missense	CSMC	2
	c.602G>A	p.R201H	Missense	CSMC	6
TP53	c.524G>A	p.R175H	Missense	CSMC, IARC	1
	c.749C>T	p.P250L	Missense	CSMC, IARC	1
	c.796G>C	p.G266R	Missense	CSMC, IARC	1
	c.817C>T	p.R273C	Missense	CSMC, IARC	1
SMAD4	c.553_556delCCAC	p.P185QfsX16	Deletion	INDEL	1
	c.1587dupA	p.L529LfsX48	Insertion	INDEL	1
	c.1495T>C	p.C499R	Missense	CSMC, IS	1
AKT1	c.49G>A	p.E17K	Missense	CSMC	1
NRAS	c.181C>A	p.Q61K	Missense	CSMC	1
PDGFRA	c.1658C>T	p.P553L	Missense	IS	1
PIK3CA	c.3127A>G	p.M1043V	Missense	CSMC, IS	1
RET	c.2651A>T	p.E884V	Missense	CSMC, IS	1
VHL	c.430G>A	p.G144R	Missense	CSMC	1

*pathological significanceの根拠は変異タイプがDeletion, insertion, nonsense mutation (INDEL)の場合、もしくはデータベースTP53 Database in International Agency for Research on Cancer (IARC), COSMIC (CSMC)で報告がある場合、またはin silico (IS) analysesで3種類全種が病的変異と判断した場合にpathological mutationsと判定した。

3.2.2 DPAM と PMCA 間での遺伝子変異の比較

次に 10 症例の DPAM と 8 症例の PMCA で遺伝子変異の比較を行った (表 8)。

KRAS 変異は、DPAM 10 症例中 8 例 (80%)、PMCA 8 症例中 6 例 (75%) で変異を認め、2 つのグループの間に有意差はなかった。したがって RAS family の活性化が DPAM と PMCA の両方の腫瘍形成に関与していることが示された。

GNAS についても DPAM 10 症例中 5 例 (50%)、PMCA 8 症例中 3 例 (37.5%) に変異を認め、2 つのグループの間に有意差は認められなかった。頻度は *KRAS* に比べて低いものの、*KRAS* と同様に *GNAS* も DPAM と PMCA の両方の腫瘍形成に関与していることが示唆された。

TP53 については、DPAM 10 症例に変異を認めず、PMCA 8 症例中 3 例 (37.5%) で変異を認めた。これらより *TP53* の異常は PMP の悪性化に関与することが示唆された。*PIK3CA*、*AKT1*、*PDGFRA* の異常はいずれも 1 症例ずつであるが、すべて PMCA で、DPAM に変異を認められなかった。一方 *SMAD4* の変異は、DPAM 2 症例、PMCA 1 症例の両グループに認められた。興味深いことは、*TP53*、*PIK3CA*、*AKT1*、*PDGFRA*、*SMAD4* の変異はいずれも同一症例に重複せず相互排他的であった。

表8 遺伝子変異とp53免疫組織化学染色

組織分類	DPAM										PMCA							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8
サンプルID																		
KRAS	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き	色付き
GNAS			色付き				色付き	色付き	色付き	色付き				色付き	色付き	色付き		
TP53											赤色	赤色					赤色	赤色
PIK3CA													黄色					
AKT1											黄色							
SMAD4														紫色				
NRAS																		緑色
PDGFRA															茶色			
RET																		
VHL	藍色																	
p53											赤色						赤色	赤色

*変異遺伝子:色付き:病的変異が同定された;白:病的変異が同定されなかった

**IHC: 赤色 = p53陽性

3.3 p53 免疫組織化学染色と TP53 遺伝子変異

PMP における TP53 の遺伝子異常をタンパク質レベルでも検討するために、パラフィン切片を用いて p53 の免疫組織化学染色を行った (図 5)。その結果、18 症例中 3 例で腫瘍細胞の核内に p53 タンパク質の異常蓄積を認めた (表 8)。この 3 症例は PMCA で、全て TP53 の遺伝子異常を認めた症例であった。その他の PMCA 症例や DPAM 症例に、p53 タンパク質の異常蓄積は認められなかった。

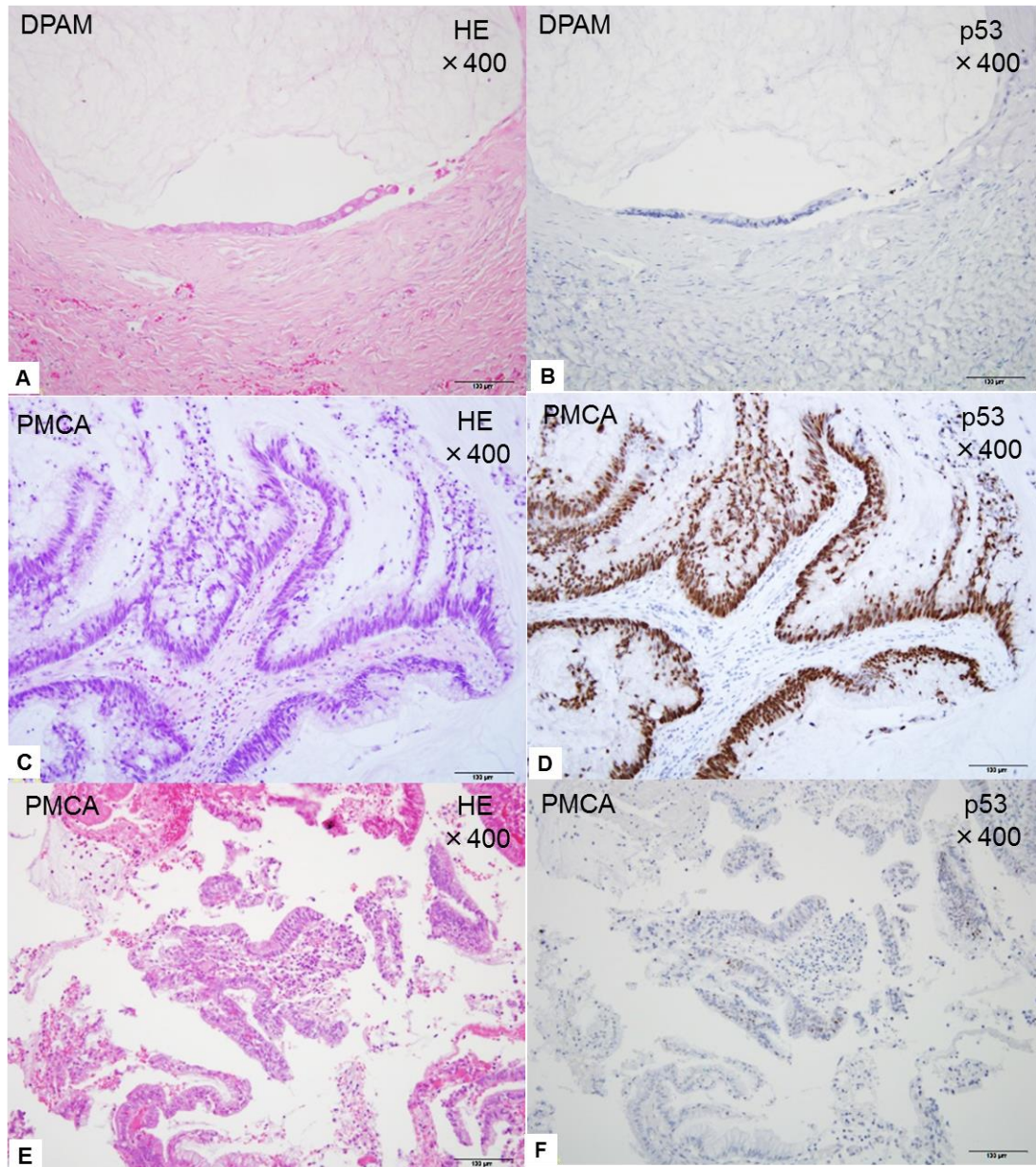


図 5 PMP の組織像と p53 免疫組織化学染色

A: DPAM の HE 染色。C, E: PMCA の HE 染色。B: DPAM の p53 免疫組織化学染色。D, F: PMCA の p53 の免疫組織化学染色。A, B: 同一検体。C, D: 同一検体。E, F: 同一検体。B: 核陽性像が見られない。D: びまん性に核陽性像が認められる。F: 核陽性像がまばらに認められる。

4 考察

4.1 KRAS

本研究では、*KRAS* 変異を解析した 18 症例中 14 例 (77.8%) に認めた。この頻度はこれまでの多くの報告 (58-94%) とほぼ同等であった(17, 25, 26, 43)。大腸がんにおける *KRAS* 変異の頻度は 40% であることから、PMP の *KRAS* 変異の頻度は大腸がん比べて著しく高い。また *KRAS* 変異を有さない症例を 4 例認めたが、このうち 1 症例で *NRAS* 変異を同定した。すなわち、18 症例中少なくとも 15 例で RAS-MAPK パスウェイの活性化が認められ、このことは、RAS-MAPK パスウェイの活性化が DPAM と PMCA の両群の発がんにおいて重要な役割を担っていることを示している。また RAS-MAPK パスウェイを標的とした抗がん剤が、PMP の治療の根本的戦略になる可能性を示唆している。変異を認めなかった残り 3 症例については、今回解析した対象遺伝子・対象領域に含まれていない RAS-MAPK pathway 関連遺伝子に変異を有している可能性が残されている。

Shetty らは、DPAM で 25 症例中 15 例 (60%)、PMCA では 39 症例中 22 例 (56.4%)、Nishikawa らは、DPAM で 32 症例中 30 症例 (93.8%)、PMCA では 3 症例中全例 (100%) と 2 群間で *KRAS* 変異の頻度に有意差を認めなかった(17, 25)。本研究においても、DPAM 10 症例中 8 例 (80%)、PMCA 8 症例中 6 例 (75%)

と 2 群で変異頻度に有意差を認めず、これまで研究者たちの結果に一致していた。

4.2 GNAS

本研究における PMP の GNAS 変異は 18 症例中 8 例(44.4%)に認め、Nishikawa らは 35 症例中 16 例 (45.7%)、Sio らは 10 症例中 4 例 (40%)、Liu らは 8 症例中 3 例 (37.5%) に認め、これらの報告とほぼ同等の頻度であった(25, 26, 43)。

DPAM と PMCA 群での GNAS 変異頻度については 2 群間での差の有無については意見が分かれている。Nishikawa らの報告では DPAM32 例中 16 例 (50%) で GNAS 変異を検出したが、PMCA3 例には変異を認めず、GNAS の異常は DPAM に特異的であった(25)。一方、Nummela らは、DPAM9 例中 5 例 (55.6%)、PMCA10 例中 7 例 (70%) に変異を認め、2 群間に有意差は認められなかった (33)。我々の解析では DPAM 10 症例中 5 例(50%)、PMCA 8 症例中 3 例(37.5%) で DPAM、PMCA とともに GNAS 変異を認め、後者と同様に 2 群間で頻度の有意差はなかった。この結果は、GNAS 変異が DPAM・PMCA 両群の PMP に関与していることを示している。また PMCA が DPAM から悪性化する可能性を残すものである。

GNAS 遺伝子は stimulatory G 蛋白の α -subunit をコードしており、ホットスポットである codon 201 における R201C・R201H の missense mutation が adenylyl

cyclase の活性を増加させる(44, 45)。GNAS の遺伝子変異は、膵腫瘍、大腸絨毛腺腫、胆管腺腫、胃腺腫など複数の腫瘍で報告されている(23, 24, 46, 47)。中でも膵臓に発生する IPMN では GNAS 変異の頻度が高いことが多数報告されている(23)。PMP も IPMN も粘液分泌が腫瘍の特徴の一つであり、これらの腫瘍で MUC2、MUC5AC、MUC5B の発現が上昇していることが免疫組織化学染色を用いた実験を通して報告されている(25, 48, 49)。GNAS が MUC2 や MUC5AC の発現を制御することが報告されており(25)、これらの報告から GNAS の活性化が PMP の粘液産生を誘発しているものと考えられる。しかしながら PMP の中には GNAS 遺伝子のホットスポットに変異のないものもあり、今後の研究が必要である。がん認めらる GNAS のホットスポットの変異は、cyclin AMP (cAMP) の活性化を通じて protein kinase A (PKA) pathway の活性化することが知られている(38)。また GNAS 変異が MUC2・MUC5AC の発現を増加させるが、その発現は細胞増殖には関係しないことが *in vivo*・*in vitro* 解析にて明らかにされている(25)。

4.3 TP53

我々の解析では、PMCA 8 例中 3 症例に TP53 変異を認めたが、DPAM 10 例には認められなかった。免疫組織化学染色でも、TP53 変異を有する 3 症例に、核における p53 の強発現を認めた。これらの結果は TP53 の異常が PMP の悪性化に関与することを示唆している。PMP における TP53 変異については、これまで次世代シーケンサーを用いた 2 つのグループが報告している。Nummela らは PMCA 10 症例のうち 1 症例 (10%) (33) で、Liu らは DPAM 8 症例中 2 症例 (25%) で TP53 変異を認めたと報告しており (43)、我々の結果と一致してその遺伝子変異の頻度は低いものであった。しかし PMP の p53 免疫組織化学染色による解析では、Shetty らは PMP で 44.3% に p53 に高発現を認めている。しかも DPAM では 43%、PMCA では 57% であった (17)。Nummela らは DPAM では 42 症例中 2 例 (4.8%)、PMCA では 32 症例中 8 例 (25%) であった (33)。これらの結果は TP53 の異常が、悪性化に寄与していることを支持するものである。さらに免疫組織化学染色での TP53 の蓄積が、PMP 悪性化のバイオマーカーとして有効であることを示唆している。

4.4 PI3K-AKT pathway

本研究にて、18 症例中 1 例ずつ (5.6%) で *PIK3CA* と *AKT1* 変異を PMCA のみで同定した。またこれらの変異を認めた症例では *TP53* 変異は認められなかった。次世代シーケンサーを用いた Nummela らの報告では 10 例の PMCA 中 1 例 *AKT1* 変異を認め (10%)、また 9 例の DPAM 中 1 例 *PIK3CA* 変異を認めた (33)。PI3K-AKT pathway はアポトーシス、血管形成、浸潤、細胞増殖、糖代謝などの多くの細胞機能において重要なはたらきをしていることが知られている (50)。大腸では、前がん病変の腺腫では *PIK3CA* の体細胞変異の頻度は低いが、大腸がんでは 14-32%の頻度で *PIK3CA* の体細胞変異を有することがいくつかのグループから報告されている(50),(51)。この報告は PI3K-AKT pathway の活性化が大腸がん進展への過程に寄与していることを意味しており、本研究で PMCA のみに異常が見つかったことは、PI3K-AKT pathway の活性化が PMP の進行に関与していることを支持している。*PIK3CA* 変異は AKT のリン酸化や mTOR complex 1 (mTORC1) の活性化を通して、下流シグナルを活性化している。そのため、PI3K、AKT、mTORC1 の阻害は *PIK3CA* 変異や *AKT1* 変異を有する PMP の有効的な治療戦略と考えられる。

4.5 新規遺伝子変異

本研究で我々は、*PDGFRA* に c.1658C>T (p.P553L) というこれまでに文献やデータベースで報告のない変異を同定した。がんにおける *PDGFRA* の異常のホットスポットとしては、exon18 の the tyrosine kinase 2-domain 内に存在する p.D842V や、exon12 の the juxtamembrane domain 内の p.D561V が知られている。今回の新規変異 p.P553L は、ホットスポットの p.D561V と同じ jaxtamembrane domain に位置すること、3 種類の *in silico* 解析全てで機能異常が予測されたため、p.P553L を病的変異と判定した。*PDGFRA* の遺伝子変異は、大腸がんで 6.0%、胃がんで 2.6% (COSMIC database v71) の他、消化管間質腫瘍: gastrointestinal stromal tumors (GIST) で 10% と報告されている(52)。 *PDGFRA* 変異のほとんどはキナーゼ活性を活性化し、下流分子の活性化を誘導する。そのため、*PDGFRA* 変異を有する腫瘍は、キナーゼ活性阻害薬である Imatinib による治療は有効であることが示されており、GIST の治療においても Imatinib が使用されている(53),(54)。したがって、*PDGFRA* p.P553L 変異を有する PMP 患者も Imatinib の治療が有効である可能性が考えられる。

4.6 予後

今回解析した 18 例の中で、PMCA 8 例の中で死亡例は 2 例、再発例 1 例、一方 DPAM 10 例の中にも死亡者例は 2 例、再発例 1 例であった。本研究では、PMP 患者の平均観察期間が 15 か月（1 ヶ月～37 ヶ月）と比較的短く、症例数が 18 例と少ないため、予後について有効な解析は行えなかった。最近の報告では、DPAM、PMCA の分類だけでなく、signet ring cell（印環細胞）の存在する腫瘍は予後が悪いことが示されている(55) (56)。JM Davison、Sirintrapun、Shetty らは PMP の 17.9%～52.7%に signet ring cell が認められると報告しているが(55) (56) (57)、本研究で解析した 18 症例中に signet ring cell は認められず、その存在と予後との関係も検討できなかった。今後観察期間を延長するとともに、症例数を増やして検討することが必要である。

5 結論

本研究では日本人 PMP 18 例について、がん関連 50 遺伝子のアンプリコンシーケンスを行い、遺伝子変異プロファイルを明らかにした。その結果、RAS family 遺伝子の異常と GNAS 遺伝子の変異を DPAM と PMCA とともに高頻度で認め、これらの遺伝子の異常が PMP に共通して関与することを明らかにした。また TP53 と PI3K-AKT pathway に関連する遺伝子の変異は PMCA のみで認め、これらの遺伝子変異が PMP の組織学的な悪性化に関与するということが示唆された。これらの結果は、PMP の発生・進展メカニズムを理解する上で有用であり、今後の治療法開発やバイオマーカーの検討にも役立つものと期待される。

第二章 免疫組織化学染色を用いた腹膜偽粘液腫細胞の特性に関する検討

要旨

本研究では、PMP 腫瘍細胞の由来を理解するため、goblet cell に特異的な TFF3 と enterocyte に特異的な SLC26A3 を用い、免疫組織化学染色を行った。PMP の 94.1%は TFF3 陽性で、23.5%は TFF3 と SLC26A3 とともに発現していた。つまり PMP はほぼ全例で goblet cell へ分化を示し、また一部の PMP は goblet cell と enterocyte 両方の分化を示すことが明らかとなった。これらの結果は、PMP が goblet cell への分化する細胞、または goblet cell と enterocyte 両方に分化する細胞が腫瘍化したか、あるいは腫瘍細胞が goblet cell または goblet cell と enterocyte 両方に分化誘導されている可能性を示している。

1 背景と目的

1.1 gene expression profile による大腸がん分類

近年、マイクロアレイや RNA sequencing による網羅的な gene expression profiling により、多くのがんで分子生物学的分類が報告されている(58-63)。大腸がんにおいても、2013年に Sadanandam らが 1290 例の大腸がんの gene expression profile データをもとにした 6 つの subclass を提唱している(64)。彼らのデータでは、大腸がんは大腸粘膜上皮を構成する異なる細胞群に特異的に発現する遺伝子群により分類できることがわかり、1) goblet-like、2) enterocyte、3) stem-like、4) inflammatory、5) transit-amplifying (TA) と命名された。更に qRT-PCR と免疫組織化学染色法による validation を行うとともに、各グループの予後や薬剤感受性などの特徴も提示している。さらに彼らは、大腸がんの gene expression profile をもとに subclass を提唱している他の 5 つの研究グループと共同で、約 4000 人の大腸がん患者の gene expression profile を解析し、新たな 4 つの subtype、consensus molecular subtypes (CMS) 1~4 を提唱した(65)。この 4 つの subtypeのうち CMS 1 は microsatellite instability が unstable で、かつ多くの遺伝子変異を有する hypermutated type で、免疫系を強く活性化する microsatellite instability immune type である。CMS2 は WNT signal pathway と MYC signal pathway が著しく活性化している canonical type、CMS3 は代謝経路に関わる変化が著しい metabolic type、

CMS 4 は TGF- β が活性化し、間質浸潤や血管形成に關与する gene expression profile が變化している mesenchymal type であった。また大腸がんのうち CMS1 は 14%を占め、CMS2 は 37%、CMS3 は 13%、CMS4 は 23%を占めていたと報告している。加えてこれら 1 つに分類することができない mixed type が 13%あることが判明した。この分類をもとに大腸がんを分類し、今後治療開発・予後予測・病態解明・個別化医療に役立つものと期待されている。

1.2 腹膜偽粘液腫の expression profile

PMPにおける遺伝子発現の多くの報告はPMPの原発臓器を調べるために、抗体を用いた免疫組織化学染色である。抗体としてCK (Cytokeratin) 7 や、CK (Cytokeratin) 20、CDX-2を用いた免疫組織化学染色によるタンパク質発現解析が行われてきた(48, 49, 66, 67)。例えばCK7は卵巣原発の腫瘍で陽性に反応し(68-70)、消化管がん原発では陰性である。一方、CK20は消化管上皮細胞で優位に発現する(70-72)し、CDX-2は腸上皮の分化と増殖に関係し、大腸がんや十二指腸がんが発現が増加することが知られている(73)。したがって腸管由来のPMPの場合、CK7は陰性で、CK-20・CDX-2が陽性であり、卵巣由来のPMPはCK-7が陽性でCK-20・CDX-2が陰性である(48, 66, 67)。他には、PMPにおいて粘液産生に関連するタンパク質であるMUC2の発現上昇が多数報告されている(49, 74-76)。MUC2は上皮細胞の表面を覆うことにより体内のホメオスターシスを保っている高分子糖蛋白の「ムチン」の1種である。またMUC2の発現は、膵臓に発生する膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)においても発現が高いことが報告されている(77)。

PMPの網羅的なgene expression profileについてはRobertsらの報告1報のみである。彼らは4例のPMPサンプル(原発巣1例、転移巣3例)のgene expression

profile を exon array を用いて解析し、SLC16A4 などの発現増加遺伝子群 27 種と、MS4A12 などの発現減少遺伝子群 34 種を報告している (78)。

1.3 本研究の目的

本研究は、PMP の発生・病態のメカニズムを明らかにすることにより、難治性の PMP に対する新たな治療薬の開発やバイオマーカーの発見などに貢献することを目的としている。そのために、DPAM・PMCA を含む計 17 例の PMP 症例と 20 例の一般大腸がん (colorectal cancer : CRC) 症例を対象として、免疫組織化学染色法を用いて大腸がんの分類に役立つ分子の TFF3 と SLC26A3 のタンパク発現解析を行い、PMP の発生や分化の特徴を明らかにすることを試みた。

2 研究方法

2.1 対象症例

第一章で解析を行った 18 例の虫垂原発 PMP のうち 1 例はパラフィン切片が得られなかったため、17 例の PMP を対象とした。また比較のために、20 例の CRC も検討した。PMP は、国立国際医療研究センター病院下部消化管外科において、2012 年 1 月 1 日から 2014 年 12 月 31 日の期間に外科的切除手術が行われた虫垂原発の PMP 症例で、切除組織から得られた原発巣を対象としたのは 11 例、転移巣を対象としたのは 6 例である。CRC については東京日立病院外科において、1998 年 1 月 1 日から 2001 年 12 月 31 日の期間に外科的に切除された 20 例で、いずれも原発巣を対象とした。これら計 37 例の免疫組織化学染色を行った。本研究は、東京大学医科学研究所、国立国際医療研究センター、東京日立病院の倫理委員会の承認を得て行われた。患者には文書を用いて研究内容を説明し、書面で同意を得た。

2.2 臨床データ

患者の年齢、性別、既往歴やこれまでの治療歴、病歴、検査所見、治療内容、病理学的所見、予後などの臨床情報は、国立国際医療センター病院・東京日立病院から入手した。PMP の組織学的分類は Ronnett らの提唱した分類を用いて行い、9 例が DPAM、8 例が PMCA と診断された。大腸がんについては UICC の UICC TNM staging system によって病期診断を行った。

臨床データは表 9 に記した。PMP17 例の内 low grade に相当する DPAM は 9 例 (52.9%)、high grade に相当する PMCA は 8 例 (47.1%) であった。患者の平均年齢は 67 歳 (47-82 歳)、男性は 9 人 (52.9%)、女性は 8 人 (47.1%) である。DPAM と PMCA 間で性別・年齢に有意差は認められなかった。CRC 20 例の内、組織学的に高分化腺癌が 18 例 (90%)、中分化腺癌が 2 例 (10%) であった。UICC による Stage は stage I : 6 例 (30%)、stage II : 5 例 (25%)、stage III : 8 例 (40%)、stage IV : 1 例 (5%) で、リンパ節転移が 9 例 (45%)、遠隔転移が 1 例 (5%) に認められた。腫瘍発生部位は盲腸 : 1 例 (5%)、虫垂 : 1 例 (5%)、上行結腸 : 3 例 (15%)、横行結腸 : 2 例 (10%)、S 状結腸 : 3 例 (15%)、直腸 : 8 例 (40%)、肛門 : 1 例 (5%) であった。患者の平均年齢は 67 歳 (45-84 歳)、性別は男性は 12 人 (60%)、女性は 8 人 (40%) であった。

表 9 患者情報

	CRC	PMP
患者数	20	17
年齢中間値(range)	67(45-84)	67(47-82)
性別(男性:女性)	12:8	9:8
腫瘍部位		
盲腸	1(5)	0
虫垂	2(10)	17(100)
上行結腸	3(15)	0
横行結腸	2(10)	0
下行結腸	0	0
S状結腸	3(15)	0
直腸	8(40)	0
肛門	1(5)	0
TNM staging		
I	6(30)	-
II	5(25)	-
III	8(40)	-
IV	1(5)	-
組織分化度		
Well	18(90)	-
Moderate	2(10)	-
Poor	0	-
PMP 分類		
DPAM	-	9(52.9)
PMCA	-	8(47.1)

2.3 免疫組織化学染色

パラフィン固定の組織ブロックから 5 μm 厚の切片を作成し、HE 染色と免疫組織化学染色を行った。

免疫組織化学染色は以下のプロトコールで行った。pH 6 クエン酸バッファー中でオートクレーブ処理を行い、抗原を賦活化した (TFF3 は 115°C 10 分間、SLC26A3 は 125°C 4 分間)。ヤギ血清 Histofine SAB-PO (R) Kit (Nichirei, Tokyo, JAPAN) を用いて 1 時間ブロッキングを行い、一次抗体には抗 TFF3 抗体 (monoclonal mouse, Clone#415909, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA, 1:100)、または抗 SLC26A3 抗体 (polyclonal rabbit, HPA036055, Sigma Aldrich, Life Science-Atlas Antibodies, St Louis, MO, USA, 1:200) を用いて、4°C で一晩反応させた。内因性ペルオキシダーゼ不活性化後 (TFF3 は H_2O_2 3% 10 分、SLC26A3 は H_2O_2 0.3% 10 分)、二次抗体は Dako ChemMate Envision kit の抗マウス/ウサギ HRP 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を用い室温で 30 分反応させた。その後、Impact DAB 基質キット (K3466, VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, U.S.A) を用いてペルオキシダーゼ法による発色を行った。

染色の判定は正常の大腸粘膜を positive control とし、以下の通りに行った (表 10)。評価は Park et al.らの論文に基づいて染色陽性腫瘍細胞の割合について行った(79)。染色強度は正常大腸粘膜と比較し、染色されない場合は 0 (negative)、

positive control より染色が薄い状態は 1 (weak)、positive control と同程度に染色される状態は 2 (equal)、positive control より濃染される状態は 3 (strong) とした。割合については腫瘍細胞が全く染色されていない状態 : 0、1%以下 : 1、1-10%未満 : 2、10-50%未満 : 3、50-90%未満 : 4、90%以上 : 5 とした。TFF3 については染色細胞の割合が 3 以上 (10%以上) を陽性とし、SLC26A3 については染色強度が 2 (equal) 以上を陽性とした。

表 10 免疫組織化学染色の評価法

染色強度	
スコア	意味
0	全く染色されない(negative)
1	positive control*より弱い(weak)
2	positive control と同等である(equal)
3	positive control より強い(strong)
positive control*: 正常大腸粘膜上皮細胞を示す。	
Positive = 染色強度 2 以上を示す	

染色頻度	
スコア	意味
0	全く染色されない
1	1%未満
2	1%-10%未満
3	10%-50%未満
4	50%-90%未満
5	90%以上
染色頻度 = 腫瘍細胞の中の染色陽性細胞 ÷ 腫瘍細胞	
Positive = 染色頻度 3 以上を示す	

2.4 統計解析

統計解析には JMP version8.0.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。

関連解析の検定は Fisher's exact test を使用した。免疫染色の染色度のばらつきを評価するため、Mann-Whitney-*U* test を行った。染色度のばらつきについては $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3 結果

3.1 患者背景

解析対象とした 17 例の PMP 患者と 20 例の CRC 患者の臨床病理学的情報を表 9 に示した。合計で 37 例の解析を行い、性別は男性が 21 人、女性が 16 人で、年齢は中間値で 67 歳（45 歳-84 歳）であった。性別や年齢には PMP と CRC 間で、有意差を認めなかった。

3.2 免疫組織学化学染色による発現解析

3.2.1 免疫組織学化学染色陽性率での発現解析

PMP と CRC における大腸粘膜上皮構成細胞の由来を調べるために前述した Sadanandam らの microarray データをもとに goblet cell に特異的に発現する TFF3・enterocyte に特異的に発現する SLC26A3 を用いて、パラフィン切片を用いて TFF3・SLC26A3 の免疫組織学化学染色を行った (図 6、7)。まずは免疫組織学化学染色の陽性率を検討した (表 11、表 12)。

TFF3 の発現は、正常大腸粘膜では杯細胞の細胞質に染色を認めた。正常大腸粘膜と比較して腫瘍細胞の細胞質が染色されているかを評価し、発現については前述の通り染色された腫瘍細胞の割合で評価した。CRC では 20 例中 3 例 (score 3 : 1 人 (5%)、score 4 : 0 人、score 5 : 2 人 (10%)) で TFF3 の発現を認めた (15%)。大腸の部位で見ると、右側 : 1 人 (1/8、12.5%)、左側 : 2 人 (2/12、16.7%) と部位での有意差は認められなかった。一方、PMP 17 例中 16 例 (score 3 : 5 人 (29.4%)、score 4 : 3 人 (17.6%)、score 5 : 8 人 (47.1%)) で TFF3 発現を認めた (94.1%)。この結果は、PMP では有意に TFF3 陽性症例が多いことが判明した ($p < 0.01$)。

SLC26A3 については、CRC では 20 例中 4 症例 (score 2 : 4 人 (20%)、score 3 : 0 人 (0%)) で発現を認めた (20%)。大腸の部位で見ると、右側 : 2 人 (2/8、

25%)、左側：2人(2/12、16.7%)と部位での有意差は認められなかった。PMPでは17症例中4例(score 2：4人(23.5%)、score 3：0人(0%))で発現を認めた(23.5%)。SLC26A3の陽性頻度はCRCとPMP間で有意差を認めなかった。

DPAMとPMCA間でのTFF3およびSLC26A3の発現の比較を行った(表11、13)。TFF3の発現は、DPAM9例中8例で腫瘍細胞の細胞質が染色され(88.9%)、PMCAは8症例全例においてTFF3の発現を認めた(100%)。これらからDPAMとPMCA間ではTFF3の発現頻度について有意差は認められなかった。SLC26A3については、DPAM9症例中1例で腫瘍細胞の細胞質が正常組織と同等に染色され(11.1%)、PMCAでは8症例中3例で腫瘍細胞の染色を正常組織と同等に認めた(37.5%)。DPAMとPMCA間でSLC26A3の発現に有意差を認めなかったものの($p=0.586$)、PMCAでSLC26A3の発現が高い傾向を認めた。

症例毎でのTFF3、SLC26A3の発現について検討した(表11)。CRCについてはTFF3陽性とSCL26A3陽性の合併症例は認められず、TFF3もしくはSLC26A3一方のみが陽性であった。一方、PMPについてはほぼ全例がTFF3陽性であるが、その中にSLC26A3陽性のものが4例あり、いずれもSLC26とTFF3が両方ともに発現していた。

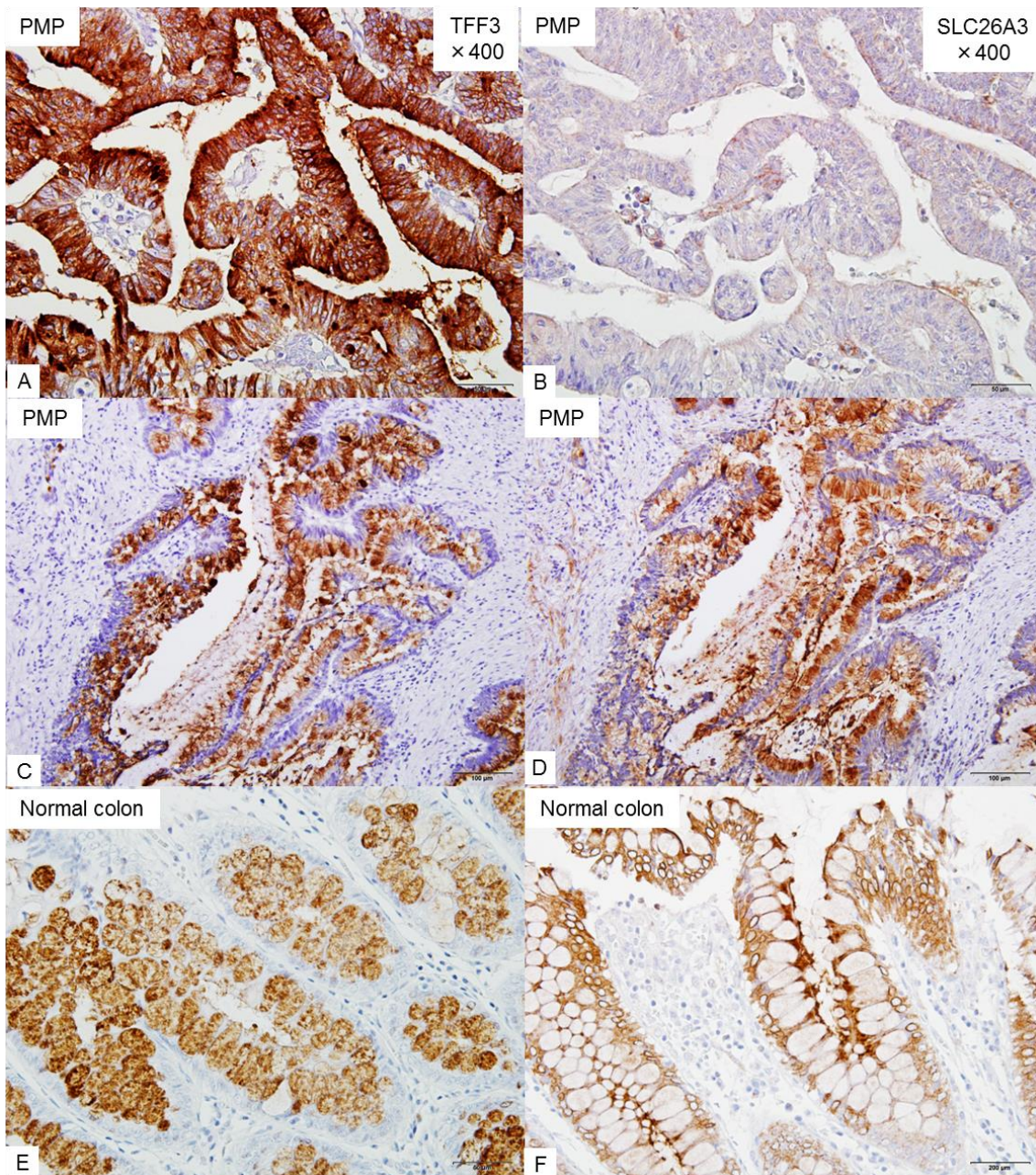


図 6 PMP の TFF3・SLC26A3 免疫組織化学染色

A,B: PMP、同部位。C,D:PMP、同部位。E,F: 正常大腸粘膜 (positive control: PC)。
 A,C,E: TFF3 免疫組織化学染色 (IHC)。A,C: 腫瘍細胞の細胞質に PC と同等に、びまん性陽性像を認める。E: 細胞質にびまん性陽性像を認める。B, D,F: SLC26A3 の IHC。A: 腫瘍細胞の細胞質に PC より弱い、びまん性陽性像が認める。D: 腫瘍細胞の細胞質に PC と同等にびまん性陽性像を認める。F: 細胞質にびまん性陽性像を認める。A-F: 400 倍拡大。

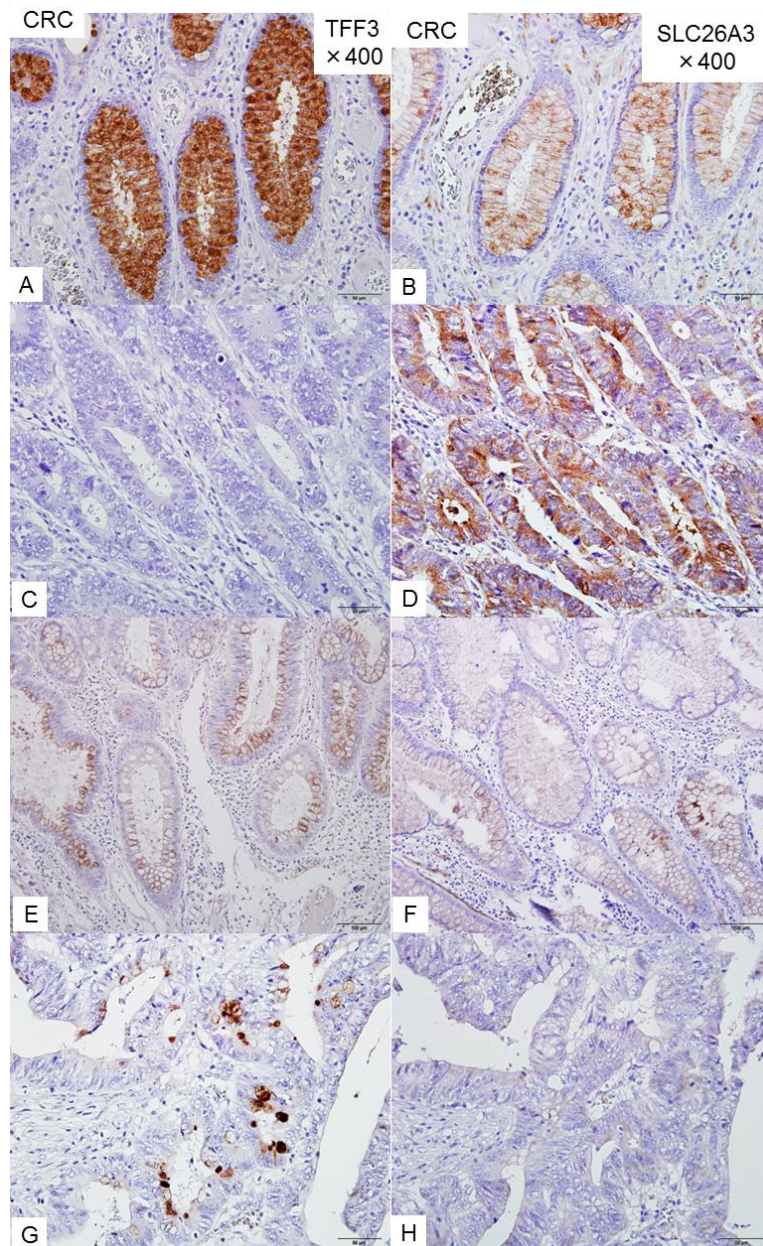


図 7 CRC の TFF3・SLC26A3 免疫組織化学染色

A,B: 同部位。C,D: 同部位。E,F 同: 部位。G,H: 同部位。A,C,E,G: TFF3 免疫組織化学染色 (IHC)。A: 腫瘍細胞の細胞質に positive control(PC)と同等に、びまん性陽性像が認められる。C: 腫瘍細胞の細胞質は染色されていない。E: 腫瘍細胞の細胞質にびまん性陽性像を認める。G: 腫瘍細胞の細胞質の 10%未満に陽性像を認める。B,D,F,H: SLC26A3 の IHC。B: 腫瘍細胞の細胞質に PC より弱い、びまん性陽性像が認められる。D: 腫瘍細胞の細胞質に PC と同等にびまん性陽性像を認める。F: 腫瘍細胞の細胞質に PC より弱い、びまん性陽性像を認める。H: 腫瘍細胞の細胞質は染色されていない。A-H: 400 倍拡大。

表11 症例毎の発現比較

CRC																				
Sample ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Colon site	L	L	L	L	R	L	R	L	L	R	R	R	L	R	L	L	R	L	L	R
SLC26A3	2	1	1	1	2	1	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1
TFF3	0	5	2	2	1	0	5	2	0	2	2	2	1	1	0	3	1	0	0	2

※Colon site: R: 右側(虫垂、盲腸、上行結腸、横行結腸を含む)、L: 左側(下行結腸、S状結腸、直腸、肛門を含む)

PMP																			
PMP subtype	DPAM										PMCA								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
Sample ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
SLC26A3	1	1	1	1	1	1	0	0	2	2	2	2	1	1	1	1	1		
TFF3	5	5	3	4	5	3	3	0	5	5	5	5	4	5	3	3	4		

※色付きセル: 発現陽性, 白色セル: 発現陰性

表 12 PMP・CRC 間での染色陽性率の比較

抗体	CRC (n=20)	PMP (n=17)	p-value
SLC26A3*	4 (20%)	4 (23.5%)	1
TFF3**	3 (15%)	16 (94.1%)	<0.01

*陽性: 染色強度 ≥ 2 (2: equal もしくは 3: strong)

**陽性: 染色頻度 ≥ 3 (陽性腫瘍細胞/全体の腫瘍細胞 $\geq 10\%$)

表 13 DPAM・PMCA 間での染色陽性率の比較

抗体	DPAM (n=9)	PMCA (n=8)	p-value
SLC26A3*	1 (11.1)	3 (37.5)	0.586
TFF3**	8 (88.9)	8 (100)	1

*陽性: 染色強度 ≥ 2 (=2: equal もしくは 3: strong)

**陽性: 染色頻度 ≥ 3 (陽性腫瘍細胞/全体の腫瘍細胞 $\geq 10\%$)

3.2.2 免疫組織化学染色スコアでの発現解析

3.2.1 で行った免疫組織学化学染色の結果を染色スコアで解析し、発現強度について検討し、結果を図 8 にまとめた。

TFF3 については、CRC は 20 例中、score 0 : 6 例 (30%)、score 1 : 4 例 (20%)、score 2 : 7 例 (35%)、score 3 : 1 例 (5%)、score 4 : 0 例 (0%)、score 5 : 2 例 (10%)、PMP は 17 症例中、score 0 : 1 例 (5.9%)、score 1 : 0 例 (0%)、score 2 : 0 例 (0%)、score 3 : 5 例 (29.4%)、score 4 : 3 例 (17.6%)、score 5 : 8 例 (47.1%) であった。統計学的解析 (Mann-Whitney-*U* test) で $p < 0.0001$ と、PMP と CRC の間に有意差を認めた。

一方 SLC26A3 については、PMP では 17 症例中、score 0 : 2 例 (11.8%)、score 1 : 11 例 (64.7%)、score 2 : 4 例 (23.5%)、score 3 : 0 例 (0%) で、CRC は 20 例中、score 0 : 1 例 (5%)、score 1 : 15 例 (75%)、score 2 : 4 例 (20%)、score 3 : 0 例 (0%) であった。統計学的解析 (Mann-Whitney-*U* test) で $p = 0.985$ と、PMP と CRC の間に有意差は認められなかった。

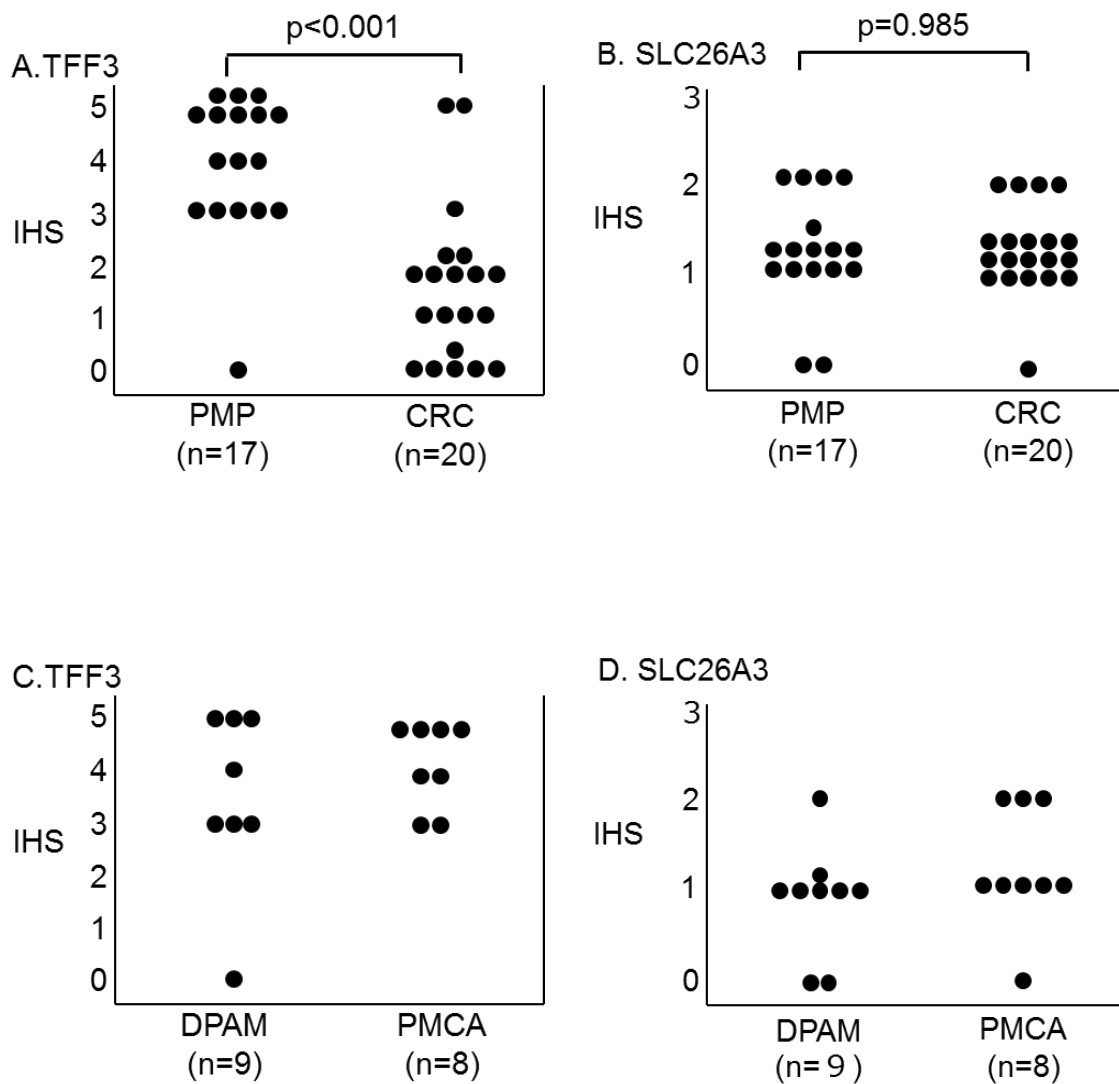


図 8 PMP・CRC 間での染色スコア

A,C: TFF3 の染色スコア。B,D: SLC26A3 の染色スコア。A,B は PMP と CRC 間での比較。C,D は DPAM と PMCA 間での比較。A: PMP と CRC において統計学的有意差を認める。B: PMP と CRC において統計学的有意差を認めない。C,D においては症例数が少ないため統計解析は施行していない。

4 考察

4.1 TFF3

今まで PMP における TFF3 のタンパク発現を検討した報告はなく、本研究が初めての報告である。TFF3 は、Sadanandam らが提唱した CRC の分類では、goblet-like に分類される腫瘍で MUC2 とともに高い発現を示した(64)。今回解析した虫垂原発 PMP 17 例中 16 例 (94.1%) で TFF3 陽性で、CRC の 20 例中 3 例 (15%) に比べ有意に陽性腫瘍が多い傾向にあった。CRC の部位で考えると、TFF3 陽性例は右側 CRC8 例中 1 例 (12.5%)、左側 CRC12 例中 2 例(16.7%)で、部位での有意差は認められず、虫垂は右側大腸腫瘍であるが、右側 CRC とは異なる発現 profile を示すものと考えられる。さらに発現の強度を score で評価し、発現程度も PMP の方が CRC に比べて高いことが判明した。Sadanandam らの報告では goblet-like type は CRC の 16.3% (63/387) を占めており、また Guinney らが提唱した CMS 分類では、goblet cell type である CMS 3 は CRC の 13%と報告されており(65)、我々の解析した CRC の 15%で TFF3 が陽性であったことは、これらのデータにほぼ一致していた。また DPAM 9 例中 8 例(score 3:3 人(33.3%)、score 4:1 人(11.1%)、score 5:4 人(44.4%)) で TFF3 陽性、PMCA は 8 症例全例において (score 3:2 人(25%)、score 4:2 人(25%)、score 5:4 人(50%)) TFF3 の発現を認めた (100%)。DPAM と PMCA 間で TFF3 の発現に有意差は認

められなかった。これらから PMP の大部分で TFF3 が陽性であったことは、PMP が Goblet-like あるいは CMS3 の特徴を示す事を意味している。すなわち、PMP は Goblet 細胞と同じ細胞が悪性化したか、あるいは腫瘍細胞が Goblet 細胞への分化を誘導された可能性が考えられる。

PMP において TFF3 の発現を認めなかった症例が 1 例あった。これについては DPMA で、さらに前章の 50 がん関連遺伝子のアンプリコンシーケンス結果から *KRAS*、*GNAS*、*SMAD4* の遺伝子変異を有する症例で、他には特記すべき特徴は認められなかった。TFF3 陰性なのかについては今回の免疫組織化学染色の検討のみでは結論をつけることは難しい。今後、網羅的に *gene expression* を評価できる RNA sequence や microarray での検討を行う必要があると思われる。また PMP において 100% TFF3 が発現していることについて、LeSimple らの TFF3 は epidermal growth factor (EGF) receptor (EGF-R) pathway に関係していること(80)や Liu の TFF3 と E-cadherin と catenin が関係しているという報告(81)がある。しかし、前章のアンプリコンシーケンスの *mutation profile* の結果を考慮すると、EGFR、E-cadherin、catenin の pathway に関与する遺伝子変異はアンプリコンシーケンスの対象遺伝子に含まれていたが、TFF3 の発現に関わる遺伝子変異は同定できなかった。これは 50 がん関連遺伝子のホットスポットのみをシーケンスしているために、ホットスポット以外の遺伝子変異を同定することができな

いことが理由と考えられる。今後、expression profile のみならず、mutation profile についても全ゲノムシーケンスやエクソームシーケンスの必要性があり、今後課題である。

Bibi らは MUC2 を用いて CRC と PMP の免疫組織化学法にて発現を比較した(66)。その結果、CRC、PMP とともに全例で MUC2 陽性であった。彼らは染色強度を scoring し、PMP で MUC2 の発現が有意に高いことを示している。MUC2 は Sadanandam らの CRC 分類で goblet cell type だけではなく、enterocyte type でも発現が上昇している。一方 TFF3 は goblet cell のみで発現上昇を示し、他の subgroup では発現していない。これは goblet cell への分化を検討するには、MUC2 よりも TFF3 が適していると考えられることを示唆するものである。

TFF3 は、以前は intestinal trefoil factor (IFF) と呼ばれ、mucin に結合しその粘性を調整するとともに(82)、上皮細胞の移動や抗アポトーシスに働くことが報告されている(83)。したがって TFF3 が PMP 細胞の転移性や抗アポトーシスに関与しているかもしれない。

4.2 SLC26A3

SLC26A3 は、Sadanandam らの報告で enterocyte type に分類される腫瘍で特異的に発現している分子である(64)。PMP の 23.5%で SLC26A3 の発現を認め、PMP の中には enterocyte type の特徴も有する腫瘍が存在することが示された。SLC26A3 の発現は CRC でも 20%で、CRC と PMP の間で有意差を認めなかった。CRC の部位毎では右側 CRC8 例中 2 例(25%)、左側 CRC12 例中 2 例(16.7%)と、部位での有意差は認められず、SLC26A3 の発現 profile は CRC での部位で異なる傾向は認められなかった。また、CRC では TFF と SLC26A3 の両者を発現する症例はなかったが、PMP 4 症例で SLC26A3 と TFF3 とともに陽性であり、約 4 分の 1 の PMP で enterocyte と goblet cell の両方の特徴を示すことが明らかとなった。尚、PMP において enterocyte と goblet cell の両者への分化を検討したのは本研究が初めてである。

SLC26A は別名で Down-regulated in adenoma (DRA) と呼ばれ、染色体 7 番目に位置し、84,500-Da のアミノ酸をコードする遺伝子である(84)。SLC26A3 は腸管の anion transporter で chloride absorption に重要な働きをし、その生殖細胞系列の変異は先天性クロール下痢症で有名である(85-87)。主に腸管の粘膜上皮に優位に発現するが、大腸がんにおいてはがんの進行と相関して mRNA レベルが低下していることが報告されている(84, 88, 89)。Sadanandam らの報告では

enterocyte type は CRC の 16.5% (64/387) を占め(64)、我々の解析した CRC 中の陽性率 20%は、この報告にほぼ一致している。一方 Guinney らの分類で enterocyte type と TA type を包含する CMS 2 (canonical) は 37%であり(65)、我々の結果は矛盾しない。

DPAM と PMCA の比較では、統計学的有意差はないものの PMCA に SLC26A3 陽性腫瘍がより多い傾向が認められた。このことは PMP の発生過程で悪性化すると goblet cell に加えて enterocyte の形質を獲得しやすい傾向がある、あるいは PMCA の中には goblet cell と enterocyte の両者に分化する細胞から腫瘍が発生しているものが含まれている可能性があることが示唆された。

今後症例数を増やして解析し、SLC26A3 と TFF3 をともに発現する PMCA と、TFF3 のみを発現する PMP の臨床病理学的・遺伝学的な相違を明らかにすることが必要と思われる。

5 結論

本研究では PMP 17 例と CRC 20 例について、免疫組織化学染色による TFF3 と SLC26A3 の発現解析を行い、TFF3 の発現はほぼ全ての PMP で発現が認められることを明らかにした。すなわち PMP は goblet cell に分化する細胞由来であるか、腫瘍細胞が goblet cell への分化傾向を示すことが明らかとなった。また少数であるが TFF3 と SLC26A3 の両方を発現する PMP も認め、goblet cell と enterocyte の両者の特徴を有する PMP が存在することが判明した。これらの結果は、PMP の発生・分化メカニズムを理解する上で有用であり、今後の病態解明やバイオマーカーの検討にも役立つものと期待される

参考文献

1. Werth. Klinische und anatomische untersuchungen zur lehre von den bauchgeschwuelsten und der laparotomie. Arch Gynaekol. 1884;24:100-18.
2. E F. Ueber das sogenannte pseudomyxoma peritonei. Munch Med Wochenschr. 1901;48:965-71.
3. Prayson RA, Hart WR, Petras RE. Pseudomyxoma peritonei. A clinicopathologic study of 19 cases with emphasis on site of origin and nature of associated ovarian tumors. Am J Surg Pathol. 1994;18(6):591-603.
4. Smeenk RM, van Velthuysen ML, Verwaal VJ, Zoetmulder FA. Appendiceal neoplasms and pseudomyxoma peritonei: a population based study. Eur J Surg Oncol. 2008;34(2):196-201.
5. Hinson FL, Ambrose NS. Pseudomyxoma peritonei. Br J Surg. 1998;85(10):1332-9.
6. 加藤 慶, 田中 一, 松島 有, 他. 当科で経験した腹膜偽粘液腫の 4 例. 産科と婦人科. 1996;63(3):429-33.
7. 松見 泰, 大須賀 穰, 三島 み, 他. 稀少な腹水性状を示した腹膜偽粘液腫の 1 例. 産科と婦人科. 1994;61(2):235-9.
8. Ronnett BM, Zahn CM, Kurman RJ, Kass ME, Sugarbaker PH,

Shmookler BM. Disseminated peritoneal adenomucinosis and peritoneal mucinous carcinomatosis. A clinicopathologic analysis of 109 cases with emphasis on distinguishing pathologic features, site of origin, prognosis, and relationship to "pseudomyxoma peritonei". *Am J Surg Pathol.* 1995;19(12):1390-408.

9. Misdraji J, Yantiss RK, Graeme-Cook FM, Balis UJ, Young RH. Appendiceal mucinous neoplasms: a clinicopathologic analysis of 107 cases. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(8):1089-103.

10. Bradley RF, Stewart JHt, Russell GB, Levine EA, Geisinger KR. Pseudomyxoma peritonei of appendiceal origin: a clinicopathologic analysis of 101 patients uniformly treated at a single institution, with literature review. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(5):551-9.

11. <Ronnett_paper_PMP_140727.pdf>.

12. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.

13. Rusk N. Torrents of sequence. *Nature Methods.* 2011;8(1):44-.

14. Zauber P, Berman E, Marotta S, Sabbath-Solitare M, Bishop T. Ki-ras gene mutations are invariably present in low-grade mucinous tumors of the

vermiform appendix. *Scand J Gastroenterol.* 2011;46(7-8):869-74.

15. Szych C, Staebler A, Connolly DC, Wu R, Cho KR, Ronnett BM.

Molecular Genetic Evidence Supporting the Clonality and Appendiceal

Origin of Pseudomyxoma Peritonei in Women. *The American Journal of*

Pathology. 1999;154(6):1849-55.

16. Yantiss RK, Panczykowski A, Misdraji J, Hahn HP, Odze RD, Rennert

H, et al. A comprehensive study of nondysplastic and dysplastic serrated

polyps of the vermiform appendix. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(11):1742-53.

17. Shetty S, Thomas P, Ramanan B, Sharma P, Govindarajan V, Loggie B.

Kras mutations and p53 overexpression in pseudomyxoma peritonei:

association with phenotype and prognosis. *J Surg Res.* 2013;180(1):97-103.

18. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert

M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J*

Med. 1988;319(9):525-32.

19. Han SW, Kim HP, Shin JY, Jeong EG, Lee WC, Lee KH, et al. Targeted

sequencing of cancer-related genes in colorectal cancer using next-

generation sequencing. *PLoS One.* 2013;8(5):e64271.

20. Chen J, Ye Y, Sun H, Shi G. Association between KRAS codon 13

mutations and clinical response to anti-EGFR treatment in patients with metastatic colorectal cancer: results from a meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71(1):265-72.

21. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(9):1423-31.

22. Kabbani W, Houlihan PS, Luthra R, Hamilton SR, Rashid A. Mucinous and nonmucinous appendiceal adenocarcinomas: different clinicopathological features but similar genetic alterations. *Mod Pathol.* 2002;15(6):599-605.

23. Furukawa T, Kuboki Y, Tanji E, Yoshida S, Hatori T, Yamamoto M, et al. Whole-exome sequencing uncovers frequent GNAS mutations in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Sci Rep.* 2011;1:161.

24. Yamada M, Sekine S, Ogawa R, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, et al. Frequent activating GNAS mutations in villous adenoma of the colorectum. *J Pathol.* 2012;228(1):113-8.

25. Nishikawa G, Sekine S, Ogawa R, Matsubara A, Mori T, Taniguchi H, et al. Frequent GNAS mutations in low-grade appendiceal mucinous

neoplasms. *Br J Cancer*. 2013;108(4):951-8.

26. Sio TT, Mansfield AS, Grotz TE, Graham RP, Molina JR, Que FG, et al. Concurrent MCL1 and JUN amplification in pseudomyxoma peritonei: a comprehensive genetic profiling and survival analysis. *J Hum Genet*. 2014;59(3):124-8.

27. Gough DB, Donohue JH, Schutt AJ, Gonchoroff N, Goellner JR, Wilson TO, et al. Pseudomyxoma peritonei. Long-term patient survival with an aggressive regional approach. *Ann Surg*. 1994;219(2):112-9.

28. Nitecki SS, Wolff BG, Schlinkert R, Sarr MG. The natural history of surgically treated primary adenocarcinoma of the appendix. *Ann Surg*. 1994;219(1):51-7.

29. Sugarbaker PH. Peritonectomy procedures. *Ann Surg*. 1995;221(1):29-42.

30. Sugarbaker PH, Chang D. Results of treatment of 385 patients with peritoneal surface spread of appendiceal malignancy. *Ann Surg Oncol*. 1999;6(8):727-31.

31. Chua TC, Al-Alem I, Saxena A, Liauw W, Morris DL. Surgical cytoreduction and survival in appendiceal cancer peritoneal carcinomatosis:

an evaluation of 46 consecutive patients. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(6):1540-6.

32. Jacquet P, Sugarbaker PH. Current methodologies for clinical assessment of patients with peritoneal carcinomatosis. *J Exp Clin Canc Res*. 1996;15(1):49-58.

33. Nummela P, Saarinen L, Thiel A, Jarvinen P, Lehtonen R, Lepisto A, et al. Genomic profile of pseudomyxoma peritonei analyzed using next-generation sequencing and immunohistochemistry. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E282-9.

34. Vartiainen J, Lassus H, Lehtovirta P, Finne P, Alfthan H, Butzow R, et al. Combination of serum hCG beta and p53 tissue expression defines distinct subgroups of serous ovarian carcinoma. *Int J Cancer*. 2008;122(9):2125-9.

35. <PMP_paper_Ronnett_1995_baseic_150804.pdf>.

36. van Hattem WA, Brosens LA, de Leng WW, Morsink FH, Lens S, Carvalho R, et al. Large genomic deletions of SMAD4, BMPR1A and PTEN in juvenile polyposis. *Gut*. 2008;57(5):623-7.

37. Fleming NI, Jorissen RN, Mouradov D, Christie M, Sakthianandeswaren A, Palmieri M, et al. SMAD2, SMAD3 and SMAD4

mutations in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2013;73(2):725-35.

38. Alakus H, Babicky ML, Ghosh P, Yost S, Jepsen K, Dai Y, et al. Genome-wide mutational landscape of mucinous carcinomatosis peritonei of appendiceal origin. *Genome Med.* 2014;6(5):43.

39. Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet.* 2014;46(6):573-82.

40. Randi ML, Murgia A, Putti MC, Martella M, Casarin A, Opocher G, et al. Low frequency of VHL gene mutations in young individuals with polycythemia and high serum erythropoietin. *Haematologica.* 2005;90(5):689-91.

41. Bento C, Percy MJ, Gardie B, Maia TM, van Wijk R, Perrotta S, et al. Genetic basis of congenital erythrocytosis: mutation update and online databases. *Hum Mutat.* 2014;35(1):15-26.

42. Hu Z, Wang J, Yao T, Hong RL, Zhang K, Gao H, et al. Identification of novel mutations of TP53, ALK and RET gene in metastatic thymic squamous cell carcinoma and its therapeutic implication. *Lung Cancer.* 2013;81(1):27-31.

43. Liu X, Mody K, de Abreu FB, Pipas JM, Peterson JD, Gallagher TL, et al. Molecular profiling of appendiceal epithelial tumors using massively parallel sequencing to identify somatic mutations. *Clin Chem*. 2014;60(7):1004-11.
44. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*. 1989;340(6236):692-6.
45. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H, et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*. 1990;249(4969):655-9.
46. Sasaki M, Matsubara T, Nitta T, Sato Y, Nakanuma Y. GNAS and KRAS mutations are common in intraductal papillary neoplasms of the bile duct. *PLoS One*. 2013;8(12):e81706.
47. Matsubara A, Sekine S, Kushima R, Ogawa R, Taniguchi H, Tsuda H, et al. Frequent GNAS and KRAS mutations in pyloric gland adenoma of the stomach and duodenum. *J Pathol*. 2013;229(4):579-87.
48. Nonaka D, Kusamura S, Baratti D, Casali P, Younan R, Deraco M. CDX-

2 expression in pseudomyxoma peritonei: a clinicopathological study of 42 cases. *Histopathology*. 2006;49(4):381-7.

49. Semino-Mora C, Liu H, McAvoy T, Nieroda C, Studeman K, Sardi A, et al. Pseudomyxoma peritonei: is disease progression related to microbial agents? A study of bacteria, MUC2 AND MUC5AC expression in disseminated peritoneal adenomucinosis and peritoneal mucinous carcinomatosis. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(5):1414-23.

50. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004;304(5670):554.

51. Velho S, Oliveira C, Ferreira A, Ferreira AC, Suriano G, Schwartz S, Jr., et al. The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41(11):1649-54.

52. Corless CL. Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now? *Mod Pathol*. 2014;27 Suppl 1:S1-16.

53. Corless CL, Schroeder A, Griffith D, Town A, McGreevey L, Harrell P, et al. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol*.

2005;23(23):5357-64.

54. Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor α gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology*. 2003;125(3):660-7.

55. Davison JM, Choudry HA, Pingpank JF, Ahrendt SA, Holtzman MP, Zureikat AH, et al. Clinicopathologic and molecular analysis of disseminated appendiceal mucinous neoplasms: identification of factors predicting survival and proposed criteria for a three-tiered assessment of tumor grade. *Mod Pathol*. 2014;27(11):1521-39.

56. Shetty S, Natarajan B, Thomas P, Govindarajan V, Sharma P, Loggie B. Proposed classification of pseudomyxoma peritonei: influence of signet ring cells on survival. *Am Surg*. 2013;79(11):1171-6.

57. Sirintrapun SJ, Blackham AU, Russell G, Votanopoulos K, Stewart JH, Shen P, et al. Significance of signet ring cells in high-grade mucinous adenocarcinoma of the peritoneum from appendiceal origin. *Hum Pathol*. 2014;45(8):1597-604.

58. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et

al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110.

59. Markert EK, Mizuno H, Vazquez A, Levine AJ. Molecular classification of prostate cancer using curated expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(52):21276-81.

60. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.

61. Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med*. 2011;17(4):500-3.

62. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.

63. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5198-208.

64. Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med.* 2013;19(5):619-25.
65. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-6.
66. Bibi R, Pranesh N, Saunders MP, Wilson MS, O'Dwyer S T, Stern PL, et al. A specific cadherin phenotype may characterise the disseminating yet non-metastatic behaviour of pseudomyxoma peritonei. *Br J Cancer.* 2006;95(9):1258-64.
67. Guo AT, Song X, Wei LX, Zhao P. Histological origin of pseudomyxoma peritonei in Chinese women: clinicopathology and immunohistochemistry. *World J Gastroenterol.* 2011;17(30):3531-7.
68. Ramaekers F, van Niekerk C, Poels L, Schaafsma E, Huijsmans A, Robben H, et al. Use of monoclonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenocarcinomas. *Am J Pathol.* 1990;136(3):641-55.
69. Ueda G, Sawada M, Ogawa H, Tanizawa O, Tsujimoto M.

Immunohistochemical study of cytokeratin 7 for the differential diagnosis of adenocarcinomas in the ovary. *Gynecol Oncol.* 1993;51(2):219-23.

70. Wauters CC, Smedts F, Gerrits LG, Bosman FT, Ramaekers FC.

Keratins 7 and 20 as diagnostic markers of carcinomas metastatic to the ovary. *Hum Pathol.* 1995;26(8):852-5.

71. Miettinen M. Keratin 20: immunohistochemical marker for

gastrointestinal, urothelial, and Merkel cell carcinomas. *Mod Pathol.*

1995;8(4):384-8.

72. Moll R, Lowe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human

carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal

antibodies. *Am J Pathol.* 1992;140(2):427-47.

73. Drummond F, Putt W, Fox M, Edwards YH. Cloning and chromosome

assignment of the human CDX2 gene. *Ann Hum Genet.* 1997;61(Pt 5):393-

400.

74. Semino-Mora C, Testerman TL, Liu H, Whitmire JM, Studeman K, Jia

Y, et al. Antibiotic treatment decreases microbial burden associated with

pseudomyxoma peritonei and affects beta-catenin distribution. *Clin Cancer*

Res. 2013;19(14):3966-76.

75. O'Connell JT, Hacker CM, Barsky SH. MUC2 is a molecular marker for pseudomyxoma peritonei. *Mod Pathol.* 2002;15(9):958-72.
76. O'Connell JT, Tomlinson JS, Roberts AA, McGonigle KF, Barsky SH. Pseudomyxoma peritonei is a disease of MUC2-expressing goblet cells. *Am J Pathol.* 2002;161(2):551-64.
77. Komatsu H, Tanji E, Sakata N, Aoki T, Motoi F, Naitoh T, et al. A GNAS mutation found in pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms induces drastic alterations of gene expression profiles with upregulation of mucin genes. *PLoS One.* 2014;9(2):e87875.
78. Roberts DL, O'Dwyer ST, Stern PL, Renehan AG. Global gene expression in pseudomyxoma peritonei, with parallel development of two immortalized cell lines. *Oncotarget.* 2015;6(13):10786-800.
79. Park ET, Oh HK, Gum JR, Jr., Crawley SC, Kakar S, Engel J, et al. HATH1 expression in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Clin Cancer Res.* 2006;12(18):5403-10.
80. LeSimple P, van Seuningen I, Buisine MP, Copin MC, Hinz M, Hoffmann W, et al. Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *American journal of respiratory cell and*

molecular biology. 2007;36(3):296-303.

81. Liu D, el-Hariry I, Karayiannakis AJ, Wilding J, Chinery R, Kmiot W, et al. Phosphorylation of beta-catenin and epidermal growth factor receptor by intestinal trefoil factor. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1997;77(6):557-63.

82. Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(7):519-27.

83. Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):799-804.

84. Schweinfest CW, Henderson KW, Suster S, Kondoh N, Papas TS. Identification of a colon mucosa gene that is down-regulated in colon adenomas and adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(9):4166-70.

85. Byeon MK, Frankel A, Papas TS, Henderson KW, Schweinfest CW. Human DRA functions as a sulfate transporter in Sf9 insect cells. *Protein Expr Purif*. 1998;12(1):67-74.

86. Silberg DG, Wang W, Moseley RH, Traber PG. The Down regulated in

Adenoma (dra) gene encodes an intestine-specific membrane sulfate transport protein. *J Biol Chem.* 1995;270(20):11897-902.

87. Moseley RH, Hoglund P, Wu GD, Silberg DG, Haila S, de la Chapelle A, et al. Downregulated in adenoma gene encodes a chloride transporter defective in congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol.* 1999;276(1 Pt 1):G185-92.

88. Antalis TM, Reeder JA, Gotley DC, Byeon MK, Walsh MD, Henderson KW, et al. Down-regulation of the down-regulated in adenoma (DRA) gene correlates with colon tumor progression. *Clin Cancer Res.* 1998;4(8):1857-63.

89. Alrefai WA, Wen X, Jiang W, Katz JP, Steinbrecher KA, Cohen MB, et al. Molecular cloning and promoter analysis of downregulated in adenoma (DRA). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(5):G923-34.

謝辞

本稿を終えるにあたり、大学院に進学し、基礎研究をする機会を与えてくださり、また本研究を行うにあたり 臨床ゲノム腫瘍学分野 古川洋一 博士を紹介してくださいました指導教官の 東京大学医科学研究所 先端診療部 山下直秀 博士 に心から深く感謝いたします。

終始親身な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所 臨床ゲノム腫瘍学分野 古川 洋一 博士に謹んで感謝の意を表します。

研究を円滑に進めるために臨床検体を提供していただきました国立国際医療センター病院下部消化管外科 部長 矢野 秀朗 先生、合田 良政 先生、須田 竜一郎 先生をはじめ、下部消化管外科チームの皆様に心から感謝申し上げます。

臨床検体の病理所見・パラフィン切片などを惜しむことなく提供して下さり、御指導いただきました国立国際医療センター病院 病理部 部長 猪狩 亨先生、東京大学医科学研究所附属病院 病理部 大田 泰徳 博士、小野田 春男 氏に感謝申し上げます。

日常の議論を通じて多くの貴重なご意見や実験技術指導を賜りました東京大学医科学研究所 臨床ゲノム腫瘍学分野 池上 恒雄 博士、山口 貴世志 博士、寺門 侑美 氏、朱 赤 氏、大杉 智之 氏、荒川 茉莉子 氏、黄 雨 晴 氏、畠山 晴良 氏、山口 有子 氏、遊佐 望 氏、濱田 和子 氏に心から感謝申し上げます。

研究を行うにあたり、快く検体を提供していただいた患者様に心から感謝申し上げます。

最後に、どんな時でも私のことを心配し、応援してくれた両親に感謝いたします。