

論文の内容の要旨

論文題目 大腸癌における酸化ストレスの検討

指導教官 名川弘一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 瀨瀬真一郎

要旨

目的 酸化ストレスとは『生体内の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化反応にかたむいた状態』と定義される。酸化反応を引き起こす最大の原因は、体内で発生する活性酸素である。体内の蛋白質や脂質、DNA（主に塩基）といった構成物は、活性酸素により容易に酸化され損傷をうける。DNA や RNA に酸化損傷が生じた場合、塩基対形成の誤りをもたらす、さらには発癌や老化といった現象を引き起こすことが知られている。しかし、細胞が酸化的損傷を受けた場合に、酸化的損傷を受けた塩基を除去する蛋白として、hMTH1、hMYH、hNTH1 などが生体内に存在している。hMTH1 は酸化ストレスにより刺激されて発現が亢進することが分かっており、酸化ストレスの良い指標になると報告されている。大腸癌においては、特殊な大腸癌として潰瘍性大腸炎合併大腸癌があげられるが、その癌化の機序について、慢性炎症による酸化ストレスの関与が指摘されている。これに対し、一般大腸癌では酸化ストレスが癌化や臨床病理学的因子、分子生物学的因子などどのように関わっているのか、まだ十分に明らかになっていない。本研究では一般大腸癌において酸化的損傷を修復する DNA 修復蛋白(hMTH1、hMYH、hNTH1)の発現を解析し、その発現様式と臨床病理学的因子の相関を検討した。さらに大腸癌の発癌と酸化ストレスの関係を明らかにするため、これらの DNA 修復蛋白の発現様式と p53 の異常との相関を検討した。また、酸化ストレスは老化に関係する重要な因子である事が明らかにされている。そこで、高齢者についてさら

に詳しく検討を行った。本研究において 75 歳以上を高齢者と定義し、高齢者における大腸癌(以下、高齢者群)において、DNA 修復蛋白の発現様式と臨床病理学的因子との相関を検討した。さらに、高齢者群と 75 歳未満の大腸癌症例(以下、対照群)との間で、DNA 修復蛋白の発現様式について比較した。また、高齢者大腸癌の発癌と酸化ストレスの関係を明らかにするため、DNA 修復蛋白の発現様式と p53 の異常の相関について検討した。加えて、マイクロサテライト不安定性 (MSI)が高齢者の発癌に関係しているという報告があり、MSI と DNA 修復蛋白の発現様式についての相関を検討した。

対象と方法 東京大学腫瘍外科にて 1990-91 年の間に外科的切除された大腸癌 81 例を検討対象とした。また、同時期に得られた大腸腺腫 65 症例を大腸腺腫の検討対象とした。hMTH1、hMYH、hNTH1、p53 に対する免疫組織化学染色は、抗体の特異性を証明された一次抗体を使用した。一般大腸癌における、酸化ストレスと臨床病理学的因子の関係を明らかにするため、DNA 修復蛋白の発現様式と、年齢、性別、腫瘍占居部位、深達度 (TNM 分類による原発腫瘍の広がり)、組織型、腫瘍径、静脈侵襲、リンパ管侵襲、リンパ節転移、Dukes 分類による病期、無再発生存率などの臨床病理学的因子との相関を検討した。各蛋白の染色の発現様式は、過去の論文を参考に二群に分類した。次に、一般大腸癌における酸化ストレスと発癌との関係を明らかにするため、DNA 修復蛋白の発現様式と p53 の異常を比較検討した。

また、大腸癌に加え大腸腺腫症例において hMTH1 の発現様式を比較検討した。高齢者大腸癌は、当科にて 1990-93 年の間に外科的切除された 75 歳以上の大腸癌 33 例を検討対象とした。対照群として、75 歳未満の大腸癌症例を検討した。高齢者大腸癌症例について、hMTH1、hMYH、hNTH1 の免疫組織化学染色の発現様式を検討し、臨床病理学的因子との相関を検討した。続いて、DNA 修復蛋白の発現様式について、高齢者群と対照群で比較検討を行った。

また、高齢者群において、DNA 修復蛋白の発現様式と p53 の異常を比較検討した。MSI の解析は、同一患者の腫瘍組織と正常組織より、microdissection method にて DNA 抽出のための組織を得た。MSI は 5 つのマイクロサテライトマーカーを用いて分析した。5 種類のマーカーのうち 2 個以上に異常が認められた場合に MSI 陽性と判定した。

結果 一般大腸癌における hMTH1 の発現は高発現群 68/81 例、低発現群 13/81 例で、hMTH1 の高発現は左側大腸癌に多く認められた($p=0.05$)。hMYH の発現は高発現群 46/81 例、低発現群 35/81 例で、hMYH 高発現群では、TNM 分類による原発腫瘍の広がり T3 以上の症例を多く認められた($p=0.056$)。hNTH1 の発現は核発現群 53/81 例、細胞質発現群 28/81 例で、hNTH1 核発現群では、リンパ節転移陽性率が高く($p=0.001$)、Dukes 分類による病期が進んでおり($p=0.005$)、無再発生存率が低かった($p=0.04$)。また、p53 異常発現を認めた症例は 45/81 例(56%)であった。p53 異常発現は hMTH1 の高発現と有意に相関を示した($p=0.002$)。次に、大腸腺腫組織においては、大腸癌組織に比べ hMTH1 の高発現の頻度は有意に低かった($p<0.001$)。また、高齢者大腸癌における hMTH1 の発現は高発現群 24/33 例、低発現群 9/33 例であった。hMYH の発現は高発現群 10/33 例、低発現群 23/33 例であった。hNTH1 の発現は核発現群 17/33 例、細胞質発現群 16/33 例であった。高齢者群での DNA 修復蛋白の発現と臨床病理学的因子の検討では、明らかな特徴を認めなかった。また、高齢者群と対照群の比較では hMTH1、hNTH1 の発現については両群間に有意差を認めなかったが、hMYH の発現に関しては高齢者群において hMYH の低発現の頻度が有意に高かった($p=0.01$)。p53 異常発現は 20/33 例に認められた。高齢者群においても p53 の異常発現と hMTH1 の高発現に関して有意に相関を認められた($p=0.01$)。MSI は高齢者大腸癌 33 例中 1 例に認められた。

考察 本研究では、大腸癌における DNA 修復蛋白(hMTH1、hMYH、hNTH1)の発現を明らかにし、臨床病理学的因子との関係を検討した。すなわち、hMTH1 の高発現は右側大腸癌に比べ、左側大腸癌に高率にみとめられた。hMTH1 は酸化ストレスにより刺激されて発現が亢進することが分かっており、酸化ストレスの良い指標になると報告されている。本研究にて左側大腸癌において hMTH1 の発現様式が高発現を高頻度に認めた理由として、左側大腸癌において酸化ストレスが増大していた可能性が考えられた。また、hMYH 高発現群の腫瘍深達度は TNM 分類による T3 症例が多く、hMYH 低発現群に比べ進行した症例が多かった。hNTH1 に関しては、hNTH1 核発現群では hNTH1 細胞質発現群に比べ、リンパ節転移が高度で Dukes 分類による病期も進行しており、無再発生存率が悪かった。Janssen や

Nozoe らの報告でも、大腸癌において活性酸素を除去する Manganese Superoxide Dismutase は、その発現の亢進と悪性度についての相関が報告されており、大腸癌の悪性度は酸化ストレスと密接に関係している事が考えられた。次に一般大腸癌における酸化ストレスと発癌についての検討を行った。酸化ストレスと発癌に関しては、これまでにいくつかの腫瘍において、関連が指摘されているが、それらの癌において、発癌過程に p53 の異常が強く関係していることが報告されている。一般大腸癌の発癌における酸化ストレスの関係を検討するために、p53 異常発現と hMTH1、hMYH、hNTH1 の発現様式との関係を明らかにした。hMTH1 高発現は p53 の異常発現と有意に相関を示し、酸化ストレスと p53 の異常の関連が考えられた。また、大腸腺腫における hMTH1 の発現の検討を行ったところ、大腸癌にくらべ hMTH1 の高発現の頻度が有意に低かった。大腸腺腫においては、大腸癌組織に比べ酸化ストレスの増加が少ないと考えられた。さらに、酸化と還元バランスが崩れていると考えられる状態に、老化現象が挙げられる。このため、高齢者大腸癌において、酸化ストレスと大腸癌との関係についてさらに詳しく検討した。高齢者群では、DNA 修復蛋白の発現様式と臨床病理学的因子の関係について、一般大腸癌で認められた臨床病理学的因子との相関は認められなかった。また、高齢者群と対照群の比較において、hMTH1、hNTH1 の発現様式については統計学的有意差を認めなかったが、hMYH は高齢者群で有意に低発現の頻度が高率であった。高齢者群において DNA 修復蛋白の発現が増加する事を予想していたが、本研究ではむしろ低発現の頻度が高率であり、高齢者群において酸化ストレスの関与が高いとは考えられなかった。p53 の異常と hMTH1 の高発現は高齢者群においても有意に相関を示し、高齢者大腸癌においても p53 と酸化ストレスが関連していると考えられた。また、MSI は高齢者に多く認めるとする報告もあるが、今回の検討では 1 例のみであり、一般に報告されている大腸癌における MSI の頻度に比べ低頻度であった。さらに、MSI 陽性の症例での DNA 修復蛋白の発現様式は高齢者群では二番目に多い発現様式であり、MSI と酸化ストレスとの関係について明らかな相関を示す事はできなかった。また、hNTH1 の発現様式とリンパ節転移や予後との相関が明らかになり、臨床応用の可能性が考えられた。