

膵腫瘍における Fluorescence in situ Hybridization 法を中心とした染色体・遺伝子検討とその臨床応用

名古屋市立大学大学院医学研究科

地域医療学寄付講座 特任助教 宮部勝之

名古屋市立大学大学院医学研究科

消化器・代謝内科学 准教授 中沢貴宏

名古屋市立大学大学院医学研究科

消化器・代謝内科学 大学院生 堀 寧

[要旨]

近年, 膵臓癌・胆管癌での内視鏡的ブラシ細胞診検体を用いた Fluorescence in situ hybridization (FISH)法の有用性が報告されつつある。しかしながら、本法を用いた膵疾患の染色体・遺伝子異常の報告は少ない。我々は膵管内乳頭腫瘍(IPMN)や自己免疫性膵炎(AIP)における染色体・遺伝子変異の比較検討を、FISH法を使用して用いて行った。まず IPMN28例にて検索したところ、非腫瘍性上皮と非浸潤性上皮との比較では6番染色体ポリソミー、*p16*欠失、*p53*欠失が有意に多く、非浸潤性上皮と浸潤性上皮との比較では6番・18番染色体ポリソミー、*p16*欠失、*p53*欠失が有意に多かった。*p53*の欠失はすべて homozygous deletionであった。膵癌21例 AIP11例、非特異的慢性膵炎11例にてさらに検討を行ったが、*p16*、*p53*の FISH法では膵癌でみられたような明らかな欠失を認めなかった。現在 IPMNに関する論文を執筆中であると共に、他の遺伝子異常の検討を、FISH法およびPCR法にて施行中である。

[目的]

膵癌においては関連のみられる遺伝子として主に *k-ras*、*p16*、*P53*、*SMAD4* が関連していることが網羅的検索にて明らかにされているものの(Jones S, et al. Science 2008;321:1801-6, Biankin AV, et al. Nature 2012;491:399-405)、これらの遺伝子異常と疾患悪性度との関連が十分には解明されていない。また、膵腫瘍を FISHにて検討した報告は国際的にも少なく、特に国内からの報告は極めて少数であり、胆道内視鏡にて採取し

た細胞診標本にて、膀胱癌診断用に開発された標識プローブである Urovision® (Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL) を用いて FISH 法を行い追加診断したところ、診断の正診率が上がることが報告されたものの、膀胱癌用に作成された本プローブが胆道・膵臓腫瘍にとって最も優れた診断プローブであるかどうかの検討が全くなされておらず、また細胞診 FISH 法を国内で実施していない。今回、我々は、「膵腫瘍の治療向上に役立つ遺伝子変異の発見、および内視鏡的に採取したごく小さな組織標本での早期膵癌診断の確立」を目的とし、FISH 法を中心とした膵腫瘍の検討を行うこととした。

#### [方法]

IPMN、膵管癌、AIP 約 20 例の膵切除標本を用いて、膵管上皮に FISH 法を行う。FISH 法で行う検索としては、過去の文献で膵癌にて染色体・遺伝子増幅がみられたものを検討する。

##### ① 染色体数の検討

3 番・6 番・7 番・8 番・18 番をはじめとした各種セントロメア FISH probe を使用し、染色体の ploidy (polysomy や monosomy) を調べる。200 個以上の有効細胞を計測後、1 個以下のシグナルを認める割合が、Normal 群の平均値+3SD 以上の割合を認めた症例を monosomy、3 個以上のシグナルを認める割合が、Normal 群の平均値+3SD 以上の割合を認めた PDA 症例を polysomy と判定した。

##### ② 遺伝子欠失や増幅の検討

*p16*、*TP53*、*PTEN*、*HER2*、*EGFR* といった遺伝子を FISH probe で調べる。遺伝子欠失 (deletion) の検討では、200 個以上の有効細胞を計測後、*p16* (red, *p16*-9p22; green, control-9q22)、*p53* (red, *p53*-17p13; green, control-centromere 17) の FISH 法を施行し、標的遺伝子座のシグナルとコントロールシグナル比を算出、誤差も含め 0.35~0.65 であった場合を、1 本のみ遺伝子が欠失した hemizygous deletion、0.35 未満である場合を 2 本とも遺伝子が欠失した homozygous deletion と判定した。

#### [結果]

今回は、外科的に切除された IPMN 切除標本 28 例を非浸潤性 IPMN 17 例 (low-grade dysplasia, intermediate-grade dysplasia, high-grade dysplasia) および浸潤性 IPMN 11 例 (IPMN with an associated invasive carcinoma) に分類した。非浸潤性 IPMN からは非腫瘍性上皮および非浸潤性上皮を、浸潤性 IPMN からは非腫瘍性上皮、非浸潤性上皮、および浸潤癌上皮をピックアップし、染色体 3、6、7、8、17、18 番、*p16*、*p53* について FISH 法を施行し比較した。

浸潤癌上皮においては、1つの症例を除き、いずれかの染色体におけるポリソミーもしくは欠失を認めた。*p16*においては、浸潤癌上皮 11 病変中 6 カ所 55%にて欠失を認め、そのうち 4 病変(36%)は hemizygous deletion、2 病変(18%)は homozygous deletion であった。*p53*においては、浸潤癌上皮 8 病変(73%)の症例に欠失を認め、全例が hemizygous deletion であった。非浸潤性上皮においては、28 病変中 17 病変において、いずれかの染色体におけるポリソミーもしくは欠失を認めた。*p16*は、非浸潤性上皮 28 カ所中 4 カ所 14%にて欠失を認め、そのうち 3 例(11%)は hemizygous deletion、1 例 4%は homozygous deletion であった。*p53*においては、非浸潤性上皮 2 例 7%の症例に欠失を認め、全例が hemizygous deletion であった。非腫瘍性上皮においては、28 病変全てにおいて、FISH 法では染色体・遺伝子異常を認めなかった。

以上を対応のある 2 群の検定(McNemer 検定)にて検定したところ、非浸潤性上皮では、非腫瘍性上皮より 6 番ポリソミーと *p16*欠失が有意に多く(それぞれ  $p=0.0082$ ,  $p=0.0455$ )、浸潤癌上皮では非腫瘍性上皮より 7 番ポリソミー、18 番ポリソミー、*p16*欠失、*p53*欠失が有意に多かった(それぞれ  $p=0.0455$ ,  $p=0.0253$ ,  $p=0.0253$ ,  $p=0.0143$ )。

7 番ポリソミーと *p53*欠失の存在にて浸潤癌上皮と診断した場合、感度、特異度はそれぞれ 90.9%、94.1%であり、もっとも正確に診断しうる組み合わせであった。また IPMN を IPMN with low-grade dysplasia、IPMN with intermediate-grade dysplasia、IPMN with high-grade dysplasia で分けて検討した結果、特定の染色体・遺伝子異常を見出すことはできなかったが、IPMN with intermediate dysplasiaの方が染色体・遺伝子異常は有意に多数であった。(low dysplasia:平均 0 個 vs intermediate dysplasia:平均 0.7 個)。さらに IPMN 胃型・腸型に分けた検討もおこなったが(胃型 18 例、腸型 8 例)、検討した染色体・遺伝子においては、明らかな有意差を認めなかった。この結果を元に現在論文執筆中である。

次に、我々は膵管癌 21 例においても同様の FISH を行った。すべての膵管癌症例において、いずれかの染色体における polysomy もしくは欠失を認めた。*p16*においては、10 例 48%の症例に欠失を認め、そのうち 6 例(29%)は homozygous deletion、4 例(19%)は hemizygous deletion であった。*p53*においては、11 例 52%の症例に欠失を認め、そのうち 10 例(48%)は hemizygous deletion、1 例(5%)は homozygous deletion であった。

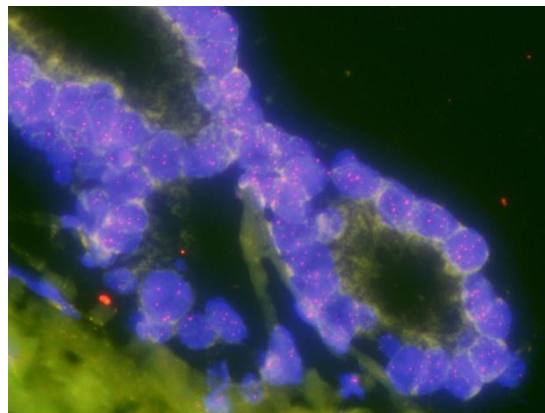
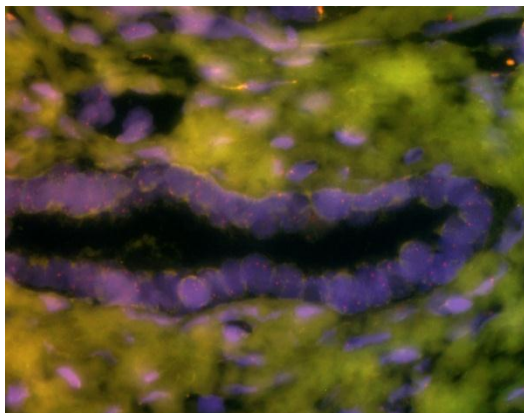
さらに、1 型 AIP 切除標本 11 例と非特異的慢性膵炎切除標本(CP) 11 例において、*p16*、*p53*の FISH 法を施行し検討したところ、標的遺伝子座のシグナルとコントロールシグナル比では 0.65 以下となる症例を認めなかったものの、一部の上皮で deletion を示唆される症例も見出された。また、*P16*、*P53*免疫染色も行ったところ、AIP や CP 症例において、*P16*

染色陰性の膵管上皮や *P53* 蛋白が異常集積した上皮も認められた。

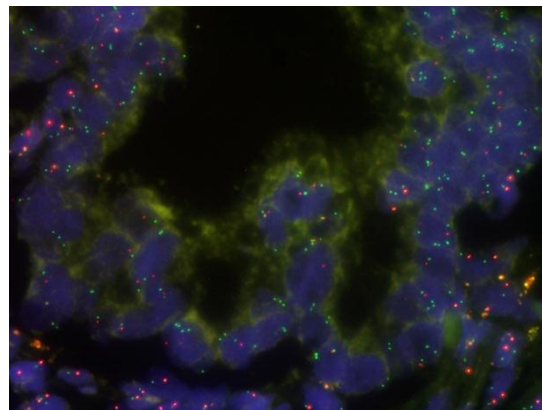
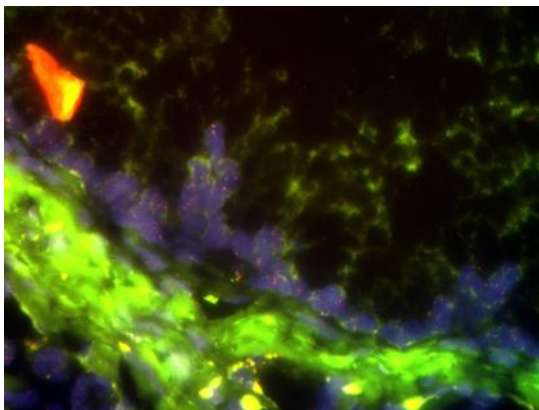
本検討の主題とは異なるが、本奨学金により購入したパソコンを使用し、自己免疫性膵炎 18 例、慢性膵炎 24 例、膵管癌 45 例の切除標本を用いて IgG4 染色、IgG 染色、IgG1 染色、CD138 染色を行い自己免疫性膵炎診断基準のさらなる知見を検索するための検討を行った。自己免疫性膵炎の診断においては、一視野 50 個以上の陽性細胞(切除標本。生検組織では 10 個以上)かつ IgG4/IgG 比 40%以上が病理学的診断基準とされている (Deshpande, V., Y. Zen, et al. (2012). "Consensus statement on the pathology of IgG4-related disease." *Mod Pathol* 25(9): 1181-1192.) が、平均何視野計測したらいいのか、また、他に IgG4/IgG1 比や IgG4/CD138 比を計測している論文もあり、その有用性を十分に検討する必要があると考えた。我々の検討では、高倍率で IgG4 の多いところから 3 視野計測し、平均値をとるのが、10 視野計測し、平均値をとるのとほぼ同等の正確性を持ち、さらには IgG4/IgG 比の計測は膵臓病変においては必要ないのではないかという結論を得た。この結果を基に論文を作成し、現在投稿中である。

<FISH 施行例>

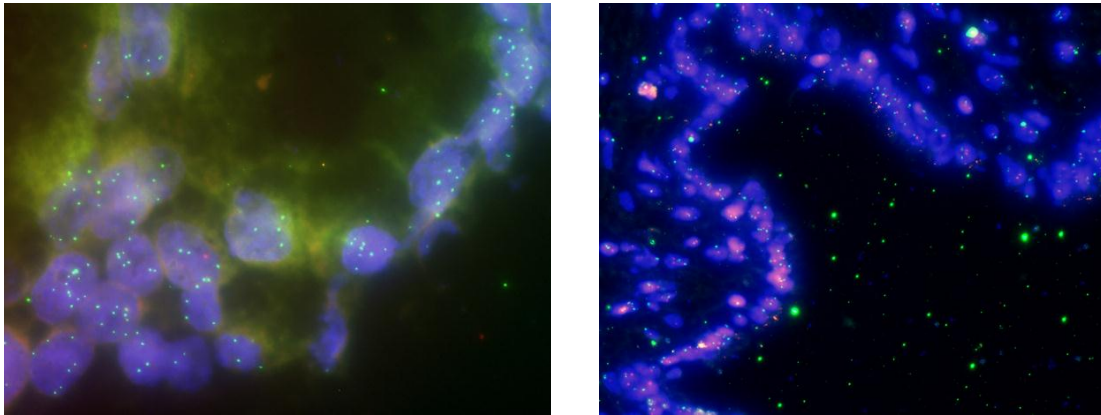
正常膵管 (centromere probe) polysomy (Ch. 8)



正常膵管 (locus specific probe) hemizygous deletion (red, *p16*; green, 9q22)



homozygous deletion (red, *p53*; green, Ch. 17) AIP FISH (red, HER2; green Ch. 17)



#### [考査]

IPMN と PDAC での検討では、FISH 法での polysomy、deletion の検出が認められた。特に IPMN においては、非腫瘍性上皮、非浸潤性上皮、浸潤癌上皮間において、特定の染色体・遺伝子異常に有意差がみられた。これらの違いが疾患の特徴に関係している可能性もあり、また、临床上においては生検や細胞診標本における術前診断に応用できる可能性がある。

AIP と CP におけるこれまでの検討では、*p16*、*p53* において、明らかな deletion を見出すことができていないが、一部の上皮で deletion を示唆される症例も見出された。免疫染色の結果も考え合わせると、AIP や CP においては、膵管上皮全体にわたる monoclonal な deletion は来さないものの一部の上皮にはモザイク的に deletion を来している可能性がある。したがって今後の予定として、免疫染色で異常を示した上皮を重点的に再度検討し直す、FISH を施行した膵管上皮は、PanIN 分類にてどの段階に位置するのかも検討し、PanIN の進行度と deletion の相関も検討する。さらに、現在、HER2 と PTEN の FISH プローブを購入し FISH を施行中である。また、FISH ではとらえられない micro deletion が腫瘍化に影響を及ぼしていることも十分考えられるため、AIP 症例の *p53* mutation を PCR 法にて検索しているところである。

#### [結語]

FISH 法を用いた染色体・遺伝子異常の検出は、IPMN を区別する有用な手法となり得る。また、現在膵管癌、AIP、CP のさらなる FISH 法、PCR 法を施行中であり、AIP や CP の腫瘍化へのメカニズムを解明できるものと期待される。