

学位論文題名

超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体を用いた膵臓癌における 抗癌剤感受性予測因子ならびに予後予測因子の検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】膵癌は致死的な悪性疾患の一つであり、膵癌患者の大部分は、診断時には切除不能となっている。このような局所進行や遠隔転移を伴う切除不能膵癌に対しては gemcitabine 単剤による全身化学療法が有用とされている。近年、切除可能膵癌に対する gemcitabine による術後補助化学療法の有用性が証明され、切除例においても化学療法の重要性が高まってきている。その一方で、全切除例において術後補助化学療法が必要か否かについては一定の見解が得られていない。診断面の進歩では、内視鏡機器ならびに処置具の進歩に伴い、Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS-FNA) で組織検体の採取が可能となり、病理学的確定診断を行うことも広く普及しつつある。診断時に EUS-FNA 検体を用いて抗癌剤感受性予測因子や予後不良因子を同定することが可能であれば、化学療法の効果を最大限に活かすと同時に、非感受性例に対する不要な副作用や経済的負担を回避することが可能となる。

薬剤感受性予測因子に関する各種遺伝子発現の研究も盛んにおこなわれており、膵癌に対する化学療法感受性予測因子についても多数報告されている。gemcitabine に関するものとして、human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), deoxycytidine kinase (dCK), ribonucleoside reductase 1 (RRM1), ribonucleoside reductase 2 (RRM2), Notch3 などが報告されている。また、S-1 に関するものとして、dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) などが報告されている。しかし、これらの報告の大部分は膵癌細胞株や外科切除標本を用いた検討であり、非切除例を含めた膵癌全般に当てはまるかどうかはいまだ明らかではない。

今回、私は治療前の EUS-FNA 検体を用いて Quantitative Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) による遺伝子学的検索を行うことにより抗癌剤感受性予測因子ならびに予後予測因子の検討を行った。

【対象と方法】対象は、2007 年から 2010 年において北海道大学病院で治療前に施行した EUS-FNA により膵癌と診断され、なおかつ検体保存が可能であった 110 例(切除例 40 例、切除不能例 70 例)である。遺伝子学的検索は、EUS-FNA 検体から全 mRNA を抽出し、予測因子として hENT1, dCK, RRM1, RRM2, Notch3, DPD の 6 つの遺伝子発現を qRT-PCR を用いて測定してなされた。検討に際して、測定値を内部対照である $\beta 2$ ミクログリンで補正した値を mRNA 発現量とし、それぞれの mRNA 発現量の平均値をカットオフとして検討を行った。抗癌剤感受性については、GEST study: Randomized phase III study of GEM plus S-1 (GS) versus S-1 versus GEM in unresectable advanced pancreatic cancer (PC) in Japan and Taiwan の全生存期間中央値より gemcitabine は 8.8 か月、S-1 は 9.7 か月以上治療継続可能であった例を感受性群、それ以外を非感受性群としてなされた。また、切除例においては各遺伝子発現量と組織学的局所進展因子との関係を検討した。

【結果】mRNA 抽出は 110 例全例で可能であった。抗癌剤感受性予測因子の検討では、感受性群では RRM2 発現量が有意に低いことが示された(感受性群 : 非感受性群 = 401 ± 745 : 1013 ± 2745 , $p = 0.0494$)。サブグループ解析では、Notch3 mRNA 発現量は、pT 因子進行 ($pT1+p2$: $pT3+pT4 = 13 \pm 7$:

178±610, $p = 0.0381$), 神経浸潤陽性(陽性 : 陰性 = 200±656 : 29±32, $p = 0.0367$)で有意に高発現していることが示された。予後予測因子の検討では、多変量解析により S-1 未施行(施行 : 未施行 = 0.252 : 1.000, $p = 0.0016$), Notch3 高発現(高発現 : 低発現 = 5.467 : 1.000, $p = 0.0008$), DPD 高発現(高発現 : 低発現 = 3.399 : 1.000, $p = 0.0016$)が独立した予後不良因子として抽出された。

【考察】感受性予測因子の検討では、gemcitabine 感受性群で RRM2 mRNA 発現量が有意に低く、抗癌剤感受性予測因子として有用であることが示された。RRM2 を細胞に過剰発現させると gemcitabine 抵抗性となり、RRM2 mRNA 発現量が低い群で gemcitabine の全身投与による予後の延長がみられるといった過去の報告と矛盾しない結果であった。今回の研究において、gemcitabine 施行群と gemcitabine 未施行療群の予後あるいは、RRM2 mRNA 発現量による予後の差はみられなかった要因としては、切除例と非切除例が混在していたことがあげられる。

予後予測因子の検討では、多変量解析により S-1 治療未施行、Notch3 mRNA 高発現群、DPD mRNA 高発現群では対象群と比較して有意に死亡リスクが高いことが示された。本研究における S-1 治療例は 1 例を除き、すべてが二次治療であり、S-1 治療施行群は PS が保たれている例のみが対象となったために予後因子として抽出された可能性も考慮される。しかし、gemcitabine 不応と評価されたにもかかわらず quality of life 維持を目的として gemcitabine を漫然と継続するのではなく、適切な時期に S-1 への変更を行う治療戦略が予後延長に寄与することを示唆する結果とも考えられる。

Notch3 は膵癌細胞株において、Notch signaling を抑制することは浸潤能の低下につながるといわれており、過去の膵癌の外科切除標本を用いた免疫組織学的検討においても、Notch3 が核での発現亢進がみられた群では予後不良であることが示されている。本研究でも、局所進展度の進行した群、神経浸潤陽性群といった浸潤傾向の強い群で Notch3 mRNA の発現亢進が示されるとともに、予後不良因子としても抽出された。これまでに、膵癌における Notch3 mRNA 発現量と組織学的局所進展因子とに相関を示した報告はなく、今後さらなる研究が期待される。

DPD は 5-FU 代謝の律速酵素で、5-FU 耐性や予後不良因子として報告されている。一方、S-1 は 5-FU のプロドラッグであるカプセルと 5-FU の代謝律速酵素阻害剤を含んでいることから、DPD 発現が高いとされる膵癌でも高い感受性がみられるが、発現の低い方がより感受性が高いと報告されている。本研究では、DPD 高発現群は独立した予後不良因子として抽出されたが、S-1 に対する感受性に関しては 2 群間に発現の差はみられなかった。原因の 1 つとして全例に S-1 が投与できていないことがあげられる。

EUS-FNA 検体を用いた遺伝子解析においては、目的とする腫瘍細胞の量や検体採取時の誤差もしくは混入細胞の量が偽陰性の原因となることが指摘され、mRNA 発現量の違いを検出するには microdissection を行うことが必要であるとの報告もみられる。今回、我々の研究では microdissection は行っていないが、細胞診検体ではなく、肉眼的に同定された組織片検体を用いることにより mRNA 発現量の違いを検出することが可能であった。

【結論】今回の研究で、診断時 EUS-FNA 検体を用いた遺伝子発現量の測定は、Notch3, DPD mRNA 高発現群では予後不良であるため、術後早期の補助化学療法導入の必要性を、RRM2 高発現群では gemcitabine 単剤ではなく S-1 単剤、GS 併用療法を 1 次治療として使用することの必要性を示し、腫瘍進展・予後予測や抗癌剤感受性予測を加味した治療戦略における有用性が明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	松野吉宏
副査	教授	武富紹信
副査	教授	櫻木範明
副査	教授	山本有平

学位論文題名

超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体を用いた膵臓癌における 抗癌剤感受性予測因子ならびに予後予測因子の検討

申請者は主に qRT-PCR の手法を用い、超音波内視鏡下穿刺吸引生検 (EUS-FNA) 検体を用いた膵臓癌における抗癌剤感受性予測因子ならびに予後予測因子の検討を行い、EUS-FNA 検体を用いた遺伝子解析の有用性について考察した。膵臓癌は、組織採取が困難であることから、遺伝子解析の多くは外科切除標本や癌細胞株を用いて行われており、非切除例での検討があまり行われていないことを指摘し、非切除例からも組織採取が可能な EUS-FNA 検体を用いて遺伝子解析が可能であることを示した。また、EUS-FNA 検体を用いた遺伝子解析の結果から、gemcitabine 感受性予測因子として RRM2, Notch3 を、予後予測因子として Notch3, DPD が有用である可能性を指摘した。

審査会では、学位論文内容の発表後、副査の武富紹信教授から、EUS-FNA 検体を用いた遺伝子解析と外科切除標本 (FFPE) を用いた遺伝子解析との違いについて問われた。申請者は、実験データから EUS-FNA 検体と FFPE 検体では抽出される RNA 量の違いがあることを指摘したうえで、発現の高低差については相関がみられたことを示した。また、gemcitabine による RR 活性への抑制効果の機序について問われ、申請者は、癌細胞株を用いた検討で gemcitabine 曝露により癌細胞株での RRM1, RRM2 の発現量が増加することを述べ、薬剤感受性だけでなく、薬剤耐性への関与が指摘されていることを述べた。抗癌剤感受性群の設定についての問いには、過去の報告で用いられている RECIST (腫瘍縮小率)や腫瘍マーカー減少率を用いた評価方法を紹介し、膵臓においては腫瘍縮小が得られにくい現状と腫瘍マーカー減少率を用いた場合に起こる画像評価との矛盾点を指摘し、単剤での治療継続期間を感受性群の設定に用いたと述べた。肉眼的白色検体に含まれている混入細胞についての問いに、申請者は、腫瘍細胞以外では、赤血球以外にも、癌の間質細胞や穿刺経路の細胞の存在を指摘した。また、間質細胞からの影響を評価する方法を問われ、申請者は FUS-FNA 検体をマイクロカテクトンすることにより腫瘍細胞と間質細胞とを分けて

検討できるのではないかと述べた。qRT-PCR の具体的な方法論についての問いに対して、申請者は、SYBR Green 法と Taq Man 法のうち SYBR Green 法を用いた旨を説明したうえで、SYBR Green 法では感度がよいが特異度は低くなる問題点があることから、特異度を保つために、プライマーの設計時に非特異的な反応が起こらないように配慮したと回答した。副査の櫻木範明教授から手術症例と非手術症例とを分けた検討の必要性について指摘された。申請者は、手術症例では disease-free survival を、非手術症例では overall survival を用いた検討を行う予定であると回答した。また、EUS-FNA 検体を用いた組織診の検体採取率について問われた。申請者は、細胞診であれば 95%以上であり、組織診であれば 90%前後と細胞診よりは低くなると述べた。続いて、副査の山本有平教授より膵癌における組織型の違いについて問われた。申請者は、EUS-FNA 検体での組織診断では、癌か非癌であるかの鑑別が主目的であり、厳密な分化度の評価は困難であることを指摘した上で、免疫染色を追加することにより特殊型膵癌の診断には迫れることを述べ、今回の研究では、これらの手法を用いることにより特殊型膵癌を除いた通常型膵癌(膵管癌)のみを対象として研究を行ったと述べた。また、EUS-FNA 検体を用いた遺伝子解析による個別化治療への応用の可能性を問われ、申請者は、膵癌においては、EUS-FNA 検体を用いて K-ras 遺伝子変異を調べることによる診断能の上乗せ効果が示されており、一部の施設では使用されている現状を紹介したうえで、乳癌で行われているような Oncotype Dx を例に挙げ、膵癌においても有用な遺伝子を同定することにより同様の検討が行えるようになるかもしれないと述べた。続いて、主査の松野吉宏教授から、TS-1 の治療群は大部分が二次治療であった点を指摘され、申請者は PS に関するセレクションバイアスの可能性を指摘した上で、一次治療での検討の必要性を述べた。これに対し、主査の松野吉宏教授からは、一次治療が行われたことによる腫瘍細胞への影響を追加指摘した。腫瘍細胞と間質細胞とに遺伝子発現量の差があるのかとの問いには、DPD においては腫瘍細胞で間質細胞よりも有意な発現量の上昇がみられることを述べたうえで、その他の遺伝子においては十分な検討がなされておらず、今後の課題であると回答した。

この研究は難治とされる膵癌に対する治療戦略において、EUS-FNA 検体が遺伝子解析の有用な材料となりうることを示し、今後の膵癌に対する個別治療への貢献が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。