

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460449

研究課題名(和文) 遺伝子プロファイリングおよび細胞形態に基づく膵癌分子サブタイピング法の確立

研究課題名(英文) Establishment of immunohistochemical molecular subtyping based on gene expression profiling and morphology of pancreatic ductal carcinomas

研究代表者

三橋 智子 (Mitsuhashi, Tomoko)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：60348208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵癌における遺伝子発現プロファイリングに基づく免疫組織化学的(IHC)分子サブタイピング法の確立を試みた。IHC解析を用いて、膵癌分子サブタイプの構成シグニチャー分子群の予後解析を行ったところ、TFF1の低発現群およびCAV1、S100A2、NT5Eの高発現群で有意な全生存期間の短縮が認められた。IHCマーカーによって分子サブタイピングされた24症例に対し、遺伝子発現プロファイル解析を行ったところ、その妥当性が確認された。以上の結果より、膵癌の遺伝子発現プロファイルに基づくサブタイプをサロゲートするIHCマーカーにより分子サブタイピングが可能となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish the immunohistochemical (IHC) molecular subtyping that might be introduced to our daily practice on diagnostic surgical pathology, based on the gene expression profiles of pancreatic ductal carcinomas (PDACs). Tissue microarray blocks constructed by 155 cases of PDACs were used. IHC analysis was done by routine procedures. Gene expression profiling analysis was done using the GeneChip microarray system. Thirteen signature molecules forming molecular subtyping of PDACs were analyzed. The low expression group for TFF1 and the high expression group for either CAV1, S100A2 or NT5E showed a significant shortened overall survival. The gene expression profiling analysis for PDAC cases subtyped by IHC markers revealed that these IHC molecular subtypes were adequate. According to the above results, IHC markers that surrogate subtypes based on the gene expression profiles will enable the molecular subtyping of PDACs.

研究分野：診断病理学

キーワード：分子サブタイピング 膵癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌による国内の死亡者数は男女計年間約3万人を超え、なお増加傾向にある。化学療法などの集学的治療法の進歩により予後は改善傾向にあるが、膵癌患者の予後をさらに改善するためには、非切除腫瘍の治療成績の向上が不可欠であり、腫瘍ごとに認められる個別の特性(遺伝子発現プロファイリング)に基づいた薬物療法が求められている。近年、乳癌や肺癌ではその遺伝子発現プロファイリングや癌遺伝子依存(oncogene addiction)の原因となるdriver gene mutationの研究が進み、遺伝子異常に基づく分子病理診断により分子標的治療薬の選択が実施されている。

(2) 一方、浸潤性膵管癌(通常型膵癌)では腫瘍特性からその応用が遅れていたが、近年、網羅的遺伝子発現解析によるサブタイピングが公表され注目された(Collisson, et al. Nat Med, 2011)。この方法では62遺伝子のgene signatureにより、膵癌をclassical (CL)タイプ、quasimesenchymal(QM)タイプ、exocrine-likeタイプに分類可能となっている。注目すべきは膵癌の標準治療薬に対する感受性予測が可能である点で、gemcitabineへはQMタイプが、erlotinibへはCLタイプがより高い感受性を示すことが示されている。

2. 研究の目的

本研究では、通常型膵癌(浸潤性膵管癌)においてみられる特徴的な細胞形態および分子生物学的情報に基づき、ルーチン導入可能な免疫組織学的手法(IHC)を主体とする分子サブタイピング法の確立を試み、さらにこのサブタイプ間の遺伝子発現プロファイル解析から新規治療標的分子の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) 膵癌組織マイクロアレイ(TMA)標本の作製:浸潤性膵管癌と病理診断された195症例のうち、術前治療未施行の155例のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織検体を用いて、TMA標本を作製した。

(2) TMA標本を用いたIHC解析:Collissonらにより報告された膵癌分子サブタイプの構成シグニチャー分子群についてIHC解析を行った。IHC解析は、常法(Dako Envision FLEX system; Agilent社)に従い行った。IHC解析後の定量的解析はHスコア法によるスコア化(スコア範囲0~300; Behrens C. et al. Clin Cancer Res, 2008)

(3) FFPE組織検体を用いた遺伝子発現プロファイル解析:FFPE組織標本上からレーザーマイクロダイセクション(LMD 6500; Leica社)を用いて腫瘍組織の採取を行ったのち、RNA

抽出(Reliascript™ FFPE Total RNA Miniprep; Promega社)を行った。抽出RNAの収量および純度を確認した後、cRNA増幅・ss-cDNA合成(GeneChip™ WT Pico Kit; Thermo Fisher Scientific社)を行い、マイクロアレイ解析(GeneChip™ Human Transcriptome Array 2.0; Thermo Fisher Scientific社)に供した。

4. 研究成果

(1) 膵癌に特徴的な特徴的な細胞形態に基づく分類:膵癌TMA標本155例において、細胞・組織形態を観察し、核所見と細胞質所見に着目した分類した結果、膵癌の細胞亜型別の特徴的細胞像は、好酸性型(12例)、好酸性型(125例)、粘液型(14例)、混合型(4例)の4型に亜分類され、好酸性細胞質(+)かつ細胞質粘液(±)で、立方状~多角形の細胞形態と高度な核異型を有する好酸性型が全体の80%以上を占めることが明らかとなった(図1)。またこれら細胞亜型と膵癌関連MUCタンパク発現(MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6)の関係について検討したところ、MUC1と有意な相関が認められた(p=0.030)。

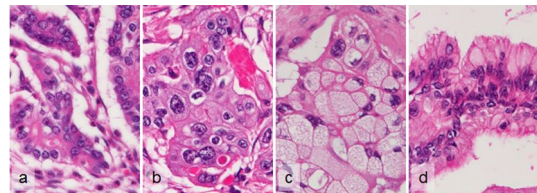


図1 細胞亜型別の特徴的細胞像
a:好酸性型, b:好酸性型, c,d:粘液型

(2) 膵癌分子サブタイプの構成シグニチャー分子群についてIHC解析:膵癌TMA標本を用いて、CLタイプの分子であるTSPAN8, S100P, MUC13, TFF1, TFF3, LGALS4, ERBB3の7分子とQM-PDAタイプの分子であるCAV1, KRT14, S100A2, NT5E, PHLDA1, HK2の6分子の免疫組織化学解析を行い、その後予後解析を行った(図2, 図3)。

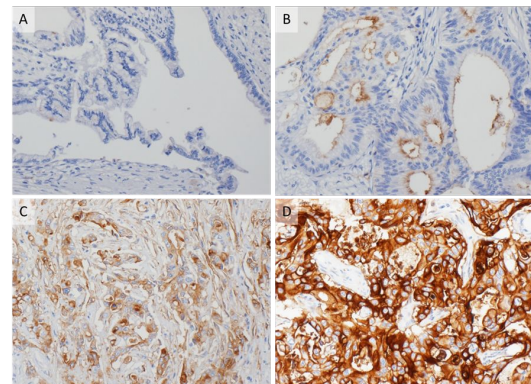


図2 膵癌TMA標本におけるNT5E発現
a:陰性例, b,c,d:弱・中等度・強陽性例

CL タイプでは、TFF1 発現に有意な関連性がみられ、陽性群で生存期間延長(OS; P=0.048)が認められた。また、QM-PDA タイプでは、CAV1(OS; p<0.001), S100A2(OS; P=0.034), NT5E(OS; p<0.001)と 3 分子で有意な関連性がみられ、陽性群で生存期間短縮が認められた。

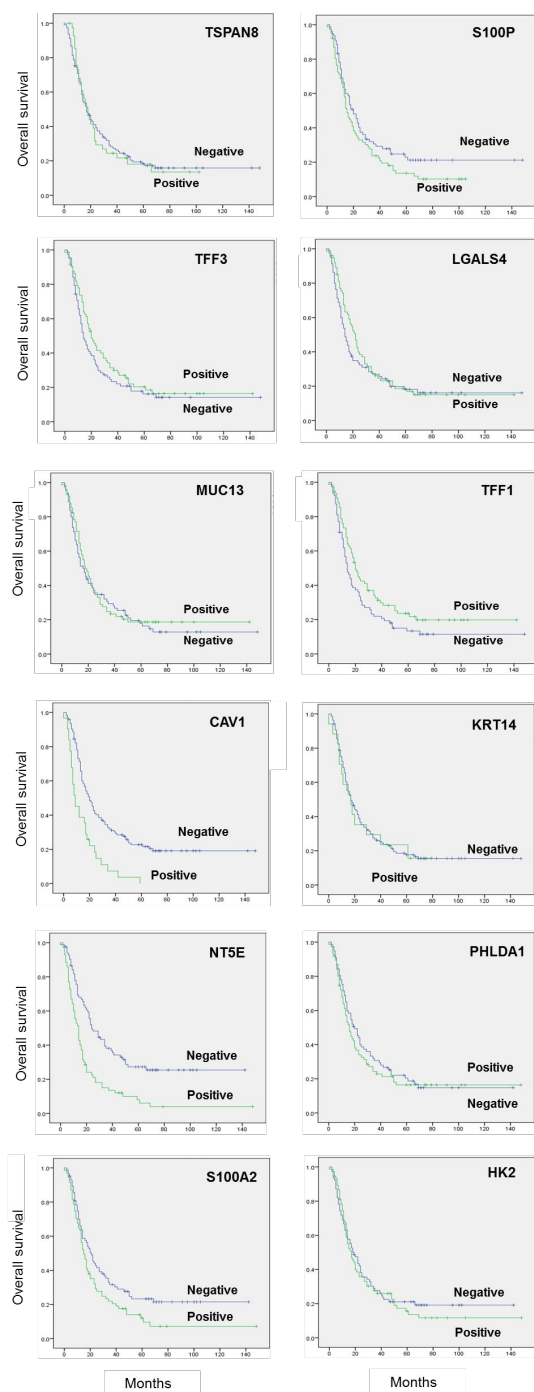


図3 膵癌分子サブタイプの構成シグニチャー分子における予後解析の結果

(3) IHC 法による分子サブタイピングの妥当性検討：NT5E などの IHC マーカーによって CL タイプおよび QM タイプにサブタイピングされた 24 症例に対し、マイクロアレイを用

いた遺伝子発現プロファイル解析を行い、IHC 法による分子サブタイピングの妥当性について検証を行った。その結果 IHC サロゲート候補マーカーで選択された症例は、それぞれ対応する CL タイプおよび QM タイプの遺伝子発現シグネチャーを有することが確認された。

(4) 以上の結果より、膵癌分子サブタイプの構成シグニチャー分子群による分子サブタイピングをサロゲートする IHC マーカーが同定された。同定されたマーカーのうち、NT5E については、免疫チェックポイント阻害治療のひとつである PD-1/PD-L1 治療の効果予測マーカーとしても注目されることから、本 IHC サブタイプが今後治療と直結する可能性が示唆された。今後切除不能膵癌症例の EUS-FNA 検体を用いて、本法を用いてサブタイピングを行い、治療効果との関係性についてさらに検証を行い、臨床導入に結びつける予定である。

<引用文献>

Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med.* 2011; 17: 500-3.
Behrens C, Lin HY, Lee JJ, et al. Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the pathogenesis of lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 6014-22

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 2 件)

Sato D, Tsuchikawa T, Mitsuhashi T, Hatanaka Y, Marukawa K, Morooka A, Nakamura T, Shichinohe T, Matsuno Y, Hirano S. Stromal palladin expression is an independent prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One.* 2016; 11: e0152523 (査読有)
Kubota Y, Kawakami H, Natsuizaka M, Kawakubo K, Marukawa K, Kudo T, Abe Y, Kubo K, Kuwatani M, Hatanaka Y, Mitsuhashi T, Matsuno Y, Sakamoto N. CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing. *J Gastroenterol.* 2015; 50: 203-10 (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

諸岡 亜早美, 畑中 豊, 丸川 活司, 上野 峰, 平野 裕子, 奥村 麻美, 畑中 佳奈子, 平野 聡, 松野 吉宏, 三橋 智子. 膵管癌における NT5E 発現における臨床病理学的検討. 第 105 回日本病理学会総会, 仙台国際センター (宮城県仙台市), 2016 年 5 月

Marukawa K, Mitsuhashi T, Hatanaka Y, Morooka A, Sato D, Nitta T, Nakamura T, Hirano S, Matsuno Y. Clinicopathological significance of MUC13 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC); the positive prognostic marker and possible candidate for molecular targeted therapy. 2016 Annual Meeting, United States and Canadian Academy of Pathology, Washington State Convention Center, MA, USA, March 2016

丸川 活司, 畑中 豊, 諸岡 亜早美, 佐藤 大介, 清水 知浩, 畑中 佳奈子, 中村 透, 三橋 智子, 平野 聡, 松野 吉宏. 膵管癌における MUC13 発現の臨床病理学的検討. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015 年 4-5 月

〔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 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
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

三橋 智子 (MITSUHASHI, Tomoko)
北海道大学・大学病院・准教授
研究者番号 : 6 0 3 4 8 2 0 8

(2) 研究分担者

畑中 豊 (HATANAKA, Yutaka)
北海道大学・大学病院・特任講師
研究者番号 : 3 0 5 8 9 9 2 4

(3) 連携研究者

松野 吉宏 (MATSUNO, Yoshihiro)
北海道大学・大学病院・教授
研究者番号 : 0 0 1 9 9 8 2 9

平野 聡 (HIRANO, Satoshi)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号 : 5 0 3 2 2 8 1 3