

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592029

研究課題名(和文)膵臓癌におけるピック3遺伝子の臨床的意義に関する検討

研究課題名(英文)Immunohistochemically Detected Expression of Three Major Genes (CDKN2A/p16, TP53 and SMAD4/DPC4) Strongly Predicts Survival in Patients with Pancreatic Cancer

研究代表者

大島 稔(Oshima, Minoru)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60624830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：通常型膵管癌において高頻度で変異が検出される4遺伝子KRAS, p53, p16, SMAD4のうち、ほぼ100%で変異がみられるKRASを除く3遺伝子の異常とその臨床的意義について手術症例(106例)を対象とし検討した。p53の異常(81%)は局所再発に、p16の異常(67%)は遠隔転移に、Smad4の異常(60%)は腫瘍径やリンパ節転移に有意な相関を認めた。Smad4は全生存期間を規定する独立因子であり、3遺伝子の異常の総数は術後の生命予後を強く反映していた。膵臓癌における主要3遺伝子の異常とその蓄積は生物学的悪性度を強く反映し、3遺伝子の評価は治療方針の決定にきわめて有益である。

研究成果の概要(英文)：The pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) contains 4 frequently mutated genes (KRAS, TP53, p16, SMAD4). We determined the status of TP53, p16, SMAD4 since the KRAS gene is mutated in virtually all PDAC patients, and analyzed relationships with clinicopathological findings in 106 surgical patients with PDAC.

Abnormal of p53 (81%) was associated with the presence of locoregional recurrence. Loss of p16 (67%) was associated with postoperative widespread metastases. Loss of Smad4 (60%) was associated with the tumor size and lymph node metastasis. Loss of Smad4 was an independent and significant poor prognostic factor for overall survival. On analysis of combinations of the status of these 3 genes, increasing number of alterations reflected poorer survival.

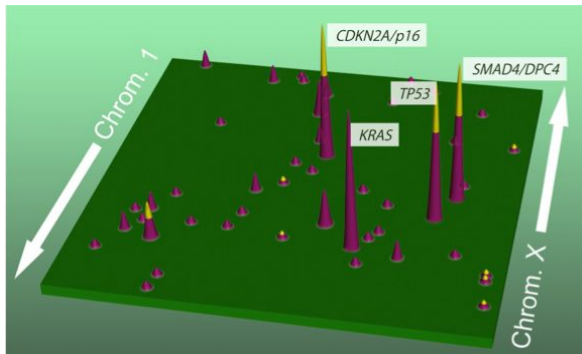
Genetic alterations of these 3 genes and their accumulation are strongly associated with malignant behavior of PDAC. Their assessment may provide a new prognostic tool, assisting in deciding optimal therapeutic strategies.

研究分野：消化器外科

キーワード：通常型膵管癌 遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は依然として、きわめて予後不良の癌腫であり、診断後の5年生存率は約5%である。近年、タンパク質をコードする全遺伝子(20,661 遺伝子)の解析が膵臓癌で完了した。その結果(下図)、膵臓癌において、突然変異やコピー・ナンバーの異常が高頻度に認められる遺伝子は4つのみであることが判明した(Jones S, Zhang X, et al, **Science** 2008, 321:1807)。

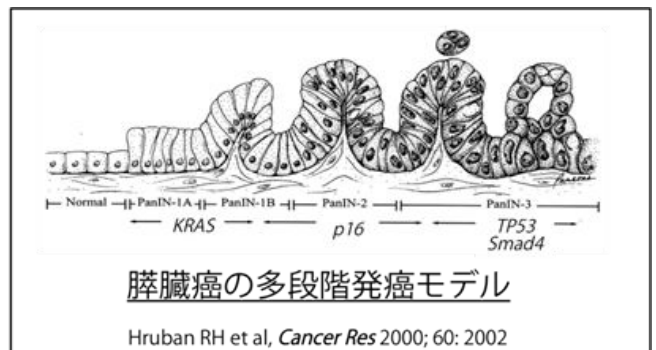


この4つの遺伝子は、KRAS、CDKN2A/p16、TP53、SMAD4/DPC4である。さらに、本研究の研究分担者である谷内田真一らは、膵臓癌では突然変異や染色体再編成などの遺伝子変異の蓄積により癌ゲノムは進化し(癌におけるクローンの”進化論”)、浸潤・転移することを報告した(Yachida S, Jones S, et al, **Nature** 2010, 467:1114; Campbell PJ, Yachida S, et al, **Nature** 2010, 467:1109)。また谷内田らは、膵臓癌の解剖症例を用いた解析で、SMAD4/DPC4の欠失が解剖時の遠隔転移の総数と強く相関し、この遺伝子と転移機

構との関連性を報告している

(Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, et al, **J Clin Oncol** 2009, 27:1806)。

これまでの報告から、KRAS 遺伝子の突然変異はほぼ100%の頻度で膵臓癌に認められ、その発癌過程において必須の変化と考えられる。癌抑制遺伝子である TP53 と SMAD4/DPC4 はいずれも約50~60%、同様に癌抑制遺伝子である CDKN2A/p16 は約80%の頻度で、遺伝子異常(不活性化)が認められる。下図に示すように、KRAS の突然変異の後に、CDKN2A/p16、TP53、SMAD4/DPC4 の順に遺伝子異常をきたすことによって多段階的に発癌することが知られているが、上述のように KRAS 以外は全例でその異常が認められるわけではない。KRAS、CDKN2A/p16、TP53 と SMAD4/DPC4、これらの遺伝子異常と臨床・病理学的な因子との関連性は確立されておらず、さらにそれらの遺伝子異常の組み合わせとの関連は不明である。



2. 研究の目的

近年、膵臓癌における全遺伝子解析が行

われ、膵臓癌において高頻度で異常が認められる主要遺伝子は4つであることが明らかになった(*KRAS*, *CDKN2A/p16*, *TP53* と *SMAD4/DPC4*)。しかし、これらの遺伝子異常と臨床・病理学的な因子との関連性は確立されておらず、さらにそれらの遺伝子異常の組み合わせとの関連は不明である。*KRAS* はほぼ全例で突然変異がみられることから、本研究では *KRAS* を除く3つの遺伝子の変化を多数例で検討し、リンパ節転移などの病理学的因子や再発形式、生命予後などとの関係を解析し、膵臓癌における分子生物学的特徴に基づいた個別化治療につなげたい。

最近の遺伝子改変マウスモデルを用いた膵臓癌の発癌機序に関する研究で、これらの遺伝子異常の組み合わせや蓄積が、膵臓癌の組織形態や悪性度、浸潤・転移にきわめて大きな影響を及ぼすことが解明されてきた (Tuveson D et al, *Nature* 2011, 471:316; Izeradjene K et al, *Cancer Cell*, 2007, 11:229; Frese KK et al, *Nat Rev Cancer* 2007, 7:645)。膵臓癌ではこれらの主要な遺伝子の異常が蓄積されることで、より生物学的悪性度の高い膵臓癌へと進化し、最終的に遠隔転移をきたすと考えられるが、これまでにこれらの遺伝子の蓄積、組み合わせと臨床・病理学的な因子に関する包括的な報告はない。

3. 研究の方法

香川大学医学部附属病院と社会保険栗林病院で根治手術を受けた通常型浸潤性膵管癌(106例)のパラフィン包埋サンプルを用いて、膵臓癌で高頻度に異常が認められる遺伝子を免疫組織化学染色で検討した。*KRAS* はほぼ全例で突然変異をきたすことから、*KRAS* を除く3つの遺伝子 (*CDKN2A/p16*, *TP53*, *SMAD4/DPC4*) の異常を、免疫組織化学染色法で検討する。*TP53*, *SMAD4/DPC4* と *CDKN2A/p16* は *KRAS* とは異なり、それぞれの遺伝子異常(不活性化)の機序は多くのバリエーションがあり(点突然変異, 染色体欠失, DNAメチル化など)複雑であるが、パラフィン包埋サンプルを用いた免疫組織化学染色法で、これらの3つの遺伝子異常の有無をほぼ正確に、総合的に評価できることが知られている (Baas IO, et al, *J Pathol* 1994, 172:5; Wilentz RE, et al, *Cancer Res* 1998, 58:4740; Wilentz RE, et al, *Am J Pathol* 2000, 156:37)

4. 研究成果

<研究結果>

p16, p53, Smad4/Dpc4 は免疫染色でそれぞれ 67.0%, 81.1%, 60.4% に異常を認めた。

p16 の異常はリンパ管侵襲 (p=0.012) や広範囲の癌の進展 (p<0.01) , 術後遠隔転移 (p=0.015) と有意に相関を認めた .

p53 の異常は腫瘍分化度の低さ (p=0.022) や術後の局所再発 (p=0.020) と有意に相関していた .

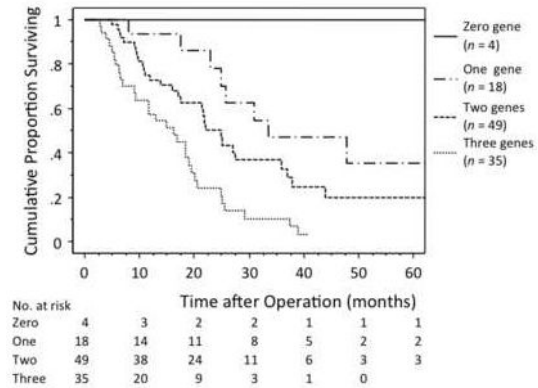
Smad4/Dpc4 の異常は腫瘍径 (p=0.006) やリンパ節転移 (0.006) と有意な相関を認め , 術後 5 年生存が得られた 6 症例の全例で , Smad4/Dpc4 は正常であった . 単変量解析では , リンパ節転移 (p=0.001) , T 因子 (T1/T2 vs T3) (p=0.004) , リンパ管侵襲 (p=0.029) , p16 の異常 (p=0.029) , と Smad4/Dpc4 の異常 (p<0.001) が術後の全生存期間を規定する因子であった . 多変量解析の結果 , Smad4/Dpc4 の異常は全生存期間 (p=0.014) および無再発生存期間における独立した予後規定因子であった .

これら 3 遺伝子の異常の総数は , さらに術後の生命予後を強く反映していた (P<0.0001) (**下図参照**)

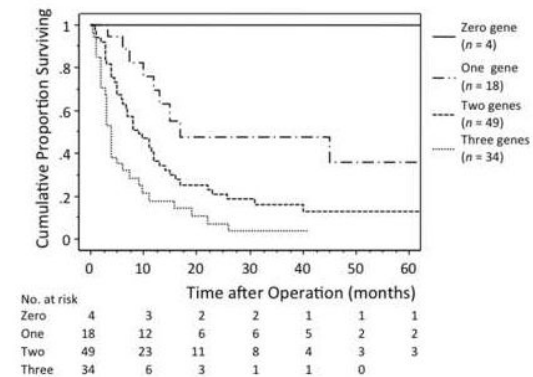
主要 3 遺伝子・蛋白の異常の総数と

膵癌術後予後

< 全生存期間 >



< 無再発生存期間 >



< 結語 >

通常型膵管癌における主要 3 遺伝子の異常とその蓄積は , 腫瘍の生物学的悪性度を強く反映していた . 3 遺伝子の異常の総数は術後の生存期間を予知可能で , 術前および術後の生検時のこれらの遺伝子の免疫染色による評価は , 治療方針の決定にきわめて有益である .

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)

Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba
T, Suzuki Y, Yachida S.

Immunohistochemically detected expression
of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and
SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in
patients with resectable pancreatic cancer.

Ann Surg. 2013 Aug;258(2):336-46.

doi: 10.1097/SLA.0b013e3182827a65

査読あり

〔 学会発表 〕 (計 4 件)

大島 稔、通常型膵管癌における p16、TP53、
SMAD4 の遺伝子変異は分子生物学的悪性
度を反映する

日本膵臓学会 2013.07.25-07.26

仙台国際センター (宮城県・仙台市)

大島 稔、膵癌における主要な遺伝子異常
(p16、TP53、SMAD4)は生物学的悪性度を
反映し予後の予測に有用である

日本肝胆膵外科学会 2013.06.12-06.14

ホテル東日本宇都宮 (栃木県・宇都宮市)

大島 稔、通常型膵管癌における主要 3 遺
伝子(p16、 p53、 SMAD4)の変異は生物学
的悪性度を強く規定する

日本外科学会 2013.04.11-4.13

福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

大島 稔、膵臓癌において免疫組織化学染色
による主要遺伝子(p16、 p53 と SMAD4)の
評価は切除後の生命予後の予知に有用であ
る

日本外科学会 2012.04.12-4.14

幕張メッセ (千葉県・千葉市)

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 産業財産権 〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類：

香川大学 消化器外科 助教

番号：

研究者番号：60624830

出願年月日：

国内外の別：

(2)研究分担者

谷内田 真一 (YACHIDA, Shinichi)

○取得状況(計 0件)

独立行政法人国立がん研究センター

研究所 がんゲノミクス研究分野

ユニット長

名称：

研究者番号：20359920

発明者：

権利者：

岡野 圭一 (OKANO, Keiichi)

種類：

香川大学 消化器外科 准教授

番号：

研究者番号：20314916

出願年月日：

取得年月日：

鈴木 康之 (Suzuki, Yasuyuki)

国内外の別：

香川大学 消化器外科 教授

研究者番号：40304092

〔その他〕

(3)連携研究者

ホームページ等

()

香川大学 消化器外科 HP

研究者番号：

<http://www.kms.ac.jp/~surgery/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 稔 (OSHIMA, Minoru)