

## 論 文 要 旨

**Effects of Krüppel-like factor 4 mutation on the clinicopathological characteristics and its related protein expressions in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas**

KLF4 変異が膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) において臨床病理学的特徴および関連タンパク質発現に及ぼす影響

永峯 佳尚

**【序論及び目的】**

膵管内乳頭粘液性腫瘍 (intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN) は、膵癌の前駆病変として知られ、IPMN 由来浸潤癌および IPMN とは独立して発生する併存膵管癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma; PDAC) の双方の危険因子とされている。IPMN の進展には多様な遺伝子異常が関与することが知られているが、その分子機構は未だ十分に解明されていない。Krüppel-like factor 4 (KLF4) は、細胞分化、細胞周期、アポトーシスに関与する転写因子であり、iPS 細胞の山中因子の一つとしても知られている。膵癌においては腫瘍抑制的に働くことが報告されている一方、近年、低異型度 IPMN において *KLF4* ホットスポット変異 (主に K409Q, S411Y など) が高頻度に認められることが報告された。我々は以前、*KLF4* 変異を有する IPMN では、野生型に比して併存膵管癌の発生頻度が高いものの、IPMN 自体の多くが非浸潤性であることを報告した。しかし、*KLF4* 変異が IPMN の生物学的特性にどのように影響するか、その下流シグナル機構は明らかでない。本研究では、*KLF4* 変異の存在と細胞周期関連タンパク質 (p21, p27, cyclin D) 発現との関連を解析し、*KLF4* 変異が IPMN の非進行的性質に及ぼす分子機構を明らかにすることを目的とした。

**【材料及び方法】**

本研究は鹿児島大学医学部倫理委員会の承認 (承認番号 210239) のもと実施し、全患者から文書による同意を得た。2018~2023 年に当科で切除された IPMN52 例のうち、術前化学療法を受けていない 33 例を解析対象とした。パラフィン包埋 (FFPE) 標本より形態学的に最も異型の強い領域を病理医がマッピングし、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit を用いて DNA を抽出した。*KRAS* (p.G12D, G12V, G12R, G12C)、*GNAS* (p.R201H, R201C)、および *KLF4* (p.K409Q, S411Y) のホットスポット変異をデジタルドロップレット PCR (ddPCR) およびカスタム次世代シーケンサー (NGS) パネルにより解析し、変異アレル頻度 1% 以上を陽性と判定した。免疫組織化学染色 (IHC) は KLF4、p21、p27、cyclin D1 の 4 抗体を用い、陽性細胞率と染色強度 (0~3) を乗じたスコアを算出し、各症例 5 視野の中央値を代表値とした。さらに、ヒト膵癌細胞株 MIA Paca-2 に *KLF4* 野生型および変異型 (K409Q) ベクターを導入し、ウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色により抗体の反応特異性と発現変化を確認した。統計解析には JMP Pro 18 を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 【結果】

33例のうち、*KLF4*変異は8例(24%)に検出された。変異型はすべて非浸潤性( $p=0.02$ )かつ非腸型であり( $p < 0.01$ )、そのうち7例(87.5%)が*GNAS*変異を併存していた。一方、*KRAS*変異の頻度は*KLF4*変異の有無による差を認めなかった。IHCでは、*KLF4*およびp21の発現が*KLF4*変異症例で有意に高値を示した( $p < 0.01$ )。p27およびcyclin D1発現には差を認めなかった。また非浸潤性病変では浸潤性病変に比べ*KLF4*およびp21の発現が有意に高かった( $p < 0.05$ )。さらに、*GNAS*変異を有するIPMNでは*KLF4*発現スコアが野生型に比して高値であった( $p = 0.049$ )。細胞株実験では、*KLF4*抗体が野生型および変異型*KLF4*の双方を認識し、*KLF4*変異導入細胞でp21発現が顕著に上昇したが、p27およびcyclin D1に変化はなかった。p21/*KLF4*比は*KLF4*変異型で有意に高く( $p < 0.01$ )、*KLF4*変異によるp21発現促進効果(gain of function)が示唆された。

## 【結論及び考察】

本研究により、*KLF4*変異を有するIPMNは非浸潤性かつ非腸型に多く、p21タンパク発現が顕著に上昇していることが明らかとなった。p21はDNA損傷応答により細胞周期を停止させ、細胞老化やアポトーシスを誘導する腫瘍抑制因子として知られている。*KLF4*はp21転写を活性化することが報告されており、今回の結果は、*KLF4*変異がp21発現を介して細胞周期の進行を抑制し、IPMNの緩徐な生物学的性質に影響を及ぼしている可能性を示唆する。また*KLF4*変異の多くで*GNAS*変異が併存しており、両者が相互に作用して腫瘍増殖と分化抑制のバランスを保つ可能性が考えられた。*GNAS*変異は低異型度IPMNで高頻度に検出され、IPMN特異的マーカーとして知られるが、本研究では両変異を併せ持つ例はいずれも非腸型かつ非浸潤性であり、これらの分子変化が早期に発生し、浸潤癌への進展を抑制している可能性がある。一方、本研究は症例数が少なかつたため、*KLF4*変異が浸潤癌でも観察される可能性や浸潤癌への進展に与える直接的影響を評価できなかった。今後は多施設共同による前向き研究や、*KLF4*変異とp21経路の時間的変化を追跡する検討が求められる。結論として、*KLF4*変異はp21タンパク発現上昇を介してIPMNの非進行的特徴を規定する可能性があり、リスク層別化に基づく新たなバイオマーカーとしての臨床応用が期待される。