

氏名(本籍)	あき 秋	やま 山	あずさ 梓	(茨城県)
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6604号			
学位授与年月日	平成25年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	PIK3CA overexpression is a possible favorable prognostic factor in ovarian clear cell carcinoma. (卵巣明細胞腺癌において PIK3CA 蛋白の高発現は予後良好を示す因子である。)			
主査	筑波大学教授	医学博士	野口 雅之	
副査	筑波大学准教授	博士(薬学)	鈴木 裕之	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	宮崎 淳	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	坂東 裕子	

論文の内容の要旨

(目的)

PI3-kinase/PTEN/Akt シグナル伝達経路上に存在する蛋白の異常が、早期癌および良好な予後と関連することが乳癌、子宮体癌、大腸癌などで既に報告されている。PI3-kinase の触媒サブユニットである PIK3CA は、type I の卵巣癌に分類される卵巣明細胞腺癌においてその遺伝子異常が報告されており、今回、卵巣明細胞腺癌における PIK3CA 蛋白発現の臨床的意義を明らかにすることを、本研究の目的とした。

(対象と方法)

1988年から2009年に筑波大学付属病院において卵巣明細胞腺癌と診断され、初回治療が行われた全症例を当科のデータベースにより同定した。組織型が明細胞腺癌のみか、明細胞腺癌成分が50%を超える混合癌である62症例を本研究の対象とした。

免疫染色の一次抗体として PIK3CA (Cell Signaling, Danvers, MA)、PTEN (Cascade, Winchester, MA)、p-Akt (Cell Signaling, Ser⁴⁷³ のリン酸化を検出)、p27 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)、p53 (Dako, Glostrup, Denmark) を用い、ABC法にて染色した。

DNA は Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いてホルマリン固定・パラフィン包埋された卵巣組織の腫瘍部分より抽出した。PIK3CA のエクソン9とエクソン20を4対のプライマーを使用して GeneAmp PCR System 9700 を用いて解析した。DNA の精製は Mini Elute Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて行い、Operon Biotechnologies (東京) でダイレクトシークエンスを行った。リアルタイム PCR 定量は ABI7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて行った。

統計学的に結果の相違は Fisher's exact test により評価をした。生存曲線は Kaplan-Meier 法により計算し、log-rank test により比較した。予後因子の単変量および多変量解析は Cox 比例ハザードモデルにより行った。

(結果)

免疫染色における各蛋白発現レベルの結果は、PIK3CA の高発現73%、PTEN 陰性は5%、リン酸化 Akt

高発現は74%、p53陽性は13%、p27の局在が細胞質内に移行しているのは19%であった。PIK3CAの高発現はリン酸化Aktの高発現と有意に相関し(p=0.007)、またリン酸化Aktの高発現は更にp27の細胞質への局在と関連が認められた(p=0.11)。次に免疫染色の結果と各臨床病理学的因子との相関性を検討すると、PIK3CA高発現症例は、その他の症例と比べて進行期I期の症例が多い傾向にあったが(p=0.07)、p53陽性症例ではその様な傾向は見られなかった。またPIK3CA高発現症例は初回手術で残存腫瘍が無いことと有意に相関した(p=0.01)。II - IV期の進行症例に限って見ても、PIK3CA高発現は同様に初回手術で残存腫瘍がない傾向がみられた(83% vs. 43%, p=0.16)。

次に免疫染色における各蛋白発現レベルと全生存期間との相関性をKaplan-Meier法により計算し、log-rank testにより比較した。PIK3CAの高発現症例は、その他の症例に比べて有意に予後が良好だった(p=0.031)。II - IV期の進行症例に限定した場合でも、PIK3CA高発現症例は予後が良好な傾向が見られた(p=0.089)。PIK3CAとp53の発現パターンにより分類したところ、PIK3CA高発現かつp53陰性の症例の生存期間が最も良好であり、PIK3CA高発現が無くp53陽性の症例の生存期間が最も不良だった(p=0.007)。全生存期間について各予後良好因子の単変量解析を行なったところ、PIK3CA高発現、FIGO進行期I/II期、および初回手術で残存腫瘍なし、の3因子が有意な予後良好因子だった(それぞれP=0.04, 0.001, 0.000081)。

次にPIK3CAの遺伝子変異と遺伝子増幅について62症例で検索を行った。DNA抽出とPCR増幅の条件最適化を繰り返したが、遺伝子解析が可能であったのは41症例だった。このうちPIK3CA遺伝子変異は14症例(34%)に、遺伝子増幅は7症例(17%)にみられた。今回見つかった4種類の遺伝子変異はすべてPIK3CAの活性化に重要なヘリカル・ドメインおよびキナーゼ・ドメインに位置していた。免疫染色によるPIK3CA蛋白の高発現は、PIK3CA遺伝子変異または遺伝子増幅の存在と有意な相関が認められた(61% vs. 10%, p=0.009)。

(考察)

PIK3CA蛋白高発現を有する卵巣明細胞腺癌は、有さない腫瘍と比べ、より緩徐な生物学的特性から予後が良好である可能性がある。この予後不良な卵巣癌の組織亜型において、PIK3CAは予後良好のバイオマーカーならびに治療のターゲットとなりうる可能性がある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

卵巣明細胞腺癌についてPI3-kinase/PTEN/Aktシグナル伝達経路上に存在する蛋白の異常を免疫染色およびDNA, RNA解析して検討している。その結果、PIK3CA高発現症例は、その他の症例と比べて進行期I期の症例が多い傾向にあり、PIK3CA高発現は全生存期間に関して予後良好と有意に相関することを見いだした。遺伝子解析の結果、免疫染色法によるPIK3CA蛋白の高発現は、PIK3CA遺伝子変異もしくは遺伝子増幅の存在と有意な相関を明らかにした。これら知見は卵巣明細胞腺癌とPI3-kinase/PTEN/Aktシグナル伝達経路異常の関係を解析することの必要性を示す臨床病理学的な重要な所見と考えられる。

平成25年1月16日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。