

氏名	黒部 匡広		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8390 号		
学位授与年月	平成 29年 9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	Development of RNA-FISH Assay for Detection of Oncogenic <i>FGFR3-TACC3</i> Fusion Genes in FFPE Samples (RNA-FISH 法による、FFPE 組織からの <i>FGFR3-TACC3</i> 融合遺伝子検出系の確立)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤 豊実
副査	筑波大学准教授	博士（生物科学）	村谷 匡史
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	鈴木 英雄
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	水口 剛雄

論文の内容の要旨

黒部匡広氏の博士学位論文は、尿路上皮癌を対象とし、RNA-FISH 法が、臨床応用が容易である FFPE 組織からの FGFR3-TACC3 融合遺伝子検出法として有用である事を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

著者の研究目的は、RNA-FISH 法を応用し、尿路上皮癌症例の FFPE 組織から FGFR3-TACC3 融合遺伝子を検出する方法を確立することである。FGFR3 の活性型点変異は尿路上皮癌において高頻度にみられ、新規治療薬の候補として FGFR 阻害剤の開発が進んでいる。また近年、oncogenic 活性を有する FGFR3-TACC3 融合遺伝子が尿路上皮癌などで報告され、FGFR3-TACC3 融合遺伝子を有する症例にも FGFR 阻害剤が著効する可能性が示唆されている。この為、FGFR3-TACC3 融合遺伝子の同定は FGFR3 活性型点変異の同定と同様、FGFR 阻害剤の候補症例の選択に重要である。しかしながら、これまでの報告では FGFR3-TACC3 融合遺伝子の検出は凍結組織を用いた PCR 法が大部分であり、臨床応用が容易であるホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)を用いた検出方法は未だ確立されていない。一般に FFPE からの融合遺伝子検出法として、ゲノム DNA を用いた FISH 法が確立されているが、FGFR3 と TACC3 遺伝子は 4 番染色短腕内で近接し、染色体相互転座ではなく縦列重複によって融合が生じるため、ゲノム DNA を用いた FISH 法での検出は困難である。そこで、FFPE 組織からの FGFR3-TACC3 融合遺伝子検出法の確立を目的とした。

著者が採った方法は、FGFR3 の exon3 から 11 と、TACC3 の exon12 から 16 を認識する RNA-FISH 用の

蛍光 probe を作成し、Affymetrix 社の QuantiGene® ViewRNA ISH Cell Assay Kit にて融合遺伝子の mRNA を標識した。共焦点レーザー顕微鏡にて FGFR3 のシグナルと TACC3 のシグナルをそれぞれ検出し、両シグナルが重なり合う比率を計算し融合の有無の判定を行うものである。はじめに融合遺伝子を有する事が既知である膀胱癌細胞株 (RT112, RT4) をヌードマウスに皮下移植させ、FFPE 組織を作成し、RNA-FISH 法にて融合遺伝子の検出を試み、続いて尿路上皮癌症例の臨床検体を用いて、FGFR3-TACC3 融合遺伝子の検出を試みている。検体の収集は、「尿路上皮癌における癌関連遺伝子変異解析に関する多施設共同研究」の一環として前向きに行った。本研究では、登録された 144 例のうち、FFPE 組織と凍結組織の両方が利用可能な 104 例 (筋層非浸潤性膀胱癌 60 例、筋層浸潤性膀胱癌 44 例) を対象とした。さらに、臨床検体の FFPE 組織からゲノム DNA を抽出し、Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 を用いて FGFR3 活性型点変異の有無を解析した。FGFR3 免疫染色所見についても検討し、FGFR3-TACC3 融合遺伝子および FGFR3 変異の有無と、免疫染色所見や病期との関連についても検討している。

著者が得た結果は、まず、ヌードマウス皮下腫瘍の腫瘍 FFPE 組織を用いて、RNA-FISH 法にて融合遺伝子の陽性シグナルが検出できること、続いて凍結組織を用いた PCR 法にて融合遺伝子の転写産物が存在することを確認したことである。次に臨床検体 104 例の FFPE 組織に対して RNA-FISH 法を施行し、FGFR3-TACC3 融合遺伝子陽性シグナルが筋層非浸潤性膀胱癌 2 例 (3%)、筋層浸潤性膀胱癌 2 例 (5%) の計 4 例から検出した。凍結組織からの PCR 法でも同じ 4 例において融合遺伝子が陽性であり、RNA-FISH 法の結果との一致を確認した。RNA-FISH 法で融合陰性と判定された 100 例においては、PCR 法でも融合遺伝子転写産物は検出していない。FGFR3 変異は筋層非浸潤性膀胱癌の 45%、筋層浸潤性膀胱癌の 18% で検出した。FGFR3-TACC3 融合遺伝子と FGFR3 変異は 1 例を除いて相互排他的であった。筋層非浸潤性膀胱癌の中では、ステージ Ta の方が T1 よりも FGFR3 変異が高頻度であった。FGFR3 免疫染色所見に関しては、融合遺伝子陽性症例の 75%、変異陽性症例の 88% が陽性であった。

著者は考察として、筋層非浸潤性膀胱癌の方が筋層浸潤性膀胱癌よりも FGFR3 変異の頻度が高く、筋層非浸潤性の中では Ta の方が T1 よりも FGFR3 変異の頻度が高いという点に関しては、過去の報告と一致していたとしている。膀胱癌における FGFR3-TACC3 融合遺伝子と、病期や免疫染色所見との関連はこれまでの報告では不明であったが、本研究によって、筋層非浸潤性膀胱癌の 3%、筋層浸潤性膀胱癌の 5% が同融合遺伝子陽性であり深達度によって大きな差が無い事、同融合遺伝子と FGFR3 変異は排他的傾向を示す事、同融合遺伝子陽性症例の 75% が FGFR3 免疫染色陽性である事を新たな知見として記載している。今回、FFPE を用いた RNA-FISH 法による FGFR3-TACC3 融合遺伝子検出法は、PCR 法によって融合遺伝子転写産物の存在が確認され、その有用性が示されたとし、FGFR 阻害剤が著効する可能性のある症例を選択する際、FGFR3 活性型点変異の同定だけでは見逃されてしまう融合陽性症例を拾い上げる事が、RNA-FISH 法によって可能となったことを示している。

著者は結論として、RNA-FISH 法は、臨床応用が容易である FFPE 組織からの FGFR3-TACC3 融合遺伝子検出法として有用である事が確認されたとし、今後、本アッセイ法は FGFR 阻害薬の治療効果予測への応用が期待され、患者ごとの癌の遺伝子プロファイルに基づいて治療方針を決定する個別化医療 (Precision Medicine) の進展に大きく寄与する事ができるとした。

審査の結果の要旨

(批評)

著者の学位論文は 2016 年に PLOS ONE 誌に掲載された論文であり、著者の研究分野に関する知識の広さと考察能力の高さに基づいて記述されており、論文自体の学術的な質が極めて高い。FGFR3-TACC3 融合遺伝子の検出は臨床的には応用しにくい凍結組織を用いて行われていたが、著者は臨床応用が容易である FFPE 組織からの検出法を確立した点が新しく、かつ、この手法を基礎的研究に留まらせることなく膀胱癌の臨床検体からこの手法を用いて FGFR3-TACC3 融合遺伝子の検出を行い、その有用性を示した。

平成 29 年 7 月 3 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) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。