

別添4 (2)

II. 代表・分担研究報告書

2. 腹腔外発生デスモイド型線維腫症に対する非リン酸化 β -カテニン免疫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

デスモイド型線維腫症の病理診断に β -カテニンの免疫染色による核内陽性所見が有用であるとされる。デスモイドにおける β -カテニンの核内集積の原因の1つは β -カテニンのリン酸化の障害にあると考えられていることから非リン酸化状態にある β -カテニンを検出することでデスモイドの活動性をより一層反映されると考えられる。本研究ではCOX-2阻害剤治療を実施した40例に対して通常の β -カテニンと非リン酸化 β -カテニンの免疫染色を行い、各臨床因子・成績との比較を行った。非リン酸化 β -カテニンの陽性像とCOX-2阻害剤による治療成績との間に有意な相関を認め、またCTNNB1の変異型との間にも関連性を認めた。非リン酸化 β -カテニン免疫染色はデスモイドの活動性を示すよい指標になる可能性が示された。

A. 研究目的

腹腔外発生デスモ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変異型が各種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り、本邦では標準的な診断方法となっていないことが欠点である。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、臨床において応用でき、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。デスモイド型線維腫症診療では β -カテニンの遺伝子(CTNNB1)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部位、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 -カテニンを評価し、臨床成績や腫瘍の性格を評価できる可能性がある。本研究の目的は、デスモ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、腹腔外発生デスモイド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（セレコキシブ 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。凍結標本あるいはプレパラートから DNA を抽出し、CTNNB1 の変異 hot spot を含む 2 種の異なったプライマーペアを作成し、PCR にて増幅し、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。（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

男性 16 例、女性 24 例、平均年齢は 41.7 歳（中央値 36 歳、10-87 歳）、発生部位は腹壁 10 例、他の体幹部 11 例、四肢 15 例、頸部 4 例であった。腫瘍の最大径の平均は 7.6cm（中央値 7.5cm、2.3-14.4cm）、放射線治療、他の化学療法を受けた患者は含まれていなかった。平均経過観察期間は 29.6 ヶ月（2-104 ヶ月）、RECIST による評価は、1 例 CR(complete remission)、12 例で PR(partial remission)、7 例で SD(stable disease)、20 例で PD(progressive disease)であった。CTNNB1 変異解析では 22 例(55%)に hot spot 変異を認め、17 例(43%)は T41A、3 例(8%)は S45F、T41I と S45P をそれぞれ 1 例に認めた。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。非リン酸化 β -カテニンの染色性と臨床因子との関連解析では、年齢が若いほど染色性が強く (P=0.013)、サイズが大きいほど染色性が強い傾向があった (P=0.081)。

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り、骨軟部腫瘍領域でも各種抗体が用いられ、診断に有用な手法となっている。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。したがって、簡便な免疫染色法により、臨床経過あるいは各種治療成績を効果的に予測できれば、臨床現場で応用可能となり、患者に対しても貴重な情報を提供することができる。本研究により、非リン酸化 β -カテニン免疫染色がより臨床像を反映することが示唆された。デスマイド型線維腫症の発症に β -カテニンの遺伝子 (CTNNB1) 変異が関与していることが報告されている。特に CTNNB1 の変異により β -カテニンのリン酸化が阻害されると、その分解も阻害され、 β -カテニンが安定化して核内に集積し、TCF/LEF と結合体を形成して、標的遺伝子を活性化する。この活性化がデスマイド型線維腫症でも腫瘍形成、増殖、進展に関与していると考えられている。したがって単なる β -カテニンを染色する抗体よりも、安定化した β -カテニンを反映する非リン酸化 β -カテニンを認識する抗体を用いた方がデスマイドの病態を反映すると予測される。本研究結果により、非リン酸化 β -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

非リン酸化 β -カテニン免疫染色は、通常の β -カテニンによる免疫染色と比較して、よりデスマイド型線維腫症の活動性を反映していると考えられる。免疫染色は臨床の現場で簡便に実施できるため、今後患者への情報提供や治療の選択肢決定に有用となる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tomohisa Sakai, Yoshihiro Nishida, Shunsuke Hamada, Hiroshi Koike, Kunihiro Ikuta, Takehiro Ota, Naoki Ishiguro.

Immunohistochemical staining with non-phospho β -catenin as diagnostic and prognostic tool of COX-2 inhibitor therapy for patients with extra-peritoneal desmoid-type

fibromatosis.

Diagn Pthol. 2017; 12 (1): 66

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし