

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 江藤 和範

### 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

【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glob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 =  $401 \pm 745$  :  $1013 \pm 2745$ ,  $p = 0.0494$ )。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の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テガフルと 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.