

論文の内容の要旨

論文題目 大腸低分化腺癌、粘液癌における遺伝子異常の検討

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10年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 金沢 孝満

背景

大腸低分化腺癌、粘液癌は、頻度は低い(5%程度)、浸潤傾向が強く、転移をきたしやすいなど生物学的悪性度が高いことが知られている。したがって、低分化腺癌、粘液癌を解析し、悪性度に関与する因子を明らかにすれば、今後、それらの因子を治療のターゲットにできる可能性があると考えられる。これまで大腸低分化腺癌、粘液癌についての報告は少なく、報告されている検討においても、少ない症例数での臨床病理学的検討が主であり、遺伝子変化についての報告は少ない。本研究では、大腸低分化腺癌、粘液癌の遺伝子異常を明らかにするために、genetic な変化と epigenetic な変化を検討した。まず genetic な変化として、LOH の解析を行ない、次に epigenetic な変化として、胃癌、乳癌の低分化腺癌、粘液癌での関与がすでに報告されている E-cadherin のプロモーター領域のメチル化について検討した。さらに、大腸癌の遺伝子変化の中心で、E-cadherin と complex を形成する β -catenin についてその発現を検討した。

目的

大腸低分化腺癌、粘液癌の genetic および epigenetic な変化を検討し、高分化腺癌との遺伝子学的な差異を明らかにする。

対象

対象は、1991年から2000年に東京大学第一外科(現 腫瘍外科)にて外科切除された大腸癌66例で、対象症例の癌組織および正常粘膜を一部採取した。66例のうち、37例は組織学的に低分化腺癌あるいは粘液癌と診断された症例で、24例は高分化腺癌、

5例は中分化腺癌と診断された症例であった。低分化腺癌、粘液癌のうち9例と24例の高分化腺癌、5例の中分化腺癌は1998年から2000年に切除された凍結標本を用い、それ以外はホルマリン固定、パラフィン包埋された標本を用いた。また、本研究は倫理委員会の承認を受けて施行した。

方法

I Genetic な変化

- ① 大腸癌で LOH の頻度の高い 4 つの Loci のマーカー (5q: *APC* D5S346、2p: *MSH2* D2S123、17p: *p53*、*p53penta*、D17S796、18q: *SMAD4/DCC*、D18S474)、MSI 判定のためのマーカー (D17S250、BAT25、BAT26) および E-cadherin の LOH を調べるために近傍の 3 つのマーカー (D16S3025、D16S3021、D16S398) を用いて LOH、MSI について検討した。
- ② genomic instability の指標とするため、*TP53*、*DCC*、*SMAD4*、2 など大腸癌と関連の深い遺伝子の存在する 17 番、18 番染色体にほぼ 10 センチモルガン (cM) 間隔で分布する 27 のマイクロサテライトマーカーを利用し LOH を検討した。

II Epigenetic な変化

- ① E-cadherin のプロモーター領域のメチル化を methylation specific PCR (MSP) にて解析した。
- ② E-cadherin と β -catenin の免疫染色による発現を検討し、発現パターンにより以下のように分類した。

E-cadherin

- normal : 腫瘍の 90%以上で正常のパターンを示すもの
 - negative : 正常なパターンを示す細胞が 10%以下、または全く正常な発現のないもの
 - heterogeneous : 不均一な染色パターンを示すもの
 - aberrant : 0-90%の細胞で、斑状または部分的な発現を認める、あるいは通常では発現のない核や細胞質が染まるもの
- 正常の発現パターンを normal とし、heterogeneous、aberrant or negative expression を abnormal と二つのサブグループに分類した。

β -catenin

- normal : 細胞膜に沿って均一に染まるパターンを示すもの
 - nucleus : 核が強く染まるもの
 - cytoplasm : 細胞質が強く染まるもの
 - negative : 全く正常な発現のないもの
- 正常の発現を示すものを normal とし、nuclear、cytoplasmic、negative expression を abnormal に分類した。

いずれも、統計処理はフィッシャーの検定 (Fisher's exact probability test) を用い、群間の比較には Mann-Whitney test を用い、ともに p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

結果

I Genetic な変化

- ① 4つの Loci での LOH と MSI の検討では、全体的に高分化腺癌と比較して低分化腺癌、粘液癌では LOH の比率は高かったが、統計学的に有意差が得られたのは、D2S123、D18S474 の 2 つのマーカーだった。なお、37 例のうち 8 例(21.6%)が MSI に分類された。
- ② 17 番、18 番染色体に分布する 27 のマーカーによる LOH-ratio の解析では、LOH-ratio の平均が低分化腺癌、粘液癌で 0.70、中分化腺癌は 0.43、高分化腺癌は 0.24 であり、低分化腺癌、粘液癌と高分化腺癌の間で統計学的有意差を認めた。

II Epigenetic な変化

- ① MSP によるメチル化の検討では、37 症例のうち 22 例で E-cadherin プロモーター領域のメチル化の有無が判定でき、判定できた低分化腺癌、粘液癌 22 例のうち、12 例(54.5%)で E-cadherin プロモーター領域のメチル化を認めた。
- ② E-cadherin の免疫染色では、低分化腺癌、粘液癌の 78.6%で異常な発現パターンを示した。一方、 β -catenin の免疫染色では、62.2%が異常発現を示した。E-cadherin と β -catenin の発現を比較すると、両者に統計学的に有意な相関を認めた。臨床病理学的な検討では、E-cadherin および β -catenin のいずれもその発現と MSI や組織型(低分化癌と粘液癌での分類)とに相関は認められなかったが、リンパ節転移の有無と β -catenin の異常発現とに有意な相関を認めた ($p=0.02$)。E-cadherin プロモーター領域のメチル化と、免疫染色における E-cadherin の異常発現は統計学的に有意な相関を認めた($p=0.017$)。一方、E-cadherin 遺伝子 *CDH1* の近傍の 3 マーカーを用いて LOH を解析した結果、判定できた 20 例のうち 9 例 (45.0%)に *CDH1* の LOH が認められたが、LOH の有無と E-cadherin の異常発現については有意な相関は認められなかった ($p=0.38$)。

考察

LOH の解析では、*SMAD4/DCC* と *MSH2* の 2 つの locus で高分化腺癌に比べ、低分化腺癌、粘液癌で有意に LOH の頻度が高かった。これまでに *SMAD4/DCC* の locus とリンパ節転移や肝転移との関連が報告され、この領域における LOH と悪性度との関連も示唆されている。今回 *SMAD4/DCC* の locus に 81.8%に LOH が認められたことから、これらの遺伝子の低分化腺癌、粘液癌の発癌への強い関与が疑われた。さらに、17 番、18 番染色体に分布する 27 のマーカーによる LOH-ratio の解析では、高分化腺癌に比べ、低分化腺癌、粘液癌で有意に LOH-ratio が高く、低分化腺癌、粘液癌において genomic instability の関与が大きいことを示唆していると考えられ、腫瘍の進展にしたがって、癌抑制遺伝子の機能が失われ、逆に転移、浸潤の能力を獲得していくという可能性が考えられた。

また、E-cadherin と β -catenin の免疫染色では、両者の異常発現に有意な相関を認め、*in vitro* の実験で報告されていた E-cadherin の異常が β -catenin のシグナル伝達を促進するという結果を支持するものだった。これまでの高分化腺癌での報告と比較すると、

E-cadherin は低分化腺癌、粘液癌で異常発現が多く (78.6%)、 β -catenin は低分化腺癌、粘液癌で異常発現を示すものがやや少ない結果となり (62.2%)、高分化腺癌と異なり低分化腺癌、粘液癌の特徴と考えられた。さらに、低分化腺癌、粘液癌の 66% に E-cadherin プロモーター領域のメチル化を認め、これは E-cadherin の異常発現と相関したが、E-cadherin の LOH と異常発現とに相関はなく、低分化腺癌、粘液癌における E-cadherin の機能消失はメチル化の寄与が大きいことが示唆された。

結語

大腸低分化腺癌、粘液癌では *SMAD4/DCC* と *MSH2* の 2 つの locus の LOH の頻度および 17 番、18 番染色体に分布する 27 のマーカーによる LOH-ratio はともに高分化腺癌に比べ、有意に高率だった。これらより大腸低分化腺癌、粘液癌では、高分化腺癌に比べ、発癌において genomic instability がより強く関与していると考えられた。また、低分化腺癌、粘液癌では、高分化腺癌に比べて E-cadherin の異常発現の頻度が高く、E-cadherin の異常発現と LOH とは相関を示さなかったが、プロモーター領域のメチル化とは相関が認められ、E-cadherin の機能低下は LOH ではなく、メチル化による影響が大きいと考えられた。