

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 Histology-specific allelotype of common epithelial ovarian cancer by laser capture microdissection and PCR-LOH analysis

和訳 Laser capture microdissection を用いた上皮性卵巣癌の組織型特異的 allelotype の検討

指導教官 武谷雄二教授

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 岡田智志

### 【緒言】

上皮性悪性卵巣腫瘍は卵巣悪性腫瘍の 80~90%を占めるが、主に漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌の 4 種類からなる。これらは抗癌剤に対する感受性や予後といった点で臨床的に性格が異なる。しかし上皮性卵巣癌の研究は卵巣癌の大部分を占める漿液性腺癌が中心で、明細胞腺癌の遺伝子異常は殆ど検討されていない。

明細胞腺癌は上皮性卵巣癌の 5~12%を占めるとされ、欧米よりも日本で頻度が高い。またプラチナベースの全身化学療法に抵抗性であり、他の組織型の卵巣癌よりも予後不良の傾向がある。

他の多くの固形癌と同様、卵巣癌も発癌遺伝子活性化及び腫瘍抑制遺伝子不活化の多段階を経て発生する。腫瘍抑制遺伝子の不活化機構には塩基配列の点突然変異や遺伝子全体を含む染色体領域の欠失がよく知られている。後者の欠失は、父母由来の一对のヘテロな染色体の一方が消失するという意味でヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH) と表現される。

各染色体短腕ないし長腕上の LOH の存在様式を総合的に把握して各々の腫瘍の特徴を明らかにしようという研究は allelotype 解析と名付けられている。言い換えると allelotype は各々の腫瘍で不活化される腫瘍抑制遺伝子のプロファイルを大まかに

表すものである。

卵巣癌における allelotype 解析の多くは既知の腫瘍抑制遺伝子が位置する特定の染色体に焦点を絞り LOH に関するデータを蓄積してきた。これらの検討により、卵巣癌で高頻度に LOH を認める染色体領域として 1p, 4p, 5q, 6p, 6q, 7p, 8p, 8q, 9p, 9q, 11p, 11q, 12p, 12q, 13q, 14q, 15q, 16p, 16q, 17p, 17q, 18q, 19p, 21q, 22q, Xp が報告された。また 17p13.1 に位置する p53 遺伝子の変異は卵巣癌でもしばしば認められる。しかしこれらの研究の殆ど全ては漿液性腺癌を対象としたものであり、他の組織型での allelotype 解析は検討されていない。卵巣癌の組織型ごとに関与する癌抑制遺伝子が異なるならば、LOH を高頻度で認める染色体領域や腫瘍抑制遺伝子変異のパターンも組織型で異なるはずである。

Laser capture microdissection(LCM) は組織切片中のある特定の領域から必要な細胞集団だけを確実に選別する方法であり、PCR などを利用した高感度増幅法によりさまざまな検討を行うことができる。本研究では、上皮性卵巣癌 45 例から腫瘍 DNA を LCM により採取し、ほぼ全領域の染色体上腕・短腕に位置する 55 の多型性マーカーを用いて LOH を正確に同定した。組織型特異的な染色体異常をスクリーニングするために明細胞腺癌 16 例、漿液性腺癌 13 例、類内膜腺癌 11 例、粘液性腺癌 5 例の LOH 頻度のパターンを解析した。特に明細胞腺癌と漿液性腺癌の LOH 分布を比較することで、最も予後不良な組織型である明細胞腺癌に特徴的な染色体異常を同定しようと試みた。

#### 【実験方法】

1. 使用検体；国立がんセンター中央病院で手術施行した原発性上皮性卵巣癌 45 例（明細胞腺癌 16 例、漿液性腺癌 13 例、類内膜腺癌 11 例、粘液性腺癌 5 例）の癌部と非癌部（卵管または子宮漿膜）組織。
2. 癌組織の DNA 抽出；検体から採取した組織を $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結し、 $5\sim 10\mu\text{m}$ に薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色切片から LM200 laser capture microdissection system を用いて腫瘍組織のみを摘出。DNA 抽出には QiaAMP DNA Mini Kit を用いた。
3. 非癌部 DNA の調製；フェノール・クロロホルム法を使用した。
4. PCR-LOH 法；55 個の多型性マーカーを primer とし PCR 法にて DNA を増幅、products を ABI377 または 310 sequencer で電気泳動し GeneScan プログラムで解析。非癌部 DNA で 2 本の増幅バンドを認めるものを informative case とし、それらのうちで癌 DNA のバンドの 1 本が 50%以上減弱したものを LOH ありと判定した。
5. PCR-SSCP 法による遺伝子変異解析；p53 遺伝子の exon5-8 の変異を解析した。
6. 免疫組織化学染色；ホルマリン固定パラフィン切片を用いて p53 蛋白の核内異常蓄積を avidin-biotin complex 法により免疫組織化学的に検討した。
7. 統計学的解析；Fisher 法を用い  $P<0.05$  を統計学的に有意とした。

#### 【結果】

1. 染色体領域別の LOH 頻度の一覧を図に示す。
2. 卵巣癌 45 例全体で LOH 頻度が 40%以上であった染色体は 1p, 8p, 13q, 17p, 19p, Xp。早期癌 (I・II 期) よりも進行癌 (III・IV 期) で LOH 頻度が高い傾向があったが、早期癌でも 30%以上の頻度だった。

3. 漿液性腺癌と比較した明細胞腺癌の LOH パターンの特徴は 1p33-36 で LOH 頻度が高いことと 5q, 12q, 13q, 17p での LOH 頻度が有意に低いことであった。
4. 類内膜腺癌では明細胞腺癌より 7p の LOH 頻度が高い傾向があるが有意ではなかった。漿液性腺癌に比べると 12q, 13q, 15q, 19p の LOH 頻度が有意に低かった。
5. 粘液性腺癌は明細胞腺癌や類内膜腺癌よりも有意に 17p の LOH 頻度が高く、漿液性腺癌や明細胞腺癌に比べて 1p の LOH 頻度は有意に低かった。漿液性腺癌に比べると 1p, 5q, 13q, 19p での LOH 頻度は有意に低かった。
6. p53 遺伝子 exon5-8 の変異は明細胞腺癌では認められなかったが漿液性腺癌では 64%に認められた。
7. p53 蛋白の核内異常蓄積は明細胞腺癌では 7%のみに見られたが漿液性腺癌では 45%に認めた。

#### 【考察】

本研究により、上皮性卵巣癌では組織型の違いにより LOH が高率に見られる染色体領域のパターン(allelotype)に大きな相違があることが明らかになった。初期卵巣癌より進行期卵巣癌の方が LOH 頻度が高い傾向があるが、進行期別で特異的な LOH はなかった。従って組織型毎にそれぞれの発癌過程に関わる癌抑制遺伝子が異なっていることが示唆された。

明細胞腺癌では 1p33-p36 での LOH 頻度が特に高く、8p, 11q, 13q, 18q, 19p で頻度が 30%以上であった。1p33-p36 に位置する癌抑制遺伝子が明細胞腺癌の発癌に関与している可能性がある。

漿液性腺癌では 17 個の染色体短腕ないし長腕で LOH 頻度が 50%以上であったが、これまでの報告中の最大数で LOH 頻度も最も高い。以前の報告では 30%以上の頻度で LOH を検出した染色体領域数は全体の 40%であり、50%以上の LOH 頻度の領域の割合もわずか 6%であった。本研究で 30%以上の LOH を検出した領域の割合は 54%で、50%以上の LOH 領域も 39%であった。従来の研究では非癌組織の混入のために卵巣癌における LOH 頻度が過小評価されていた可能性がある。新鮮凍結組織から LCM を用いて癌のみを分離し検討する方法で、これまで正確な評価を妨げていた限界を克服したといえる。

漿液性腺癌ではこれまでの検討で 5q, 9q, 12q, 13q, 17p, 18q の LOH 頻度が 50%以上であり、本研究でも同様であった。これらの染色体短腕ないし長腕の LOH は漿液性腺癌の発癌と進展に関与する癌抑制遺伝子の不活化に重要である可能性がある。

17 番染色体の LOH は上皮性卵巣癌で一般的であり、高悪性度または進行期の漿液性腺癌にほとんど例外なく関連することは以前に示されている。p53 が位置する 17p や BRCA1 が位置する 17q の LOH は進行期漿液性腺癌にしばしば認められるが、明細胞腺癌や漿液性境界悪性腫瘍では頻度が低い。本研究でも同じ結果であった。多くの上皮性悪性腫瘍と同様、上皮性卵巣癌でしばしば異常を呈する p53 遺伝子は 17p13.1 にあるが、明細胞腺癌では p53 遺伝子・p53 蛋白の異常の頻度が低いことが特徴であった。

類内膜腺癌では 7p で LOH の頻度が高く 12q, 13q, 15q, 19p の LOH 頻度が低かった。粘液性腺癌では 17p の LOH の頻度が高く 5q, 13q, 19p の LOH 頻度が低かった。本研究では粘液性腺癌の症例数が少なく更なる検討が必要である。

本研究では LCM を利用して純粋な癌 DNA を抽出し allelotype の検討を行った。そしてこれまでの漿液性腺癌の検討中最大数の染色体短腕ないし長腕での LOH を

同定し、明細胞腺癌で特異的に高頻度で欠失する染色体領域を同定した。組織型が異なると LOH 分布も異なることは、発癌に関わる癌抑制遺伝子がそれぞれの組織型で異なることを示唆している。1p33-p36 の LOH が高頻度なのは明細胞腺癌と漿液性腺癌とで共通であるが、17p13.1 の LOH 及び *p53* 遺伝子変異の頻度が低いことは明細胞腺癌で特徴的であった。明細胞腺癌の発癌・進展には *p53* が関与しておらず、1p33-p36 上の癌抑制遺伝子が重要な役割を果たしている可能性が示された。明細胞腺癌に特異的な癌抑制遺伝子を検出するために更なる研究が必要である。

3764 字

