

論文の内容の要旨

論文題目 SNP タイピングアレイを用いた子宮体癌における染色体変異の解析およびその予後との関連に関する考察

指導教員 矢野哲

東京大学大学院医学系研究科系

平成 17 年 4 月入学

医学博士過程

生殖・発達・加齢医学専攻

細川 さつき

[序論]

悪性腫瘍は発生および進展の過程で様々な遺伝子に発現異常が生じ、これが蓄積していくことで浸潤、転移などの悪性形質を獲得していくとされているが、この背景には個々の遺伝子変異に加えて染色体コピー数異常 (Chromosomal Instability : CIN) やマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite Instability : MSI) などのゲノム不安定性が重要な因子になることが明らかとされている。本研究は、子宮体癌におけるゲノム不安定性の全体像とその意義を詳細に解析することを目的とした。すなわち、CIN と MSI を解析することによりゲノム不安定性の包括的な評価を行い、さらに SNP (Single Nucleotide Polymorphism) タイピングアレイの特性を生かして、従来の方法 (CGH : comparative genome hybridization 法) で確認しえなかった Homozygous Deletion (HD) や Uniparental Disomy (UPD) の有無を解析した。さらに染色体コピー数異常の個数をもとに、CIN の程度について細分類し、MSI や臨床病理学的因子との関連性を解析し、ゲノム不安定性が予後に与える影

響について検証した。

〔方法〕

対象として子宮体癌（類内膜腺癌）25 人の患者の腫瘍および血液の採取を行い、DNA を抽出した。また、子宮体癌（類内膜腺癌）11 人については、癌部のみで DNA 抽出を行った。これら臨床検体はすべて、倫理委員会の承認のもと、患者の同意をえた上で使用した。これら 36 症例について、SNP タイピングアレイ施行し染色体コピー数の変化を解析した。

SNP タイピングアレイ（Mapping 50K Array Xbal, Affymetrix）の原理の概略は以下のとおりである。アレイ上には Y 染色体を除く全ゲノムの約 55,000 個の一塩基多型（SNP）についてプローブが設計されている。検体の DNA（250ng）を制限酵素により切断、アダプターを付加し、この DNA 断片をプライマーで増幅、精製した後、断片化した。断片化した PCR 産物をラベルし、アレイにハイブリダイゼーションした。シグナルを専用ソフトウェアにより数値化し、Genome Imbalance Map 法(GIM)によりゲノムワイドにアレル別の遺伝子コピー数解析を行った（正常 DNA を含む 25 例）。癌部からの DNA のみを用いた 11 例については、総染色体コピー数の変化を解析した。

次に、5 つのマイクロサテライトマーカーを用いて MSI 解析を行った。ラベルしたプライマーを用いて PCR 反応を行ったのち、3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で電気泳動を行い、GeneMapper Software Version 4.0 (Applied Biosystems) で解析を行った。

各症例の臨床病理学的因子を調べ、ゲノム不安定性との関連につき、Fisher' s Exact Test にて検定した。予後解析は、全生存期間を Kaplan Meier 法により解析し、予後の差は Log-rank test により検定した。多変量解析は、Cox の比例ハザードモデルを用いた。

〔結果〕

1. SNP タイピングアレイによるゲノムコピー数解析

アレル別コピー数解析において、一方のアレルの推定コピー数が 0 コピーである染色体

領域をヘテロ接合性の消失 (LOH) として選出した。LOH を伴わない領域でゲノム総コピー数が 3 コピー異常であると推定された部位を染色体増加領域とし、両アレルが欠失 (0 コピー) していると推定されたところを HD 領域とした。片アレルが欠失し、残りのアレルが 2 コピー以上の染色体領域を UPD として選出した。この結果、25 例のうち、21 例 (84%) に少なくとも 1 ヶ所以上のコピー数変化を認めた。染色体増加領域は 14 例 (56%)、LOH は 16 例 (64%) で認められた。HD が認められた染色体の部位 4 ヶ所は、6p21. 2、9p21. 3、10q23. 31、17q11. 21 であり、既知の癌抑制遺伝子である *CDKN2A* (*p16/INK4a*) および *CDKN2B* (*p15/INK4b*) (9p21. 3)、*PTEN*(phosphatase and tensin homolog) (10q23. 31)、*NF1* (neurofibromin 1) (17q11. 21) が含まれていた。UPD は 10 症例 32 ヶ所で認められた。既報でコピー数増加が多い 8q、10q など UPD が存在し、これまでコピー数増加とされていた部位に実際には LOH も生じているものがあることが明らかとなった。癌抑制遺伝子 *CDKN2A*、*CDKN2B*、*PTEN*、*TP53* を含むそれぞれの領域で、UPD を有する症例があることが確認された。中でも *PTEN* (10q23) 領域に UPD を認めるものが 4 例と最多であった。

各々の症例を、染色体コピー数変化を有する部位の個数により分類したところ、5 ヶ所以上で生じている CIN-Extensive が 7 例 (28%)、1-4 ヶ所で生じている CIN-Intermediate が 14 例 (56%)、いずれの部位でも生じていない CIN-Negative が 4 例 (16%) であった。

2. マイクロサテライト不安定性の解析

5 つのマーカーのうち 2 つ以上でマイクロサテライト不安定性を認める MSI-H (MSI-high) が 10 例、1 つ認めた場合の MSI-L (MSI-low) が 0 例、いずれも不安定性を認めない場合 MSS (Microsatellite stable) が 15 例であり、再発・死亡例はすべて MSS であった。

3. Chromosomal Instability と Microsatellite Instability の関係

CIN-Extensive では MSI-H が 14%のみであるのに対し、CIN-Negative では MSI-H が 75%と高頻度であった。CIN-Intermediate については、MSI-H が 43% (6/14) であり、CIN の程度の進行とともに、MSI の頻度が減少する傾向がみられた。

4. CIN, MSI および臨床病理学的因子との関連

CIN-Extensive 群と CIN-Intermediate / CIN-Negative 群の 2 群間で、臨床病理学的因子との関連を比較したが、年齢、分化度、脈管侵襲、臨床進行期、筋層浸潤のいずれの因子についても、有意な差は認められなかった。UPD の有無についても、これら臨床病理学的因子との間に有意な差は認められなかった。一方、MSI と MSS 間の比較では、MSI 陽性例で脈管侵襲陽性のものが有意に多く (P=0.049)、50 歳以上 (90%)、組織学的分化度 Grade2/3 (80%)、筋層浸潤 2/3 以上 (60%) の因子もそれぞれ高頻度であった。

5. CIN、MSI と予後

36 例における SNP タイピングアレイ結果をもとに全生存期間を解析したところ、臨床進行期 III/IV 期 (p=0.023)、組織学的分化度 G2/G3 (p=0.046) とともに、CIN-Extensive は有意に予後不良であった (p=0.0027)。これら 3 因子について多変量解析を行ったところ、CIN-Extensive のみが独立した予後不良因子であった。

[考察]

これまでの染色体変異の研究は CGH (comparative genome hybridization) 法によるものがほとんどで、相対的なゲノムの増減しか検出できないという問題点があった。本研究では SNP タイピングアレイを用いることで、CGH 法に比べさらに高解像度で、絶対コピー数の推定による染色体変異の解析が可能となった。今回、ホモ欠失領域が 2 例 4 カ所、UPD 領域が 10 例 32 ヶ所に存在しており、本法がこれらの異常の同定に極めて有効であり、また、子宮体癌において HD、UPD の存在が少なくないことが明らかとなった。中でも、*PTEN* 遺伝子については、UPD または HD が計 5 例 (20%) に認められており、従来の変異や LOH の報告ともあわせ、子宮体癌における重要性がさらに明らかとなった。また、既知の癌抑制遺伝子である、*CDKN2A* (*p16/INK4a*)、*CDKN2B* (*p15/INK4b*)、NF1 を含む部位でも HD や UPD が存在していた。HD は、LOH を示す領域のうちのごく一部にのみ存在するケースが多いため、従来の CGH 法での検出率は低く、また UPD は CGH 法では検出しえなかった。今回、これまで低

頻度とみられていた上記癌抑制遺伝子の機能喪失が子宮体癌で存在しうることが明らかとなり、SNP タイピングアレイ法の有用性が示された。また、高解像度で、より限局した領域に絞り込めることより、今後新規の癌抑制遺伝子の探索につながることも期待される。

CIN 陽性率は 84%であったが、染色体コピー数が 1~4 ヶ所に限局しているものが 56%を占めており、5 ヶ所以上のもは 28%に過ぎないことが明らかとなった。そこで、CIN の有無ではなく程度によって細分類したところ、CIN-Extensive は、臨床進行期・組織学的分化度などの臨床病理学的因子とは独立して予後不良であることが明らかとなった。CIN の程度が強いほど MSI 陽性率が低くなったことから、今回の分類が有用であると考えられた。以上より、子宮体癌（類内膜腺癌）は、病理学的診断で分類するだけでは病態解明に十分とはいえず、ゲノム不安定性という観点から細分類し、それぞれについて癌の発生・進展の機序をさらに解明していくことが必要と考えられる。