

【13】

氏 名	さいとう なつこ 齋藤 奈津子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第630号
学位授与の日付	平成26年3月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 （臨床病態・分子病理学）
学位論文題目	Analysis of <i>KRAS</i> mutations in cases of metastatic colorectal cancer at a single institution in Tochigi, Japan （日本、栃木県の一施設で集められた難治性大腸癌の<i>KRAS</i>遺伝子変異に関する研究）
論文審査委員	（主査）教授 加藤 広行 （副査）教授 正和 信英 教授 窪田 敬一

論文内容の要旨

【背景】

近年の食生活の欧米化および人口構成の高齢化によって大腸癌の発生数が増加し、それに伴い難治性大腸癌（mCRC）が増加している。mCRCに対して抗EGFR（epidermal growth factor receptor）抗体による分子標的療法の有効性が大規模調査から確認された。EGFRの下流の細胞内シグナル伝達の一つが*KRAS*遺伝子であり、約30-40%の大腸癌で変異が認められ、*KRAS*遺伝子変異が起きるとEGFRの細胞内シグナル伝達が制御不能となり癌の増殖が促進するとされている。よってmCRCの治療選択上、*KRAS*遺伝子の解析が日常的に行われている。

【目的】

本研究では*KRAS*遺伝子解析から109例のmCRCの臨床病理学的諸因子とmCRCの動向を明らかにすることが目的である。

【対象と方法】

2007年から2012年の間に、日本人109人の外科的切除または生検された検体を用いた。年齢、性別、解剖学的部位、肉眼型、組織型、進行期分類（UICC stage、Dukes' classification）について臨床病理学的分類を行った。*KRAS*遺伝子解析は68例をARMS/S（Amplification Refractory Mutation System-Scorpion）assay、41例をdirect sequence法でおこなった。

全ての統計解析はStatView for Windows Version 5.0を用いた。項目ごとの比較はChi-squared test

またはFisher's exact testを用いた。 $P<0.05$ を統計学的に有意とみなした。

【結 果】

ARMS/S法を用いた解析ではcodon12変異 36.5%、codon13変異 7.4%、Direct Sequence法を用いた解析ではcodon12変異 24.4%、codon13変異 19.5%であり、全109症例でみると*KRAS*遺伝子変異 37.6%、うちcodon12変異 25.7%、codon13変異 11.9%であった。*KRAS*変異と臨床病理学的因子の間には明らかな有意差はみられなかった。*KRAS* codon13変異検体は65歳以下の女性で多くみられた($P=0.035$)。

【考 察】

全大腸癌における*KRAS*変異の頻度は30-40%と報告されている。本研究での*KRAS*変異率は37.6%と既報の大腸癌における変異頻度30-40%と同等であった。

変異部位 (codon) については、*KRAS* codon12変異は25.7%、*KRAS* codon13変異は11.9%にみられた。他の既報のmCRCにおけるそれぞれの変異頻度でも同様の傾向が示されている。*KRAS*変異型大腸癌ではおよそ70-80%がcodon12領域に認められるとされている。今回、*KRAS*変異がみられた症例の31.6%がcodon13であったことは既報の割合とほぼ同等であった。

さらに、*KRAS* codon12変異症例は性別、年齢にかかわらず認められたが、codon13変異症例は65歳以下の女性に有意に認められた。

その原因について文献的に考察してみると、女性ホルモンや胆汁組成、胆汁酸生成、便の通過時間、大腸細菌叢、揮発性脂肪酸の産生がmutagenとして関与している可能性が考えられている。さらに、codon12 G→C transversionsは主に女性の近位結腸癌と男性の遠位大腸癌でみられると報告されている。

最近mCRCに対して用いられている抗EGFR抗体cetuximab治療に関する大規模研究では*KRAS* codon13変異の症例は他の部位の*KRAS*変異症例よりも生存期間が長かったと報告されている。このことは細胞株を用いた研究においてcodon13変異遺伝子導入細胞株がcodon 12変異遺伝子導入細胞株よりも形質転換能が低く、アポトーシスを誘導するためとの結果とも一致しており、65歳以下の女性でcodon13変異が優位であったことは、*KRAS*遺伝子変異による病態の差異を示唆している可能性があり興味深い。

一方、以前からcodon13のtransitions変異は文献的にはホルマリン固定標本のアーチファクトである可能性も指摘されており、codon13変異については注意深い解釈も必要である。今回もcodon12はtransversionsもtransitionsもみられたが、codon13はtransitionsのみであった。我々が以前行った検索方法の精度検討ではcodon 12 G→T transversionと*KRAS*遺伝子変異野生型を有することが知られている培養細胞から抽出したDNAを混合したサンプルを作成し、遺伝子解析を行ったところ、低濃度のサンプルにおいて存在し得ない遺伝子異常であるcodon 13 G→T transversionが検出された。このことからcodon13の意義についてはアーチファクトも含めて今後の課題といえる。

【結 論】

mCRCにおける*KRAS*遺伝子変異の頻度は既報のnon-mCRC症例における変異頻度と同等であっ

た。今回の結果からは65歳以下の女性のmCRCにcodon13変異が多くみられた理由については不明であるが、多施設大規模試験によるmutagenや変異解析方法を含めた*KRAS* codon 13変異の動態の再検討が望まれる。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

近年の食生活の欧米化および人口構成の高齢化によって大腸癌の発生数が増加し、それに伴い難治性大腸癌（mCRC）が増加している。mCRCに対して抗EGFR（epidermal growth factor receptor）抗体による分子標的療法の有効性が大規模調査から確認された。EGFRの下流の細胞内シグナル伝達の一つが*KRAS*遺伝子であり、約30-40%の大腸癌で変異が認められ、*KRAS*遺伝子変異が起きるとEGFRの細胞内シグナル伝達が制御不能となり癌の増殖が促進するとされている。よってmCRCの治療選択上、*KRAS*遺伝子の解析が日常的に行われている。本研究では*KRAS*遺伝子解析から109例のmCRCの臨床病理学的諸因子とmCRCの生物学的特性を明らかにすることを目的とした。年齢、性別、解剖学的部位、組織型、腫瘍深達度、リンパ節転移、TNM分類について臨床病理学的分類を行った。*KRAS*遺伝子解析はARMS/S（amplification refractory mutation system-scorpion）assayとdirect sequence法でおこなった。結果は*KRAS*遺伝子変異37.6%、うちcodon 12変異 25.7%、codon 13変異 11.9%であった。2つの検索方法間に*KRAS*変異率の有意差は認めなかった。*KRAS*変異と臨床病理学的因子間に明らかな有意差はみられなかった。*KRAS*変異の種類に関してcodon 13変異はtransitionのみであったが、codon 12ではtransversionとtransitionのいずれもみられた。注目すべき結果はcodon 13変異が65歳未満の女性に多くみられた点である。考察ではその原因についてさまざまな女性特有の因子が関与している可能性を示唆している。また腫瘍におけるcodon 13の意義については関連論文では不明瞭な部分も報告されており、codon 13の腫瘍形成については異議があると述べている。さらに本研究ではcodon 13変異はtransitionのみであったが、codon 12ではtransversionとtransitionのいずれもみられたという*KRAS*遺伝子変異検索方法上の問題点も重要であると指摘している。この点に関しては*KRAS* codon 13 transition変異はホルマリン固定パラフィン包埋標本のアーチファクトである可能性が従来から指摘されている点やcodon 12遺伝子異常を有する検体と野生型を混合状態で検索したところ、codon 12低濃度の検体中に存在し得ない遺伝子異常が誤検出される可能性を報告している。今回の結果からは65歳未満の女性の難治性大腸癌にcodon 13変異が多くみられた点については明確にできなかったが多施設大規模試験による更なる検討とcodon 13の生物学的特性の解明が望まれる、*KRAS*変異検索方法の精度向上も検討課題である、などが示された。

【研究方法の妥当性】

*KRAS*遺伝子解析はARMS/S assayとdirect sequence法でおこなった。検体は治療目的に採取された臨床検体であり、研究時期の違いで2つの検査方法が混在している。しかしこの検査方法間に*KRAS*変異率の有意差はみられておらず、本研究における*KRAS*遺伝子解析方法は適切であると考えられる。統計処理も適切に行われており、研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

65歳未満の女性の難治性大腸癌にcodon 13変異が多くみられた点について女性特有のmutagenが関与している可能性が示唆されるなど、今後の高齢者の難治性大腸癌の研究発展に寄与するであろう新奇性があると評価された。

【結論の妥当性】

申請論文では多数の症例を適切な対象選択の上で評価の独創的解析と客観化をおこない、統計処理も適切に検討している。そこから導き出された結論は論理的に矛盾するものではなく、また、病理学、消化器病学といった領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

この結果は今後の病理診断学、消化器病学の発展の礎となるものである。また増加している高齢者大腸癌の治療標的病変の診断基準の研究の進歩にも大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、消化管領域における理論と実践を学んだ上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に受理掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Pathobiology

81 : 133-137, 2014