

氏名・(本籍)	小山 慧 (新潟県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1091 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Clinicopathological and molecular analyses of linearly expanded epithelial cells with $\beta$ -catenin alterations, " $\beta$ -catenin signature", in the normal fallopian tube.  (正常卵管にみられる $\beta$ -catenin 異常細胞集塊" $\beta$ -catenin signature")
論文審査委員	(主査) 田中 正光 教授 (副査) 大森 泰文 教授      有田 淳一 教授

## 学位論文内容要旨

Clinicopathological and molecular analyses of linearly expanded epithelial cells with  $\beta$ -catenin alterations, “ $\beta$ -catenin signature”, in the normal fallopian tube.  
(正常卵管にみられる  $\beta$ -catenin 異常細胞集塊 “ $\beta$ -catenin signature”)

申請者氏名 小山慧

### 研究目的

ゲノム解析技術の進歩に伴い、様々な臓器の正常組織において腫瘍関連遺伝子変異が検出されるという報告がなされるようになった。しかし、それらが真の腫瘍性病変なのか、単なる生理学的な変化なのかは不明である。その解明には組織切片上で変異細胞を同定し、形態学的な評価を行うことが不可欠であるが、免疫組織化学的に捉えられる遺伝子変異は少ない。以前より卵管では、p53 signature と呼ばれる、免疫組織化学的に p53 異常を示す異型性に乏しい上皮細胞集塊の存在が知られており、その少なくとも一部では *TP53* の変異を伴っていることが報告されている。形態学的に著変のない上皮で腫瘍関連遺伝子変異が認められる現象は奇異であるが、卵管上皮自体が多様な遺伝子異常をきたしやすいのか、それとも p53 経路に関してのみ高頻度で認められるのか、という観点で行われた研究は少ない。我々は免疫組織化学的に変異細胞を同定可能な  $\beta$ -catenin に着目し、正常卵管上皮における発現を評価し、その意義について検討する。

### 研究方法

2014 年から 2015 年にかけて卵管の切除された婦人科手術検体に対し、SEE-FIM (Sectioning and Extensively Examining the Fimbriated End) プロトコールに則り、卵管・卵管采の全割・全包埋を行った。そのうち SEE-FIM プロトコールが適切に行われ、両側卵管・卵管采の検討が可能な 64 症例を対象とした。  
 $\beta$ -catenin の免疫組織化学染色を施行し、 $\beta$ -catenin の異常発現像(細胞質・核の陽性像)を示す卵管上皮細胞が 12 個以上連続して並ぶ領域を  $\beta$ -catenin signature と定め、その臨床病理学的特徴について解析を行った。

### 研究成績

13 症例(約 20%)で計 33 個の  $\beta$ -catenin signature が同定された。その過半数(7/13)の症例では複数個の  $\beta$ -catenin signature が確認された。 $\beta$ -catenin signature が確認された症例は、確認されなかった症例に対し有意に年齢が低いことが分かった(p=0.0317)。 $\beta$ -catenin signature の存在と悪性腫瘍の有無との間で有意な相関は認めなかった。8 個の  $\beta$ -catenin signature に対して laser capture microdissection を行い、DNA の抽出を行った。Sanger sequence の結果、*CTNNB1* の hotspot における点突然変異が 3 個で検出された。

### 結論

形態学的に著変のない卵管上皮における  $\beta$ -catenin 異常発現細胞集塊を  $\beta$ -catenin signature と定義し、その存在を実証した。少なくとも一部では *CTNNB1* の変異が認められることを示した。  
近年、正常組織の deep sequence の結果、腫瘍関連遺伝子変異を示す細胞の増殖がみられたという報告が相次いでいる。正常の上皮細胞においても種々の遺伝子変異が加齢に伴い蓄積しており、それが腫瘍発生に関わっているという考え方が一般に受け入れられている。しかし  $\beta$ -catenin signature が約 20%の症例に認められ、若年者により多くみられたという結果からは、 $\beta$ -catenin signature は加齢によって蓄積しないものであることが示唆される。明らかな悪性腫瘍との関連も認められず、腫瘍性の変化よりは生理的な現象を捉えている可能性が高いと考える。

# 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 田中正光

申請者： 小山 慧

論文題名：Clinicopathological and molecular analyses of linearly expanded epithelial cells with  $\beta$ -catenin alterations, “ $\beta$ -catenin signature”, in the normal fallopian tube. (正常卵管にみられる $\beta$ -catenin 異常細胞集塊“ $\beta$ -catenin signature”)

## 要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、正常組織における腫瘍関連遺伝子変異の検出と、その意義についてである。組織切片上で変異細胞を同定し、形態学的な評価を加味する目的で正常卵管組織をとりあげた。形態学的に著変のない卵管上皮で、腫瘍関連遺伝子のひとつである $\beta$ -catenin の変異を免疫組織化学的に検討した結果、約 20%の症例でこれまでに知られていなかった $\beta$ -catenin の異常発現を示す卵管上皮細胞が連続して並ぶ領域を同定するに至った。これを $\beta$ -catenin signature と名付け、同部から *CTNNB1* 点突然変異を検出した。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

一見正常な卵管上皮には、 $\beta$ -catenin の異常発現（細胞質、核の陽性像）を示す上皮が連続している領域がある事を初めて発見し、その現象に対し $\beta$ -catenin signature と命名した。またこれは検討した症例の約 20%に見られ、同遺伝子の hot spot における点突然変異を伴う事を一定数明らかにできた。一方で悪性腫瘍の有無とは有意な相関は無く、年齢による蓄積はない事も示した。

### 2) 重要性

先行の知見では p53 で同様の報告があるが、他の癌関連遺伝子でもその存在を明らかに

したことは重要である。こうした解析を今後深める事で、その新たな病理学的意義の解明に道筋をつけたものと言える。

### 3) 研究方法の正確性

卵管切除された婦人科手術検体に対し、研究目的に即した全割、包埋(SEE-FIM)を行っており、 $\beta$ -catenin の免疫組織学的検出も非常に明瞭なインパクトのある画像取得がなされている。 $\beta$ -catenin signature という名称の定義も明確になされ、また laser capture microdissection により点突然変異の証明もクリアである。

### 4) 表現の明瞭さ

研究目的、方法、実験結果の表現は適切であり、現時点での病理学的意義に対する考察においても、明瞭に発表したと考える。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。