

学位論文の要旨

| | | | |
|--|----|----|-------|
| 学位の種類 | 博士 | 氏名 | 柴田 直美 |
| 学位論文題目 | | | |
| Cell kinetics and genetic instabilities in differentiated type early gastric cancers with different mucin phenotype | | | |
| (異なる粘液形質を持つ分化型早期胃癌の細胞動態と遺伝子不安定性に関する研究) | | | |
| 共著者名 | | | |
| 渡 二郎、藤谷幹浩、丹野誠志、齊藤裕輔、高後 裕 | | | |
| 未発表 | | | |
| 研究目的 | | | |
| <p>胃癌は組織学的に腺管構造の有無によって分化型癌と未分化型癌に大別される。近年、分化型癌は、さらに腸上皮化生から発生し腸型粘液を持つ癌と胃腺窩上皮から発生し胃型粘液を持つ癌とに区別されるようになった。後者は前者に比較して浸潤・転移能が高く、また未分化型化しやすい傾向があると報告され、その発育進展に伴い遺伝子異常を蓄積することで、未分化型癌へと形質変化していく可能性が考えられる。</p> <p>ミスマッチ修復遺伝子の異常はマイクロサテライト不安定性 (MSI) や細胞増殖に関連した標的遺伝子の変異を高頻度におこし遺伝子異常の蓄積を起こしやすい。ミスマッチ修復遺伝子の異常が発癌に関与する散発性大腸癌は予後良好であることが知られているが、その理由のひとつに腫瘍内で高頻度にアポトーシスが生じていることが報告されている。</p> <p>本研究では腺管構造と粘液形質から診断・分類した分化型早期胃癌の悪性度の指標として細胞動態（細胞増殖とアポトーシス）を検討し、その細胞動態に関与する遺伝子異常、ならびに遺伝子不安定性の関与について検討した。</p> | | | |
| 材料・方法 | | | |
| <h3>1. 胃癌組織</h3> <p>1998年から2000年までに旭川医科大学附属病院で内視鏡的胃粘膜切除術(18病変)及び手術(32病変)を行った47人50病変の早期分化型胃癌を対象とした。m癌13病変、sm癌37病変で術前治療を受けたものはなかった。旭川医科大学倫理委員会にて研究に関する承諾を得た後、患者本人および家族の同意を文書で得て行った。</p> | | | |

2. 粘液形質の分類方法

切除標本から 4 μ m の連続切片を作製し、粘液形質の分類のために以下の染色を行った。胃腺窩上皮に染まる 45M1 抗体 (Novo Castra Laboratories, U.K.)、杯細胞に染まる MUC2 抗体 (clone Ccp58, Novo Castra Laboratories)、小腸刷子縁に染まる CD10 抗体(clone 56C6, Novo Castra Laboratories)を一次抗体として、ABC 法で染色した。幽門腺の染色には ConA 染色を施行し、何れの染色においても癌部での染色性が 20% 以上の場合は陽性と判定した。45M1 染色と ConA 染色を胃型形質のマーカー、MUC2 染色と CD10 染色を腸型形質のマーカーとし、これらの染色性の組み合わせにより以下の 4 型に分類した。

- ①胃型癌：何れかの胃型マーカーが陽性で、腸型マーカーはいずれも陰性である症例。
- ②完全腸型：胃型マーカーは陰性で、MUC2 の染色性を問わず CD10 が陽性の症例。
- ③通常型：胃型と腸型のマーカーが何れも陽性の症例または MUC2 だけが陽性の症例。
- ④分類不能型：何れのマーカーも陰性の症例。

3. 増殖細胞、アポトーシス細胞、p53 過剰発現の検討

Ki-67 抗原（増殖細胞）に対して MIB-1 (Immunotech, Marseilles, France)、p53 蛋白に対して DO7 (DAKO, Glostrup, Denmark) を一次抗体として ABC 法で染色した。p53 蛋白の発現は癌部で 20%以上が染色されている場合を陽性とした。アポトーシス細胞の検出は、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling method (TUNEL 法) で行った。それぞれの粘液形質が発現している領域で、腫瘍細胞 500 個当たりの Ki-67 とアポトーシス陽性細胞数をカウントし百分率に換算して、増殖分画 (PI) とアポトーシス分画 (AI) とした。

4. DNA 抽出方法

切除標本から 10 μ m の連続切片を作製し、Laser Capture Microdissection system (Arcturus Engineering, Mountain View, CA) を用い、顕微鏡下にそれぞれの粘液形質の発現した癌細胞を選択的に採取し、proteinase K 処理により DNA 抽出を行った。対照として、周囲正常粘膜の DNA を抽出した。

5. Microsatellite instability (MSI) と Loss of heterozygosity (LOH) の検討方法

9 個の microsatellite marker について MSI と LOH を検討した。marker は 2p (BAT26)、2p (D2S123)、3p (D3S1067)、4q (BAT25)、5q (D5S346, D5S409)、13q (D13S153)、17p (D17S520)、18q (D18S34) を使用し、おのおのの primer の 5'末端には蛍光標識をラベルし polymerase chain reaction (PCR) 法にて DNA を增幅した (high-resolution fluorescent microsatellite analysis : HFRMA 法)。PCR 産物は ABI prism 310 Genetic analyzer (Perkin Elmer) を用い電気泳動し、MSI と LOH の解析は Gene Scan (Applied Biosystems) で行った。MSI の判定は、①癌部の DNA バンドのピークがシフトし正常粘膜のピークと異なる場合、②正常粘膜にない多数の DNA バンドが癌部に認められる場合を陽性とし、前者の MSI pattern を minor pattern、後者を major pattern と定義した。検討した microsatellite marker の 30% 以上に MSI が認められた症例を MSI-H、30%未満の場合を MSI-L とした。LOH の判定は、癌部で何れかのアレルのピークが正常粘膜のものに比べて 70%未満であった場合を陽性とした。

6. Frameshift mutation の検討

MSI 陽性の症例での frameshift mutation の有無を検討するために transforming growth factor- β type II receptor (TGF β RII) と bcl-2-associated X protein (BAX) に関して、PCR 後 Gene Scan にて解析した。

7. 統計学的解析

有意差検定には独立 2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定で、独立 3 群間の比較に Kruskal-Wallis 検定で、2 群間の比率の検定には χ^2 test を用いた。

成 績

1. 粘液形質の分類結果

早期分化型胃癌 50 病変のうち、何れの粘液形質を示さない分類不能型は 7 例あった。これを除く 43 病変のうち胃型癌は 11 例 (26%)、通常型癌は 20 例 (47%)、完全腸型は 12 例 (28%) であった。

2. 粘液形質による細胞動態の検討

増殖分画 (PI) は各粘液形質の間に差を認めなかった。しかし、胃型癌、通常型癌、完全腸型癌のアポトーシス分画 (AI) は、それぞれ 1.5 ± 0.4 、 4.0 ± 0.7 、 4.1 ± 0.8 で、胃型癌の AI が通常型癌や完全腸型より有意に低かった ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。増殖分画に対するアポトーシス分画の比 (AI/PI 比) は、胃型癌、通常型癌、完全腸型癌でそれぞれ 0.04 ± 0.02 、 0.10 ± 0.02 、 0.13 ± 0.03 で、胃型癌が他の粘液形質癌より有意に低かった ($p < 0.05$ 、 $p < 0.005$)。

3. 各粘液形質における MSI と LOH の検討

MSI の陽性率は、胃型癌で 64%、通常型癌で 75%、完全腸型癌で 50% で各粘液形質の間に差を認めなかつた。しかし、MSI pattern における major pattern と minor pattern の比率は、胃型癌で 86% と 14%、通常型癌で 73% と 27%、完全腸型癌で 0% と 100% で、major pattern の MSI は完全腸型癌より胃型癌で有意に高かった ($p=0.0023$)。

LOH の頻度は各粘液形質の間に差を認めなかつた。D17S520 (p53) の領域での MSI あるいは LOH の頻度は胃型癌 36%、通常型癌 58%、完全腸型癌 18% で、通常型癌に比べて完全腸型癌で有意に低かつた ($p=0.03$)。

4. TGF β RII と BAX の frame shift mutation の検討

TGF β RII と BAX の frame shift mutation を示した症例はすべて MSI-H であった。frame shift mutation の頻度は各粘液形質間に差はなかつたが、完全腸型癌でのみこれらの遺伝子に mutation を認めなかつた。

5. p53 蛋白発現と粘液形質の関係

p53 蛋白の過剰発現を胃型癌の 55%、通常型癌の 56%、完全腸型癌の 67%に認めたが、各粘液形質の間に相関は認めなかった。D17S520 の MSI および LOH と p53 蛋白の過剰発現には相関はなかった。

6. 細胞動態とアポトーシス関連遺伝子との関係

アポトーシス分画と今回検索し得たアポトーシス関連遺伝子及び細胞増殖に関連する遺伝子（p53 遺伝子異常、p53 蛋白過剰発現、TGF β RII と BAX の frameshift mutation）の間には一定の傾向を認めなかった。

考 按

胃型癌は他の粘液形質を有する癌に比べて浸潤・転移能が高く、発育進展に伴い未分化型化する傾向があるという事実から、胃型癌は未分化型癌に近似した悪性度を有し、他の粘液形質を持つ癌に比べ遺伝子異常の蓄積があると予測した。腫瘍の成長は細胞動態、すなわち腫瘍細胞の増殖とアポトーシス細胞死とのバランスで規定されている。本研究の結果、胃型癌の悪性度の高い理由として細胞増殖に対する細胞消失（アポトーシス）の比が関与していることが明らかとなった。同様の細胞動態の結果は、分化型癌と未分化型癌の間にも認めており、胃型癌は未分化型癌の特徴に類似していることが示唆された。一方、HFRMA assay を用いて遺伝子不安定性を判定した結果、各粘液形質の間で MSI や LOH の頻度に差はなかった。しかし、MSI pattern の検討では major pattern は胃型癌に有意に多くみられ、完全腸型癌は全て minor pattern であった。major pattern は乳癌において臨床的に悪性度が高いことが報告されており、MSI pattern からも胃型癌は完全腸型癌より高い悪性度を有するものと考えられた。

本研究では、アポトーシスと p53 蛋白異常、TGF β RII 及び BAX の frameshift mutation との間に有意な相関を認めなかった。これは、分化型早期胃癌では他のアポトーシス関連遺伝子の異常の関与が推測された。

結 論

胃型癌の悪性度が最も高い理由として、アポトーシスの低下が関与している。遺伝子不安定性の検討では、胃型癌の悪性度には MSI pattern が関係している可能性がある。分化型早期胃癌では粘液形質を分類することでその悪性度を予測することが可能で、臨床の場において、治療方針や予後の予測に有用であることが示唆された。

引 用 文 献

1. Endoh Y, Tamura G, Motoyama T, Ajioka Y, Watanabe H. Well-differentiated adenocarcinoma mimicking complete-type intestinal metaplasia in the stomach. Hum Pathol 1999;30:826-832.
2. Koseki K, Takizawa T, Koike M, Ito M, Nihei Z, Sugihara K. Distinction of differentiated type early gastric carcinoma with gastric type mucin expression. Cancer 2000;89:724-732.

3. Michael-Robinson JM, Biemer-Hüttmann, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, et al. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. Gut 2001;48:360-366.
4. Tokunaga E, Oki E, Oda S, Kataoka A, Kitamura K, Ohno S, et al. Frequency of microsatellite instability in breast cancer determined by high-resolution fluorescent microsatellite analysis. Oncology 2000;59:44-49.

参考論文

- 1) 柴田直美、榮浪克也、垂石正樹、山縣一夫、竹内 茂、外川征史、吉田正史、松本昭範、柴田 好、武田章三、小笠原英紀:消化管穿孔をともなわない気腹症の1例:日本消化器病学会雑誌 第97巻 第7号 2000:914-919
- 2) 斎藤裕輔、野村昌史、藤谷幹浩、渡 二郎、泉 信一、柴田直美、三好恭子、藤谷佳織、佐藤智信、前本篤男、綾部時芳、蘆田知史、高後 裕:小腸の良性腫瘍および腫瘍様病変:胃と腸 第36巻 第7号 2001:959-966

学位論文の審査結果の要旨

| 報告番号 | 第 号 | | |
|---|--------|----|------|
| 学位の種類 | 博士(医学) | 氏名 | 柴田直美 |
| <u>審査委員長 片桐一印</u> | | | |
| <u>審査委員 高後裕印</u> | | | |
| <u>審査委員 牧野勲印</u> | | | |
| 学位論文題目 | | | |
| <p>Cell kinetics and genetic instabilities in differentiated type early gastric cancers with different mucin phenotype (異なる粘液形質を持つ分化型早期胃癌の細胞動態と遺伝子不安定性に関する研究)</p> | | | |
| <p>早期胃癌は、一般的に肉眼的所見を主体にして分類されている。そして胃細胞型の粘液形質を有する分化型早期胃癌は、未分化型に変化する傾向が知られている。</p> <p>本研究は、分化型早期胃癌を癌細胞の粘液産生形質の違いにより分類し、分類された早期胃癌の間に悪性度に差異があるか否かを検討したるものである。</p> | | | |

50 病変の分化型早期胃癌を粘液形質を検出する3種類の抗体による染色性及び Con A 染色性により、胃型癌、完全腸型癌、通常型癌、分類不能型癌に分類した。各分類における細胞増殖とアポトーシスの細胞動態を免疫染色により、又細胞動態に関わる遺伝子異常並びに遺伝子不安定性について検討した。

その結果、胃型癌は他の粘液形質癌よりもアポトーシス分画ならびにアポトーシス分画／増殖分画の比が有意に低値であり、胃型癌の悪性度が高い理由として、アポトーシス低下が関連することを明らかにした。又、遺伝子不安定性の検討から胃型癌の悪性度にはMS I パターンが関係している可能性を明らかにした。

本研究は分化型早期胃癌について、粘液形質を分類することにより、その悪性度を予測し得ることを示し、今後の臨床研究に寄与するところが大きいとみなされる。又論文提出者に対して、本論文及び関連領域について試問し、充分な説明、解答が得られました。

以上より本論文は、学位（博士）論文に相応しいものと判断しました。