

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 久保田 良政

学位論文題名

膵充実性偽乳頭腫瘍における超音波内視鏡下穿刺吸引生検検体と次世代シーケンサーを用いた CTNNB1 遺伝子変異解析に関する研究

(CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing)

【背景と目的】 膵充実性偽乳頭腫瘍 (SPN) はまれな腫瘍であり、膵腫瘍のうち 0.2-2.7% を占め、若年の女性に好発する。約 15% に転移を認めるが、外科的切除により予後は良好で 5 年生存率は 95% 以上である。典型的には石灰化を有し、充実成分と嚢胞成分からなる腫瘍である。組織学的には結合性の弱い monomorphic な上皮細胞が、充実性および線維血管軸を中心として偽乳頭状構造を形成する。免疫組織化学的には β -catenin に対する染色性が特徴的であり、正常細胞では細胞壁が染まるのに対し、腫瘍細胞は細胞質や核が濃染される。 β -catenin は生体内において 2 つの役割を持つ。cadherin を介した細胞接着因子の 1 つとしての働きと、Wnt シグナル伝達経路における転写制御因子としての働きである。 β -catenin は Wnt が受容体に作用していない状態では、リン酸化を受け、プロテアソームにより分解される。一方、Wnt が受容体と結合すると、 β -catenin のリン酸化は抑制され、安定化した β -catenin は細胞内に蓄積、核内へ移行して TCF/LEF ファミリーの転写因子と複合体を形成し、標的遺伝子の転写活性化を引き起こす。超音波内視鏡下穿刺吸引生検 (EUS-FNA) は膵の充実性腫瘍の診断において安全かつ有効な方法であり、SPN の術前診断の正診率に関しては 75%-100% と報告されている。次世代シーケンシング (NGS) の出現により、短時間・低コスト、かつ少量の検体からのシーケンシング可能となった。これまでに針生検検体を用いた NGS の有用性に関する報告はある。しかし、これまでに EUS-FNA 検体を用いた NGS の有用性に関する報告は認められなかった。本研究では、EUS-FNA 検体を用いた NGS による deep sequencing の可能性を調べるために、膵疾患検体における CTNNB1 の exon3 の変異解析を行った。

【対象と方法】 北海道大学病院において 2008 年 12 月から 2013 年 6 月の間に、膵疾患に対して EUS-FNA を施行した 35 症例、および外科切除が施行された 3 症例を用いて解析を行った。疾患の内訳は SPN が 7 例、膵癌が 16 例、膵神経内分泌腫瘍 (PNET) が 11 例、膵腺房細胞癌が 1 例、膵炎が 3 例であった。EUS-FNA に用いた内視鏡は GF-UCT240-AL5、穿刺針は 22G の Echotip Ultra を用いた。得られた検体を用いて、迅速細胞診、組織診断が行った。組織検体の一部は直接 RNeasy に浸した後に、DNA・RNA の抽出に用いた。DNA・RNA は AllPrep® DNA/RNA/Protein mini kit、QIAamp® DNA FFPE tissue kit を用いて抽出した。RNA はその後 SuperScript® II Reverse Transcriptase を用いて逆転写を行った。gDNA・cDNA と Advantage® 2 PCR Kit を用いて PCR を行ったのち、アガロースゲルで電

気泳動を行い DNA を精製した。得られた検体を Ion OneTouch™ 200 Template kit v2、Ion PGM™ 200 Sequencing Kit、Ion PGM™ を用いてシーケンスを行った。得られた配列は hg19 を参照配列とし mapping を行い、変異の検出は Ion Torrent Suite v2.2 software を用いた。また精製後の検体と The BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Standard Kit を用いて direct sequence を行い、Sequence Scanner Software2 version 2.0 を用いて解析を行った。変異の検出は CTNNB1 の exon3 の全 228 bp を参照配列とし、BLAST® にて行った。

【結果】 NGS 全の結果、SPN 症例は全例で CTNNB1 の exon3 にミスセンス変異を認められた。PDAC、ACC、自己免疫性膵炎や腫瘍形成性膵炎では変異を認めなかった。PNET 症例では 1 例にのみミスセンス変異を認めた。変異の認められたコドンは、コドン 32 が 3 例、37 が 2 例、41 が 2 例だった。変異を認めた塩基の coverage は 4,490 から 203,919 で変異頻度は 5.39% から 48.77% だった。変異のみられなかった症例では、平均 coverage は 113 から 8,027 で中央値は 7,312 だった。SPN 6 症例の検体を用いて direct sequencing を行ったが、BLAST® による解析では、1 例のみで変異の検出が可能であった。

【考察】 SPN でこれまでに 83%-100% の頻度で CTNNB1 の exon3 に変異を起こすことが報告されている。コドン 32、33、34、37、41 の 1 塩基によるミスセンス変異とコドン 28 から 32 にかけての 12 塩基の欠損が報告されており、Serine 33 と 37、threonine 41 は GSK-3β-APC-Axin 複合体によるリン酸化部位として知られている。Serine 33 と 37 がリン酸化を受けると、β-TrCP1 に認識され Codons 32、33、34、36、37 と結合がおこる。すると β-Catenin のユビキチン化がおこり、分解される。これらの部位の変異により細胞質において、β-Catenin の異常な安定化をきたし核内移行が促進される。変異解析の手法としては direct sequencing、HE 染色、免疫組織化学、FISH 法、PCR など、いくつかの方法がある。Direct sequencing が至適基準とされたが、低頻度の変異を検出できないこと、結果の解釈に経験を要することなどが欠点として挙げられる。本研究では direct sequencing では NGS で検出した 7 つの変異のうち、1 つのみが検出可能であった。EUS-FNA 検体では血液や穿刺経路の組織の混入を認めるため、direct sequencing に比し NGS の有用性が示唆された。これまでに PNET においては CTNNB1 変異の報告がない。33 例の PNET の解析では CTNNB1 に変異はみられなかった。また PNET の遺伝子変異に関して、Jiao らは、10 例の PNET 検体を用いて、18,000 におよぶ exon 解析を行い、新規に DAXX や ATRX の変異を報告したが、CTNNB1 の変異は検出されなかった。他臓器の神経内分泌腫瘍に関しては、胸腺神経内分泌腫瘍における変異の報告、や回腸神経内分泌腫瘍細胞株における報告がある。本研究において CTNNB1 に変異が認められた PNET 症例は、典型的な画像所見と EUS-FNA 検体による病理所見、免疫組織化学所見により診断された。Ki-67 index が 1–2% であり、WHO2010 分類では NET G1 の診断であった。高齢と、上述の診断により手術は施行されていない。SPN と PNET は重要な鑑別診断として挙げられ、特に β-Catenin に対する染色性の違いは重要な鑑別点となる。今後 PNET における CTNNB1 の変異の頻度や病態における意義の解明も望まれる。

【結論】 SPN をはじめとした膵 EUS-FNA 検体と NGS を用いた、deep sequencing による変異解析が十分に可能であった。