

氏 名	木村 朋子
<p>論文題目 The combination of strong immunohistochemical mtTFA expression and a high survivin index predicts a shorter disease-specific survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. (mtTFA と survivin の免疫組織学的高発現を組み合わせることによって、膵管状腺癌における疾患特異的生存率不良を予測し得る)</p> <p>論文要旨 <背景> 膵癌は日本で最も致死性の高い悪性腫瘍の一つで、中でも膵管状腺癌(PAC)が最も頻繁に見られる。PAC は早期発見が困難で手術不能例が多く、たとえ手術で完全切除し得たとしても術後再発率が高いため、予後を推測し得る生物学的マーカーを同定することは、術後補助療法や再発・転移時の治療を鑑みるに非常に有用である。ミトコンドリア DNA の維持と遺伝子発現において中心的な役割を演じるタンパクとして知られる mtTFA (mitochondrial transcription factor A)は、癌の増殖にとって重要である、アポトーシス回避にも密接に関与しているとされる。実際、いくつかの固形腫瘍では、mtTFA の発現増加が腫瘍の進展やアポトーシス抵抗性・予後不良との相関において重要な臨床的意義を持っていることが報告されているものの、PAC の臨床試料での発現解析は非常に少ない。我々のグループは近年、mtTFA がミトコンドリア内のみならず核内にも存在し、アポトーシス抑制タンパクファミリーの一員で核内に存在する survivin の遺伝子発現と密接に関連することを明らかにしている。そこで本研究では、PAC における mtTFA と survivin の発現の組み合わせが、様々な臨床病理学的特徴のみならず疾患特異的生存率 (Disease specific survival : DSS) ともどのように相関するのかを調査した。</p> <p><方法> 1) 抗体の作成 : mtTFA に対する合成ペプチドによりウサギポリクローナル抗体を作成し、western blot とペプチド競合法により抗体の特異性を確認した。Survivin 抗体は市販の抗体 (Santa Cruz Biotechnology 製、ウサギポリクローナル抗体)を用いた。</p> <p>2) 症例検討 : 産業医科大学病院において 1994 年から 2010 年までに、PAC のために膵頭十二指腸切除または膵尾部切除を施行され、予後追跡が可能な患者 70 例について臨床情報をカルテから収集した。</p> <p>3) 免疫組織化学染色と評価方法 : 特異的抗 mtTFA および抗 survivin 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、腫瘍内における染色陽性細胞の割合により mtTFA (細胞質に発現)では 30%をカットオフ値として強発現と弱発現に分けた。Survivin (核に発現)でも同様に、核の染色割合を確認し、10%をカットオフ値として高発現と低発現に分けた。</p> <p>4) 統計学的検討 : χ^2 検定を行い mtTFA および survivin の発現と臨床病理学的因子との関連を検討した。Kaplan-Meier 法で生存曲線を描き、log-rank 検定を施行した。さらに Cox 比例ハザードモデルによる単変量、多変量解析を行い、mtTFA と survivin 発現の組み合わせが PAC の予後規定因子になり得るかを検定した。</p> <p><結果> 免疫組織化学染色では、mtTFA は細胞質内のみ、survivin は核内のみ発現していた。70 例中、mtTFA 強発現は 27 例 (38.6%)、survivin 高発現も 27 例 (38.6%) であった。mtTFA、survivin 高発現症例は各々の低発現症例に比べて、有意に進行期癌が多く、低分化傾向であった。一方、組織学的な外科的断端陽性や、LI (リンパ管侵襲)(+)、V (血管侵襲)(+)、Ne (神経浸潤)(+)とは、それぞれ有意な相関はなかった。Kaplan-Meier 生存曲線では、術後 2 年間に於いて mtTFA 強発現症例では、弱発現症例に比べ DSS の有意な短縮が認められた。Survivin 高発現症例では、低発現症例に比べ DSS が短縮する傾向が認められたものの有意差はなかった。さらに、mtTFA と survivin が共に高発現している症例では、有意にリンパ節転移が多く、低分化傾向、かつ進行期癌であった。mtTFA/survivin 発現を弱/低 35 例(50.0%) ; 強/低 8 例(11.4%) ; 弱/高 8 例(11.4%) ; 強/高 19 例(27.2%)に分類して検討したところ、強/高の症例はその他の症例に比べ、有意に顕著な DSS の短縮が認められた。次に弱/低症例と強/低症例、弱/低症例と弱/高症例、および弱/高症例と強/低症例についてそれぞれ検討したところ、DSS に有意差はなかった。Cox 比例ハザードモデルによる単変量、多変量解析の結果、mtTFA と survivin の高発現(強/高症例)は、腫瘍サイズ (>2cm)、進行した pT (病理学的 T 分類)、進行期癌と共に PAC の独立した予後規定因子であることが示された。</p> <p><考察> PAC において mtTFA と survivin が高発現している症例ではその他の症例に比べ、有意にリンパ節転移、低分化、進行期癌の傾向を認め、術後の DSS も有意に短縮していた。さらに病理組織学的に、mtTFA と survivin の発現は共に浸潤先端部に高度に見られ、増殖能、浸潤能の亢進との相関が示唆される所見と考えられた。In vitro の先行研究によると、mtTFA が過剰発現した細胞では、対照群に比べより高い増殖能を示し、mtTFA を knockdown した細胞では増殖が抑制されていたと報告されている。また、シスプラチン抵抗性についての研究では、シスプラチン治療により mtTFA の発現レベルが上昇しアポトーシス回避につながっていたことが報告されており、mtTFA が癌の増殖に強く関与していることが示唆されている。In vivo では、最近になり他のグループより、PAC の術後患者において、mtTFA が癌細胞の抗アポトーシス効果を通じて臨床予後を悪化させる点で重要な役割を果していることが報告されており、我々の結果を支持している。本研究では、PAC の術後患者において初めて、mtTFA と survivin の高発現の組み合わせが、DSS を予測する独立した一因子であるということが示された。さらに、特に術後最初の 2 年間に於ける DSS の新しい予後マーカーであるということも同時に示された。また、mtTFA に survivin 発現を組み合わせることによって、mtTFA 単独より強力に DSS を予測し得ることも判明した。我々のグループは以前に、survivin のプロモーター領域に 2 つの mtTFA 結合部位があることを報告しており、mtTFA が survivin の遺伝子発現と強く関連していることを明らかにしているが、今回の研究では、mtTFA と survivin の 2 つのタンパクの関係が相補的でも競合的でもなかったことから、この 2 つの細胞増殖マーカーは同時に発現しつつも別々に機能しているという、興味深い可能性を指摘するに至った。今後、術後早期に、腫瘍切片の mtTFA および survivin の発現を評価することにより、PAC の臨床病理学的悪性度や予後不良を予測し、術後補助療法を行う患者をより適切に、より早期に選択し得るということを含め、疾患管理においても、これらのマーカーは非常に役立つ可能性がある。</p> <p><結論> PAC において mtTFA と survivin の高発現を組み合わせることは DSS 不良を予測する。術後早期において mtTFA・survivin 両者の発現を評価することは、PAC の治療方針決定や疾患管理において有用な指標となる可能性があるといえよう。</p>	

学位論文審査結果要旨

氏 名	木村 朋子						
論文審査委員	主査	所属	障害機構	系	病態機構	部門	久岡 正典 ㊞
	副査	所属	環境・産業生態	系	保健・疫学	部門	松田 晋哉 ㊞
			障害機構	系	災害医学	部門	原田 大 ㊞
				系		部門	㊞
				系		部門	㊞
<p>論文題目</p> <p>The combination of strong immunohistochemical mtTFA expression and a high survivin index predicts a shorter disease-specific survival in pancreatic ductal adenocarcinoma (mtTFA と survivin の免疫組織化学的高発現を組み合わせることによって、膵管状腺癌における疾患特異的生存率不良を予測し得る)</p> <p>学位論文審査結果要旨</p> <p>膵癌は日本において最も致死率の高い予後不良な悪性腫瘍の一つであり、その制圧は今日の大きな課題の一つとなっている。特に、効果的な治療法の開発に加え、早期発見や膵癌患者の予後予測に結びつく因子やマーカーを見出すことは重要である。ミトコンドリア DNA の維持や修復などに中心的な役割を演じている mitochondrial transcription factor A (mtTFA) は、腫瘍細胞の増殖やアポトーシスの回避にとっても重要な上、その発現が大腸癌等のいくつかの癌で予後と関係していることも近年報告されている。さらに、mtTFA がアポトーシス抑制蛋白の一つである survivin の発現にも関与していることが見出されているが、膵癌における mtTFA や survivin の意義についての検討は乏しい。したがって申請者らは、膵癌（管状腺癌）におけるこれらの蛋白の発現が、腫瘍の臨床病理学的特徴や患者予後と関係があるか否かを検討した。</p> <p>産業医科大学病院で切除された膵管状腺癌 70 例を対象として、そのホルマリン固定パラフィン包埋組織において抗 mtTFA 抗体と抗 survivin 抗体を用いて免疫染色を行い、mtTFA については癌細胞の 30%、survivin については 10% の陽性率をカットオフ値として高発現群と低発現群とに分け、それぞれの発現の程度と臨床病期や腫瘍径、脈管侵襲の有無、腫瘍細胞の異型度などの種々臨床病理学的因子との相関性の有無を χ^2 法により検討すると共に、Kaplan-Meier 法を用いて疾患特異的生存率を算出し、Cox ハザード比例モデルを用いた単・多変量解析によってそれらの高発現が膵癌の予後因子となり得るか否かを検討した。その結果、検索した 70 例において mtTFA および survivin が高発現していた例は共に 27 例(38.6%)であり、それらの群はいずれもそれぞれの低発現群と比較して有意に臨床病期が進行しており、より低分化な組織像を示す傾向が見られた。また、術後 2 年間に於いて、mtTFA 高発現群は有意に疾患特異的生存率が低下していた。さらに、両者が共に高発現している群では有意にリンパ節転移が多く、より低分化で高進行期度であり、術後の生存期間も有意に短縮していた。単・多変量解析では両者共に高発現であることが腫瘍径 (>径 2m) や病期(pT3/4)と共に独立した膵癌の予後因子であることが示された。</p> <p>以上の結果から、膵癌では mtTFA の発現が腫瘍細胞の増殖に関わると共に、survivin の発現を介してアポトーシスを回避することによってさらに腫瘍進展を促していることが示唆される。これらの点は、最近腫瘍がシスプラチン投与後に mtTFA の発現レベルを上昇させて、抗アポトーシス効果によりシスプラチン抵抗性を獲得する現象が見出されている事や、survivin の遺伝子のプロモーター領域に 2 つの mtTFA 結合部位が存在することが報告されている事からも支持されうると考えられる。本研究では比較的多くの膵癌症例を対象として、これまで検討に乏しい mtTFA と survivin の免疫染色を中心に緻密な臨床病理学的解析を行うことにより、同癌における予後予測因子として両蛋白の組み合わせを新たに見出した点で意義深く、今後の膵癌患者の取扱いや治療方針の決定などにおいて本研究結果が応用されることが期待されることから、本学の学位論文として適格であると判定した。</p> <p style="text-align: right;">平成 27 年 2 月 10 日</p>							