

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 野口 玲

第1部 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

<背景・目的>

腹膜偽粘液腫 (Pseudomyxoma peritonei: PMP)は、虫垂もしくは卵巣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疾患である。発症率は100万人に1-2人/年と非常に稀な疾患である。病理学的に細胞学的異型と構造学的変化から複数のグループに分けられ、RonneltらはDisseminated peritoneal adenomucinosis (DPAM)、Peritoneal mucinous carcinomatosis (PMCA)、Peritoneal mucinous carcinomatosis with intermediate or “discordant” feature (PMCA-I/D)の3通りに分類した。DPAMは低異型度、PMCAは高異型度を示し、PMCA-I/DはDPAMとPMCAが混在している状態と定義されている。しかもDPAMの5年生存率は68%、PMCAは3%、PMCA-I/Dは21%と、分類と予後は関連していた。治療は、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)、early postoperative intraperitoneal chemotherapy(EPIC)という周術期腹腔内化学療法の複合治療の登場により予後が改善された。しかしCRSが不可能な症例、再発を繰り返す症例の予後は不良で、新たな治療法開発が必要である。

PMPの分子生物学的特徴として、KRAS変異とGNAS変異が報告されているが、PMPは症例数が少なく、その発生・進展メカニズムは十分に解明されていない。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。

<方法>

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った。組織学的な分類ではDPAM10例、PMCA8例で、PMCA-I/Dはなかった。またp53の免疫組織染色を行い、タンパクレベルの発現についても評価した。

<結果>

18 症例中 17 例に 35 個の体細胞変異を同定した。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。*KRAS* 変異は、DPAM 10 症例中 8 例 (80%)、PMCA 8 症例中 6 例 (75%) であった。*GNAS* についても DPAM 10 症例中 5 例 (50%)、PMCA 8 症例中 3 例 (37.5%) に変異を認めた。*TP53* は、DPAM には変異を認めず、PMCA 8 症例中 3 例 (37.5%) で変異を認めた。*PIK3CA*、*AKT1*、*PDGFRA* の異常はいずれも PMCA 1 例ずつで異なる症例であった。DPAM には変異をみとめず、変異がある症例は全て *TP53* の遺伝子異常がなかった。P53 の免疫組織化学染色の結果は、*TP53* の遺伝子異常のある 3 例のみで、腫瘍細胞の核内に p53 タンパク質の異常蓄積を認めた。

<考察>

本研究では、*KRAS* 変異を 77.8% に認め、これまでの多くの報告 (58-94%) とほぼ同等であった。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なかった。

GNAS 変異は 44.4% に認め、今までの報告の 37.5-45.7% とほぼ同等の頻度であった。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 ともに *GNAS* 変異を認め、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。

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。免疫染色でも、*TP53* 変異を有する 3 症例のみで、核内に p53 の蓄積を認めた。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。また免疫染色での *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。

PIK3CA と *AKT1* 変異は PMCA のみで認められ、これらの遺伝子に変異のある症例は、*TP53* 変異を認めなかった。この結果は、PI3K-AKT pathway の活性化は PMP の悪性化に関与していることを示唆している。

<まとめ>

本研究の結果、RAS family 遺伝子の異常と *GNAS* 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。

第二部 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

<背景・目的>

Sadanandam らは 1290 例の大腸がん(CRC)の gene expression profile データをもとにして 6 つの subclass、1) goblet-like 2) enterocyte 3) stem-like 4) inflammatory 5) transit-amplifying (TA) と、6) それ以外を提唱した。さらに彼らは、他の 5 つの研究グループと共同で、新たな 4 つの subtype、consensus molecular subtypes (CMS) 1~4 を提唱した。

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による CK (Cytokeratin) 7 や、CK (Cytokeratin) 20、CDX-2 のタンパク質発現解析が行われてきた。他に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。しかしこれら以外のタンパク質発現についての報告は少ない。本研究は、Sadanandam らの提唱した subclass に基づき、PMP の特徴や発生・分化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。

<方法>

低悪性度群・高悪性度群を含む計 17 例の PMP 症例と、20 例の CRC 症例を対象として、TFF3 と SLC26A3 を用いて免疫組織化学染色を行った。染色陽性率と染色強度スコアによりタンパク質発現を評価し、PMP の分化の特徴を明らかにした。

<結果>

TFF3 について CRC では 20 例中 3 例 (score 3: 1 人、score 5: 2 人) で発現陽性であった。一方 PMP 17 例中 16 例 (score 3: 5 人、score 4: 3 人、score 5: 8 人) で発現を認めた(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。

SLC26A3 については、CRC では 20 例中 4 症例 (score 2: 4 人) で発現を認め(20%)、PMP では 17 症例中 4 例 (score 2: 4 人) 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。TFF3 の発現は、DPAM 9 例中 8 例で陽性で、PMCA は 8 症例全例において TFF3 陽性で 2 群間で有意差は認めなかった。SLC26A3 については、DPAM 9 症例中 1 例(11.1%)で陽性で、PMCA では 8 症例中 3 例で (37.5%)陽性であった。DPAM と PMCA 間で SLC26A3 の発現に有意差を認めなかったものの、PMCA で陽性率が高い傾向を認めた。

<考察>

TFF3 の発現は PMP の 1 例を除く全例で陽性で、PMP が goblet cell の特徴を有していることが示された。このことは PMP が goblet cell に分化する細胞が腫瘍化したか、腫瘍細胞が goblet cell へ分化誘導されたかの 2 つの可能性があると考えられる。

SLC26A3 の発現については、PMP の 4 例 (23.5%) で発現を認め、PMP では enterocyte と goblet cell の両方の遺伝子発現を有する腫瘍が存在することが明らかとなった。DPAM と PMCA 間で比較したところ、有意差はないが PMCA においてやや陽性率が高い傾向にあった。goblet cell と enterocyte の両方への分化を示す PMP の方が、高悪性度と相関する可能性が示唆された。

<まとめ>

PMP は goblet cell 由来、または腫瘍細胞が goblet cell へ分化誘導されていることが示唆された。また goblet cell と enterocyte の両方の性質を有する PMP が存在することが明らかになった。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。