

## 別添4 (3)

### II. 代表・分担研究報告

#### 3. 腹腔外発生デスマイド型線維腫症診断における非リン酸化βカテニン染色の有用性に関する研究

研究代表者 西田佳弘 名古屋大学大学院医学系研究科整形外科 准教授

研究協力者 酒井智久 名古屋大学大学院医学系研究科整形外科 大学院

#### 研究要旨

腹腔外発生デスマイド型線維腫症の腫瘍活動性、治療成績を予測する有用な因子、手法として、非リン酸化βカテニン抗体による免疫染色を実施した。対照として従来から実施されている通常のβカテニン免疫染色を行い、比較検討した。CTNNB1変異解析結果とβカテニン免疫染色結果の間に有意な関連はなかったが(P=0.43)、非リン酸化βカテニン免疫染色との間には有意な関連を認めた(P=0.025)。非リン酸化βカテニンの核内染色性とCOX-2阻害剤の臨床成績との間に有意な関連を認め(P=0.022)、βカテニンの核内染色性との間には有意な関連を認めなかった(P=0.38)。非リン酸化βカテニンの核内染色性評価は腫瘍の活動性、COX-2阻害剤治療の効果予測に有用である可能性が示された。

#### A. 研究目的

腹腔外発生デスマイド型線維腫症では手術後の高い再発率や薬物治療に対する治療効果予測の困難さが報告されている。診断において抗βカテニン抗体を使用した免疫染色が実施されている。このβカテニンの染色性が治療予後に関連するとの報告があるが、一定の結論にはいたっていない。またCTNNB1変異型が治療成績の予測因子になるとの報告があるが、解析がやや煩雑であることが欠点である。より簡便な免疫染色法によって治療成績を予測できれば、臨床において適用でき、患者に対して適切な治療法を選択することが可能となる。デスマイド型線維腫症診療ではβカテニンの遺伝子変異あるいはadenomatous polyposis coli (APC)遺伝子変異が発症に関与することがわかっている。これらの分子はβカテニンのリン酸化あるいはリン酸化したβカテニンの分解に関わっており、変異が生ずることによりβカテニンのリン酸化が起きなくなるあるいはリン酸化βカテニンの分解が不良となる。従来のβカテニンの免疫染色はリン酸化と非リン酸化双方を検出している。非リン酸化βカテニン発現のみを検出することで、分解されないβカテニンの多寡を評価し、臨床成績や腫瘍の正確を評価できる可能性がある。

本研究の目的は、デスマイド型線維腫症において従来から使用されている抗βカテニン抗体と非リン酸化βカテニン抗体により免疫染色を行い、診断と治療成績を予測する有用

な方法となるかを解析することである。

## B. 研究方法

研究代表者施設において、腹腔外発生デスマイト型線維腫症と病理診断され、COX-2阻害剤治療を実施した40例（セレコックス2例、メロキシカム38例）を対象とした。家族性大腸腺腫症の患者は含まれなかった。COX-2阻害剤の治療効果はResponse Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST)に従って評価した。免疫染色はβカテニンおよび非リン酸化βカテニン抗ヒトモノクローナル抗体を用いて200倍希釈にて実施した。染色性は核内と細胞質に分けて実施し、陽性度によりStrong, Moderate, Weak, Negativeの4群に分類した。全例凍結腫瘍検体あるいはプレパラート検体を使用してCTNNB1変異解析を行った。

（倫理面への配慮）

患者の各種臨床因子、治療成績に関わる後ろ向き調査、βカテニン免疫染色解析については個人情報取り扱いに十分注意し、臨床研究に関する倫理指針（平成20年7月31日全部改正）に準じ、遺伝子変異型解析についてはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成20年12月1日一部改正）に準じ、名古屋大学医学系研究科倫理委員会の承認および研究参加者の書面での同意を得た上で行った。

## C. 研究結果

CTNNB1変異をコドン41あるいは45に有する症例は72例（57%）であった。40例中、βカテニンの染色性について核内陽性評価は12例でstrong、moderate 22例、weak 6例、negative 0例であった。非リン酸化βカテニンの核内陽性は、2例でstrong、moderate 13例、weak 21例、negative 4例であった。βカテニン細胞質陽性は、21例でstrong、moderate 19例、weak 0例、negative 0例であった。非リン酸化βカテニンの細胞質陽性は、6例でstrong、moderate 13例、weak 21例、negative 0例であった。CTNNB1変異解析結果とβカテニン免疫染色結果の間に有意な関連はなかったが（ $P=0.43$ ）、非リン酸化βカテニン免疫染色との間には有意な関連を認めた（ $P=0.025$ ）。

染色性を2群に分けると(negative and weak vs moderate and strong)、非リン酸化βカテニンの核内染色性とCOX-2阻害剤の臨床成績との間に有意な関連を認め（ $P=0.022$ ）、βカテニンの核内染色性との間には有意な関連を認めなかった（ $P=0.38$ ）。細胞質染色性については非リン酸化βカテニン（ $P=0.51$ ）、βカテニン（ $P=0.75$ ）ともに有意な関連を認めなかった。

## D. 考察

抗体による免疫染色性評価は各種良性、悪性腫瘍に対して古くから行われている有用な手法である。最近では遺伝子変異解析技術が進み、臨床の現場でも適用されつつあるが、稀な疾患においては研究レベルで実施されているのが現状である。簡便な免疫染色法により、

臨床経過を効果的に予測できれば、腹腔外発生デスマイド型線維腫症患者に利することは多い。 $\beta$ カテニンが非リン酸化状態で存在することは、 $\beta$ カテニンの分解が阻害され、核内移行が進むことで腫瘍原性が悪化することが推測される。本研究結果により、非リン酸化 $\beta$ カテニン抗体による免疫染色が、COX-2 阻害剤の効果の有用な予測因子になることが明らかとなり、また CTNNB1 の変異型とも関連することが判明し、腫瘍が活動的であるかの判断基準として有用であることが示唆された。

#### E. 結論

腹腔外発生デスマイド型線維腫症に対する非リン酸化 $\beta$ カテニンによる免疫染色法は簡便であり、腫瘍の活動性や COX-2 阻害剤による治療反応性を予測する新しい手法となる可能性が示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

(1)酒井 智久, 濱田 俊介, 生田 国大, 大田 剛広, 浦川 浩, 小澤 英史, 石黒 直樹, 西田 佳弘.

デスマイド型線維腫症における非リン酸化 $\beta$ -catenin 免疫染色の有用性

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016. 10. 13-14 福岡

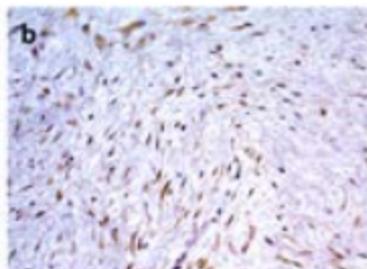
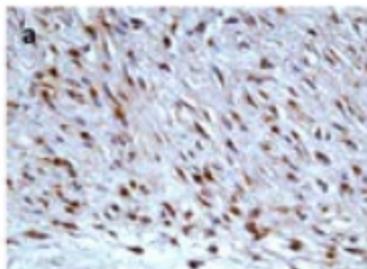
#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

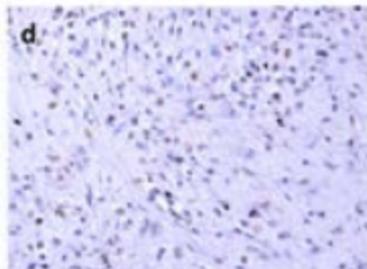
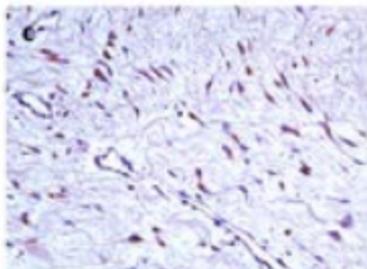
$\beta$ -catenin

non-phospho  $\beta$ -catenin

strong  
( $>50\%$ )



moderate  
( $>10\%, \leq 50\%$ )



weak  
( $\leq 10\%$ )

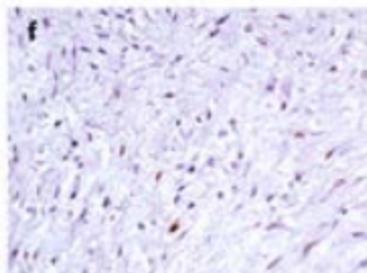
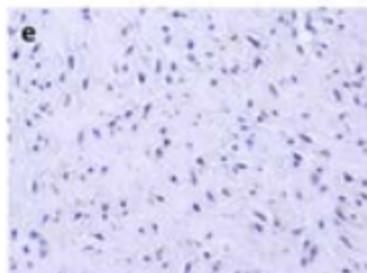


表 1.  $\beta$ カテニン、非リン酸化  $\beta$ カテニン免疫染色結果と CTNNB1 変異

	Mutation status					<i>p</i> value
	WT	T41A	T41I	S45F	S45P	
<b><math>\beta</math>-catenin<sup>a</sup></b>						0.43
weak	4	2	0	0	0	
moderate	8	12	1	1	0	
strong	6	3	0	2	1	
<b>non-phospho <math>\beta</math>-catenin</b>						0.025
negative	3	0	1	0	0	
weak	10	11	0	0	0	
moderate	4	6	0	2	1	
strong	1	0	0	1	0	

WT; wild type

<sup>a</sup>No cases showed negative

表 2. 核内  $\beta$ カテニン、非リン酸化  $\beta$ カテニン染色性と COX-2 阻害剤治療成績との関連

	Favorable group (n=20)	Unfavorable group (n=20)	<i>p</i> value
<b><math>\beta</math>-catenin</b>			0.38
$\leq 10\%$	2	4	
$> 10\%$	18	16	
<b>non-phospho <math>\beta</math>-catenin</b>			0.022
$\leq 10\%$	16	9	
$> 10\%$	4	11	

<sup>a</sup>No cases showed negative