

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 神林 智寿子  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大博 (医) 第1775号  
学位授与の日付 平成26年9月22日  
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
博士論文名 Amplification of Genomic DNA for Decoy Receptor 3 Predicts Post-Resection Disease Recurrence in Breast Cancer Patients  
(Decoy Receptor 3 遺伝子増幅は乳癌患者における再発を予測する)

論文審査委員 主査 教授 西條 康夫  
副査 教授 小松 雅明  
副査 教授 若井 俊文

### 博士論文の要旨

【背景・目的】 Tリンパ球によって産生された FasL が癌細胞膜上の Fas と結合して apoptosis を誘導するシステムが存在するが、肺癌と大腸癌の一部では腫瘍から分泌される可溶性のおとりの受容体, Decoy Receptor 3 (DcR3) が FasL と結合することによる apoptosis 回避機構が報告された (Pitti RM et al: Nature 1998;396:699-703)。その後、乳癌組織における DcR3 mRNA の発現や遺伝子増幅はわずかに報告されているが、乳癌における DcR3 mRNA の発現や遺伝子増幅と予後との関係についての報告はない。そこで申請者らは、乳癌組織での Fas-FasL 系 apoptosis における DcR3 の mRNA の発現と遺伝子増幅を検討し、予後との関係について研究することとした。

【方法】 ①乳癌組織での DcR3, Fas, FasL の mRNA 発現の検討・組織内分布の検討: RNA を乳癌組織より抽出。RT-PCR 法より DcR3, Fas, FasL の partial c-DNA fragment をクローニング。それをテンプレートに用いてアイソトープラベルの c-RNA probe を作成。この c-RNA probe を用いて RNAase Protection assay を施行し、mRNA 発現量を検討。さらに ISH 法により癌組織内でのこれらの mRNA の分布を検討した。②DcR3 遺伝子増幅と mRNA 発現の関係の検討: DcR3 遺伝子増幅は、乳癌組織よりゲノムの DNA を microdissection にてパラフィン封埋切片より DNA アイソレーターPS キットを用い抽出し TaqMan PCR 法にて DcR3 と内部標準の  $\beta$ -globin の DNA 増幅産物を定量し DcR3 と  $\beta$ -globin の DNA 増幅産物の比 ( $D/\beta$ ) を算出した。これを RNAase Protection assay の結果とあわせて DcR3 mRNA 発現と遺伝子増幅の関係について検討した。③1996年1月～2000年12月に当科において手術を施行した乳癌症例95例を対象に DcR3 遺伝子増幅と臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。12症例では非癌部乳腺組織での DcR3 遺伝子増幅も検討した。

【結果】 ①RNAase Protection assay による DcR3, Fas, FasL の mRNA 発現の検討を8症例で施行し、4例(50%)で DcR3 mRNA 発現を認めた。Fas mRNA は DcR3 mRNA 発現を認めた全ての症例で発現していた。FasL mRNA は全ての症例において発現を認めなかった。ISH 法により DcR3 mRNA は非癌部乳腺組織ではなく乳癌細胞に発現していることが示された。②DcR3 遺伝子増幅と mRNA 発現との関連を14症例で検討した。RNAase Protection assay による DcR3 mRNA 高発現は5例(36%)に認められ、TaqMan PCR 法による DcR3 遺伝子の

相対的コピー数も高値であった。さらに DcR3 遺伝子の相対的コピー数と DcR3 mRNA 発現は有意に相関していた ( $\rho = 0.755$ ,  $P = 0.0067$ )。③乳癌組織の DcR3 遺伝子増幅と臨床病理学的因子、予後との関連は 95 症例で検討した。DcR3 遺伝子の乳癌組織における相対的コピー数の中央値は 1.19 であった。今回の申請者らの研究では DcR3 遺伝子増幅ありを相対的コピー数 1.2 以上, DcR3 遺伝子増幅なしを 1.2 未満と規定した。なお, 非癌部乳腺組織 (12 症例) における DcR3 遺伝子の相対的コピー数は 0.64 であった。DcR3 遺伝子増幅ありと有意に関連した因子はリンパ管侵襲陽性のみであり ( $P = 0.012$ ), その他の臨床病理学的因子とは関連はみとめられなかった。無再発生存率 (RFS) において, 単変量解析では stage III ( $P < 0.0001$ ), リンパ節転陽性 ( $P = 0.0018$ ), ER 陰性 ( $P = 0.0269$ ), および DcR3 遺伝子増幅あり ( $P = 0.0271$ ) が有意な予後不良因子であった。多変量解析では, DcR3 遺伝子増幅あり ( $P = 0.028$ ) と Stage III ( $P < 0.001$ ) の 2 因子のみが独立した RFS における予後不良因子であった。

**【考察・結論】** DcR3 遺伝子増幅はリンパ管侵襲と有意に関連し, 乳癌切除後の再発予測因子であった。DcR3 は乳癌において Fas-FasL 系 apoptosis からの回避に関与し, DcR3 遺伝子増幅を認める乳癌は予後不良であることが申請者らの研究により明らかとなった。

#### 審査結果の要旨

腫瘍から分泌される Decoy Receptor 3 (DcR3) が FasL と結合することによる apoptosis 回避機構が報告されたが, 乳癌における DcR3 mRNA の発現や遺伝子増幅と予後の関係についての報告はない。そこで申請者らは, 乳癌組織における DcR3 mRNA の発現と遺伝子増幅を検討し, 予後との関係について研究した。乳癌組織での DcR3, Fas, FasL の発現と分布を RNAase Protection assay と ISH 法によりを解析した。また乳がん 95 例における DcR3 遺伝子増幅と臨床病理学的因子および予後との関連を検討した。8 例中 4 例において RNAase Protection assay で DcR3 mRNA 発現を認めた。ISH 法により DcR3 mRNA は非癌部乳腺組織ではなく乳癌細胞に発現していることが示された。DcR3 遺伝子の相対的コピー数と DcR3 mRNA 発現は有意に相関していた ( $\rho = 0.755$ ,  $P = 0.0067$ )。DcR3 遺伝子増幅あり (相対的コピー数 1.2 以上) と有意に関連した因子はリンパ管侵襲陽性のみであった ( $P = 0.012$ )。無再発生存率 (RFS) において, 多変量解析では, DcR3 遺伝子増幅あり ( $P = 0.028$ ) と Stage III ( $P < 0.001$ ) の 2 因子のみが独立した予後不良因子であった。DcR3 は乳癌において Fas-FasL 系 apoptosis からの回避に関与し, DcR3 遺伝子増幅を認める乳癌は予後不良であることが申請者らの研究により明らかとなった。以上のことより, 学位論文としての価値を認める。