



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1508号
学位記番号	第1079号
氏名	堀 寧
授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Impact of TP53 codon 72 and MDM2 SNP 309 polymorphisms in pancreatic ductal adenocarcinoma (膵管腺癌における TP53 経路の異常：とくに TP53 codon 72 と MDM2 SNP309 の変異パターンについて)</p> <p>PLoS One. 2015; 10(3): e0118829</p>
論文審査担当者	<p>主査： 稲垣 宏 副査： 大原 弘隆, 城 卓志</p>

<はじめに>

膵管腺癌は、我が国では毎年3万人以上が亡くなり、癌による死亡原因では、男性で5位、女性で6位となる頻度の高い疾患である。さらに癌治療法の進歩により各種悪性腫瘍の5年生存率は、例えば乳癌では90%、胃癌では70%の生存率である中で、膵臓癌のそれは依然として6.8%と低く、極めて難治性の疾患であることでも良く知られている。今後、その予後を改善するには、なによりも早期癌検出の診断法と治療成績の評価法の開発が急務であり、特に早期診断のためにその前癌病変を正確にとらえなければならない。この前癌病変は、これまで膵管内に生じる円柱上皮性の上皮増殖病変として知られ、Pan INと定義されている。この前癌状態のPan IN発生からおおよそ10年程を経過して浸潤癌が発生すると考えられ、Pan INの悪性度が増すに従い、様々な遺伝子座に変異が起こり、とくに癌抑制遺伝子として広く認知されている*p53*経路に変異が多発すると報告されている。本報告ではこの*p53*経路内の高変異部位として他癌においても報告されている*Tp53 codon72*、*MDM2 SNP 309*に注目し、その変異を膵管腺癌とその前癌病変と言われる慢性膵炎の組織切片内で測定し、変異増加の有無を検討比較した。

<方法>

1997年より2010年までに名古屋市立大学病院にて集積された膵管腺癌32例、慢性膵炎16例、正常膵組織32例のパラフィン切片の膵管上皮をH-E染色で確認し、顕微鏡下にmicro dissectionした。その組織よりDNAを抽出し、それを鋳型にTaqMan® SNP Genotyping assayを使用し7500 FAST Real-Time PCRにて、*TP53 codon72 (rs1042522)*、*MDM2 SNP 309 (rs2279744)*の二座位について遺伝子多型解析を行った。そして臨床的背景をもとに、各多型についてKaplan-Meier (K-M)法による生存期間測定を行った。さらにTP53とMDM2の免疫染色と、その遺伝子多型を比較してその相互関係について評価した。

<結果>

- ① *TP53 Pro/Pro* 遺伝子型は、膵管腺癌において、慢性膵炎組織、正常膵組織と比較して有意に高い傾向にあった（腺癌；*Pro/Pro*:65.6%、*Arg/Pro*:28.1%、*Arg/Arg*:6.25%、慢性膵炎；*Pro/Pro*:37.5%、*Arg/Pro*:50%、*Arg/Arg*:12.5%、正常；*Pro/Pro*:15.6%、*Arg/Pro*:50%、*Arg/Arg*:34.4%）（腺癌 対 正常； $p<0.001$ OR 10.31, 95% CI 3.17-33.24）。一方、慢性膵炎と正常組織では有意差は見受けられなかった（慢性膵炎 対 正常； $p=0.144$ ）。
- ② *MDM2 SNP309* 遺伝子型では三群間で有意差は見受けられなかった（腺癌；*GG*:21.9%、*GT*:43.8%、*TT*:34.4%、慢性膵炎；*GG*:31.3%、*GT*:25%、*TT*:43.8%、正常；*GG*:28.1%、*GT*:37.5%、*TT*:34.4%）（腺癌 対 正常； $p=0.774$ 、慢性膵炎 対 正常； $p=0.822$ ）。
- ③ 次に遺伝子型と予後との比較検討を行ったところ、K-M法による生存期間測定では膵管腺癌の*MDM2 G/G* 遺伝子型は他の遺伝子型（*G/T*と*T/T*）と比較して有意に短かった（359日対911日、 $p=0.016$ ）。その一方で、*TP53 Pro/Pro* 遺伝子型では差がなかった（638日対752日、 $p=0.471$ ）。Cox比例ハザードモデルで様々な因子（年齢、性別、喫煙、body mass index、TMNステージ、遺伝子型、免疫染色異常）に関して回帰分析を行ったところ予後に関与しているのは*MDM2*の遺伝子型のみであった。
- ④ TP53免疫染色では、膵管腺癌においてTP53は53.1%、MDM2は34.4%と高率に発現が見られたが、両者の発現パターンと遺伝子多型との相関関係は見受けられなかった。

以上のように今回の検討では*TP53 codon72*の*Pro/Pro*遺伝子型は膵管腺癌において有意に高率

に発現し、癌化に影響している一方で予後には直接の相関がなく、*MDM2 SNP309* は予後予測因子となる可能性が示唆された。

<考察>

p53 経路は細胞の成長と分裂を支配する重要な遺伝子経路であるが、その *exon4* に位置する *codon72* の *Arg* から *Pro* への変異は細胞成長抑制とアポトーシスを引き起こすことでも知られている (Grochola *et al.* 2010)。この結果をもとに末梢血液内細胞の DNA を用いて、*codon 72* 多型をヒト集団内で調べたところ *Pro/Pro* 遺伝子型の個体群がその他の遺伝子型の群よりも odds ratio 1.73 の高率で膵癌を発症する事が報告されている (Naccarati *et al.* 2010)。さらに *MDM2* と呼ばれる、*p53* と結合しユビキチンリガーゼの作用によりユビキチン化し *p53* の分解を行うタンパクも *p53* 経路の活動性において重要と考えられており、その活動を担っている *SNP309* の *T* から *G* への変異が膵癌患者の予後に寄与しているとの報告がある (Asomaning *et al.* 2008)。しかし、血液での報告がある一方、組織での報告はなく、我々はそれら遺伝子型について、今回はじめて膵管腺癌における組織での変異の報告を行った。その結果、上記のように *TP53 Pro/Pro* 遺伝子型は、膵管腺癌において、慢性膵炎組織、正常膵組織と比較して有意に高い傾向にあった。さらに比較検討している正常群の妥当性を評価するために、同人種における同遺伝子の発現割合を調べ、Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) による検討を行った。*TP53 codon72* の正常群、*MDM2 SNP309* の遺伝子型は全て HWE を満たしていた。一方、膵管腺癌と慢性膵炎の *TP53 codon72* は HWE を満たしていなかった (膵管腺癌 ($\chi^2=78.95$, $p < 0.001$)、慢性膵炎 ($\chi^2=10.44$, $p < 0.005$))。その可能性として膵管組織においては、癌化あるいは慢性炎症化にともない高頻度の体細胞突然変異が起こっている可能性が考えられた (Hori *et al.* 2015)。今後は、現在診断目的に臨床的に広く利用されている超音波内視鏡下生検へ応用することで、診断率の向上、予後予測、薬剤感受性の推測などへの寄与が期待される。

Asomaning *et al.* (2008). Clin Cancer Res.14:4010

Grochola *et al.* (2010). Cold Spring Harb Perspect Biol. 2:a001032.

Hori *et al.* (2015). PLoS One.10:e0118829.

Naccarati *et al.* (2010). Carcinogenesis. 31:666.

論文審査結果の要旨

1. 審査論文の要旨

【目的】膵管腺癌は、極めて難治性の疾患である。その予後を改善するには、早期癌検出の診断法と治療成績の評価法の開発が急務である。われわれは癌抑制遺伝子として広く認知されている *p53* 経路内の高変異部位として他癌においても報告されている *Tp53 codon72*、*MDM2 SNP 309* に注目し、その変異を膵管腺癌とその前癌病変と言われる慢性膵炎の組織切片内で測定し、変異増加の有無を検討比較した。

【方法】膵管腺癌 32 例、慢性膵炎 16 例、正常膵組織 32 例のパラフィン切片の膵管上皮を顕微鏡下に micro dissection し、DNA を抽出した後、Real-Time PCR 法にて、*TP53 codon72 (rs1042522)* および *MDM2 SNP 309 (rs2279744)* の二座位について遺伝子多型解析を行った。そして各多型について Kaplan-Meier (K-M) 法による生存期間測定を、さらにそれぞれの免疫染色と、その遺伝子多型を比較してその相互関係について評価した。

【方法と結果】*TP53 Pro/Pro* 遺伝子型は、膵管腺癌において正常組織と比較して有意に高い傾向にあった (65.6% 対 15.6%, $p < 0.001$)。一方、慢性膵炎 (37.5%) と正常組織では有意差は見受けられなかった。*MDM2 SNP309* では三群間で有意差は見受けられなかった。同人種における同遺伝子の発現割合を調べ、Hardy-Weinberg 平衡 (HWE) による検討を行ったところ、*TP53 codon72* の正常群、*MDM2 SNP309* の遺伝子型は全て HWE を満たしていた。一方、膵管腺癌と慢性膵炎の *TP53 codon72* は HWE を満たしていなかった (膵管腺癌 ($\chi^2=78.95$, $p < 0.001$)、慢性膵炎 ($\chi^2=10.44$, $p < 0.005$))。その可能性として膵管組織においては、癌化あるいは慢性炎症化にともない高頻度の体細胞突然変異が起こっている可能性が考えられた。K-M 法による生存期間測定では *MDM2 G/G* 遺伝子型は他の遺伝子型 (*G/T* と *T/T*) と比較して有意に短かった (359 日対 911 日, $p = 0.016$)。その一方で、*TP53* では差がなかった (638 日対 752 日, $p = 0.471$)。TP53 免疫染色では、膵管腺癌において 53.1% と高率に発現が見られたが遺伝子多型との相関関係は見受けられなかった。

【結論】*TP53 codon72* 遺伝子型は発癌因子となる可能性があり、その一方で *MDM2 SNP309* は予後の規定因子となる可能性が示唆された。今後は、現在診断目的に広く利用されている超音波内視鏡下生検へ応用することで、診断率の向上、予後予測、薬剤感受性の推測などへの寄与が期待される。

2. 審査内容の要旨

主査の稲垣から、polymorphism の定義、p53、MDM2 免疫染色の分子生物学的意義など 7 項目、第一副査の大原教授からは、膵異型上皮から膵癌への進展と本 polymorphism との関連、慢性膵炎における本 polymorphism の意義など 6 項目、第二副査の城教授からは専門領域に関連して、膵癌の内科的治療について、最近承認された新規腫瘍マーカーの有用性についてなど 4 項目の質問があり、おおむね満足する回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、消化器内科学に関する知識を有していると考えられた。本研究は *TP53 codon72* 遺伝子型の発癌因子となる可能性および *MDM2 SNP309* が予後因子となる可能性を示した有用な研究と考えられた。以上より本論文の筆者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。