

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462115

研究課題名(和文) 膵神経内分泌腫瘍における主要遺伝子の臨床的意義に関する検討

研究課題名(英文) Clinicopathologic and genetic analysis of pancreatic neuroendocrine tumor (PNETs)

研究代表者

岡野 圭一 (Okano, Keiichi)

香川大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20314916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵神経内分泌腫瘍の遺伝子異常を解析し、臨床病理学的な意義を明らかにした。多施設共同研究として集積した88症例を再評価した。膵神経内分泌腫瘍の主要5遺伝子(DAXX、ATRX、MEN1、TSC2、PTEN)を含む関連遺伝子の検討した。MEN1の41%、PTENの58%、Tuburinの77%、P53の61%、Rbの60%、ATRXの38%、DAXXの68%に遺伝子発現異常を認めた。

ATRX遺伝子異常と肝転移($p=0.016$)と Tuburin遺伝子異常と再発の有無($p=0.059$)、p53遺伝子異常と膵神経内分泌腫瘍Grade分類($p=0.009$)に有意な相関性を認め、新知見であった。

研究成果の概要(英文)：The number of patients with pancreatic neuroendocrine tumor (PNETs) has been increased. The genetic and clinicopathologic features are still unclear. In this study, we analyzed the genetic changes and clinicopathological features of PNETs. The specimens from 88 patients with PNETs (multicenter study) were classified according to the 2010WHO classification. Five major genes of PNETs (DAXX, ATRX, MEN1, TSC2, PTEN) were examined. The immunohistochemical staining results revealed that significant association of ATRX and liver metastasis, TSC2 (Tuberin) and post-operative recurrence. The p53 abnormality showed significant correlation with PNETs Grade classification (G1/2).

研究分野：消化器外科

キーワード：膵神経内分泌腫瘍 TSC2 P53 DAXX ATRX

1. 研究開始当初の背景

膵神経内分泌腫瘍は膵腫瘍としては2番目に多く、年々増加している。また、人口10万人あたりの年間有病患者数は2.2人であり、欧米の約2倍とされている。以前はガストリノーマやインスリノーマといったホルモン産生腫瘍が注目されていたが、実際は非機能性が多いことも知られるようになった。その生命予後は、膵臓がんと比較すると良好であるが、長い経過で肝転移などの遠隔転移をきたす症例もあり、10年生存率は40~60%程度である。一方、その分子生物学的な特徴はほとんど知られていなかったが、最近その全遺伝子のエクソン・シーケンス解析が米国で完了し、主に5つの遺伝子(DAXX, ATRX, MEN1, TSC2, PTEN)の異常が高頻度に認められた。MEN1は多発性内分泌腫瘍1型(multiple endocrine neoplasia type 1: MEN1)の責任遺伝子であるが、散発性の膵神経内分泌腫瘍においても高頻度で変異が認められた。DAXXとATRXは相補的に作用し両者はヒストンH3.3の結合に必要とされている。さらに最近、DAXXとATRXの突然変異は、テロメアの構造や伸長などの機能維持や遺伝子再編成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。TSC2とPTENはPI3K-mTORシグナル伝達経路に属し、最近、この経路の活性を阻害する薬剤(Everolimus)の多施設臨床試験の結果も報告され、その膵神経内分泌腫瘍に対する臨床的な有用性が明らかになった。

しかし、これらの遺伝子異常の臨床的な意義は、ほとんど解明されていない。

遺伝子	NET G1/2	NET G3	膵管癌 (PDAC)
MEN1	44%	0%	0%
DAXX, ATRX	43%	0%	0%
Genes in mTOR pathway (TSC2, PTEN)	15%	5%	1%
TP53	3%	95%	85%
KRAS	0%	29%	100%
CDKN2A/p16	0%	32%	25%
SMAD4, SMAD3, TGFRBR1	0%	5%	38%
RB1	0%	74%	13%

表 既知の膵内分泌腫瘍と遺伝子変異

2. 研究の目的

膵神経内分泌腫瘍の遺伝子異常の臨床的な意義を明らかにする事により、未だ確立さ

れていない本疾患の病態を明らかにし、個別化治療に繋げていく。本疾患は様々な悪性度の腫瘍を包括しており、特に外科治療において切除の適応、あるいはリンパ節郭清の必要性などを本研究により解明する。

3. 研究の方法

香川大学医学部附属病院ならびに多施設共同研究に参加する神戸大学、徳島大学、高知大学、愛媛大学で切除された膵神経内分泌腫瘍の臨床情報を収集する共に病理診断を再評価し、パラフィン包埋サンプルより未染スライドを準備した。

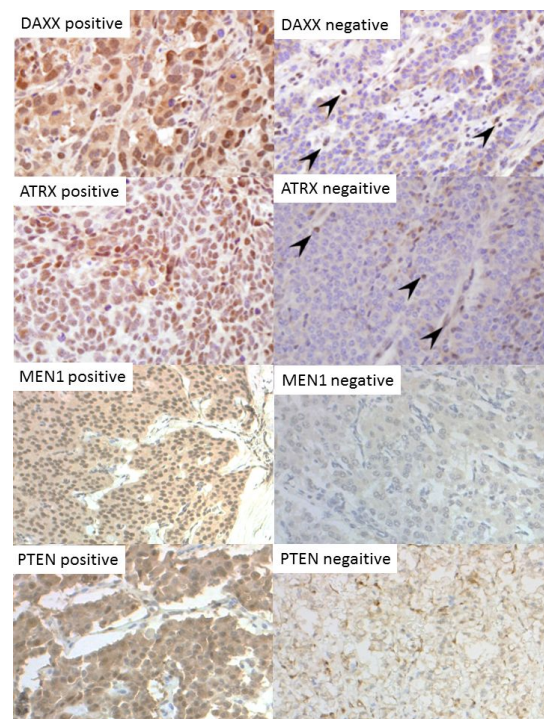
主要5遺伝子(DAXX, ATRX, MEN1, TSC2, PTEN)を含む遺伝子の異常を、免疫組織化学染色法ならびにシーケンス解析(サンガー法)で評価した。

免疫染色で検討した遺伝子と抗体は以下の通りである。

- DAXX (HPA008736); Sigma-Aldrich
- ATRX (HPA001906); Sigma-Aldrich
- Pten (D4.3); Cell signaling Technology
- Retinoblastoma protein (3C8); QED Bioscience
- p53 (Bp-53-11); Ventana
- p16 (E6H4); mtm laboratories
- Ki67 (MIB1); DakoCytomation
- Menin (A300-105A); Bethyl Lab.
- Tuburin (c-20); Santa Cruz

免疫染色結果は病理専門医を含む2名で評価しその遺伝子異常と、生命予後や再発パターンを含む臨床・病理学的な因子との関連性を検討した。

4. 研究成果
(1) 免疫染色



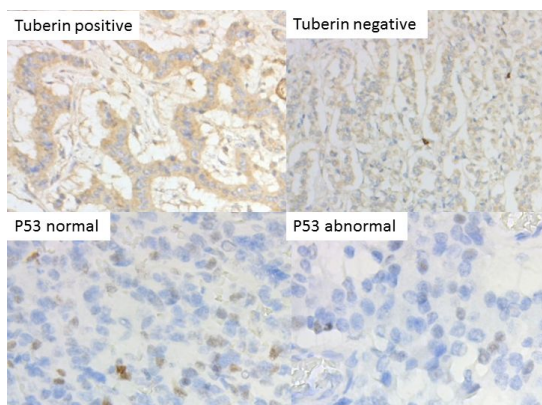


図 各遺伝子における免疫染色の特徴

外科切除を施行した膵神経内分泌腫瘍 100 例の臨床情報を収集した。WHO 分類 2010 に基づいた再分類を行い、その中の 88 例の主要遺伝子の免疫組織化学染色を行い、それらの結果と臨床・病理学因子との関連性に関する解析をおこなった。

結果は MEN1 の 41%、PTEN の 58%、Tuberin の 77%、P53 の 61%、p16 の 58%、Rb の 60%、ATRX の 38%、DAXX の 68% に遺伝子発現異常を認めた。

過去の報告と比較すると MEN1、ATRX、DAXX はほぼ同程度の変異であったが、その他の PTEN、Tuberin、P53、p16、Rb は今回の検討で高率の変異を認めた。

(2) 臨床病理学的因子との検討

免疫染色による遺伝子異常と臨床病理学的な因子の関連に関して検討を行った。

検討項目として性別 / 年齢 / 腫瘍径 / Grade (2010 WHO) / TNM / 脈管侵襲 / リンパ節転移 / 肝転移 / OS / DFS を抽出した。

統計学的な関連性や傾向を認めた項目は ATRX 遺伝子異常と肝転移 ($p=0.016$) と Tuberin 遺伝子異常と再発の有無 ($p=0.059$)

p53 遺伝子異常と膵神経内分泌腫瘍 Grade 分類 ($p=0.009$) であった。

下図の示す様に、肝転移を来した症例は全例 ATRX の異常を認めた。

	ATRX negative	ATRX positive	合計
肝転移無し	36 (63%)	20 (37%)	57
肝転移有り	6 (100%)	0	6
合計	42 (68%)	20 (32%)	62

表 ATRX 遺伝子異常と肝転移の関係

(3) シークエンス解析

現在までの免疫染色による検討結果を踏まえて次世代シークエンス解析を施行している。

(4) 考察

今回の検討では予後 (OS、DFS) に関連する遺伝子変異は認めなかった。これは NET G1/G2 の治療後の予後が比較的良好なために今回の症例数では統計学的な有意差を認めるようなパワーを得られなかったのかも知れない。

一方、ATRX 遺伝子異常と肝転移に強い相関性を認め、肝転移を有した腫瘍の全例に ATRX 遺伝子異常を認める事は新しい知見であった。今後、ATRX 遺伝子異常を認める症例においては、厳密な肝転移のフォローを行う必要があることを提唱する根拠となる可能性がある。また、このような症例に選択的な肝転移予防治療 (経肝動脈化学療法など) を検討する必要があるかも知れない。今後、この結果をもとにした大規模な検討により、この知見を確認する必要がある。

Tuberin 遺伝子異常と再発の関連に関して相関性を認めた。これは今後この疾患に補助療法を選択的に行うための重要な知見であると考えられる。Tuberin (*TSC2*) は PI3K-mTOR シグナル伝達経路に属し、この経路の活性を阻害する薬剤 (Everolimus) の有用性を示す結果も報告され、膵神経内分泌腫瘍に対する臨床的な有用性が明らかとなっている。これは Tuberin 遺伝子異常を伴うハイリスクグループに選択的に Everolimus 治療を行う個別化治療の可能性を示唆しており、今後の検討が必要である。

今回の研究結果は、現在まで詳細な病態や適切な治療方法の確立されていない膵神経内分泌腫瘍に多くの新たな知見を追加した。

これらの結果は ATRX、Tuberin、p53 遺伝子異常が肝転移や再発、組織 Grade に関与し手入ることを明らかにした。免疫染色によって遺伝子変異を確認する事により補助療法や再発検査の頻度などを個別に選択することができる可能性を示した。

本研究結果を臨床研究に繋げて実臨床にフィードバックしていくことが望まれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)
岡野 圭一 他、IPMN・多発膵内分泌腫瘍・vonHippel-Lindau 病に対する外科治療、消化器外科 38、2015、69-80

〔学会発表〕(計 1 件)
上村 淳、岡野 圭一、他、当科における膵

内分泌主要 (NETG1/G2) 切除例の検討、日本神経内分泌腫瘍研究会 2015年9月12日
仙台

〔図書〕(計 1件)

岡野 圭一、他 膵癌・胆道癌 基礎と臨床の最新研究動向 (4)膵腫瘍の画像診断
5)PET 831p
日本臨牀社

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡野 圭一 (OKANO, Keiichi)
香川大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：20314916

(2)研究分担者

谷内田 真一 (YACHIDA, Shinichi)
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長
研究者番号：20359920

鈴木 康之 (SUZUKI, Yasuyuki)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：40304092