

論文の内容の要旨

論文題目 大腸癌進展ならびに予後における Smad4 蛋白ならびに染色体 18 番長腕の関与についての検討

指導教員 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 17 年 4 月入学
医学博士課程 外科学専攻
田中敏明

研究の背景と目的

近年増加傾向である大腸癌であるが、検診の必要性の啓発により、幸い早期により、良好な予後を期待できる症例も増加している。しかしながら、リンパ節転移・血行性転移を伴う進行例では、依然、再発を認める症例も多く、手術や化学療法で完治させることが困難である。したがって、大腸癌のリンパ節転移ならびに血行性転移に対する新たな治療法の開発は、予後改善に大きく寄与すると考えられる。

現在、大腸癌は、Adenoma-carcinoma sequence の過程で様々な遺伝子変異を伴う、「多段階発癌」のモデルが提唱されている。中でも、近年、染色体 18 番長腕に遺伝子が存在する Smad4 蛋白は、大腸癌の進展において重要な鍵となっていることが、明らかとなった。Smad4 は TGF- β の細胞内シグナル伝達に関与する分子であり、様々な蛋白の転写制御を通じて、細胞の分化増殖の抑制を行っている。そのため、Smad4 の機能不全は、細胞の分化制御・増殖制御機構の破綻につながり、腫瘍の進展に関与すると推測される。

これまで、Smad4 蛋白ならびに、その遺伝子の存在する染色体 18 番長腕の Loss of Heterozygosity(以下「18qLOH」)は、大腸癌術後の予後との関係を検討されており、Stage II ならびに Stage III の大腸癌では、18qLOH ならびに Smad4 蛋白発現低下が予後規定因子という報告が散見される。一方、臨床上的大腸癌術後の予後規定因子は、リンパ節転移ならびに血行性転移である。しかしながら、これまでの研究では、分子細胞学的な予後規定因子である 18qLOH ならびに Smad4 蛋白が、臨床上的予後規定因子であるリンパ節転移・血行性転移に如何に関与するかは評価されていない。

そこで本研究では、18qLOH ならびに Smad4 蛋白発現が、大腸癌血行性転移、そのなかでも肝転移について関与しているかを検討した。また、さらに、大腸癌リンパ節転移についても、18qLOH ならびに Smad4 蛋白の関与を検討した。

また、現在、同時性肝転移切除症例の予後について、これらの分子が寄与しているかを検討した報告は認められない。大腸癌肝転移症例は、転移巣も含めた治癒切除により 5 年生存率の改善も期待でき、また、中には完治せしめる症例も認められている。しかしながら、中には、切除後に短期間に再発を認める症例もあり、同じ同時性肝転移症例群でも、慎重な経過観察を要する症例があるのも事実である。そのため、もし 18qLOH ならびに Smad4 蛋白により、切除後予後不良になりうる同時性肝転移症例を抽出することができれば、術後の経過観察のプロトコルを立てる上での判断基準の一つになりうると考えられる。そこで、本研究では、18qLOH ならびに Smad4 蛋白が、同時性肝転移切除症例の術後生存率に寄与しているかも検討を行った。

検討

(1)18qLOH/Smad4 蛋白の大腸癌肝転移への関与の有無についての検討

【対象】

当科で 1980 年から 2005 年まで手術を起こった大腸癌 2783 症例のうち、261 症例が同時性肝転移に対し切除を行われた。今回は、リンパ節転移有無の影響を避けるための、そ

のなかでも、リンパ節転移を認めない症例 20 例を検討の対象とした（検討群）。これらの症例と、深達度・分化ならびに腫瘍の局在を一致させた、非肝転移症例を対照群とした。

【18qLOH の検討】

検討群ならびに対照群について、18qLOH の有無を検討した。

検体は、手術時に得られたと凍結検体もしくは、パラフィン切片から採取し、Qiagen の DNA 抽出キット DNA 抽出を行った。評価のためのプライマーは、染色体 18 番長腕に位置する D18S363、D18S474、D18S46 を使用し、これらのプライマーについて、LOH を検討した。

【Smad4 の検討】

検討群ならびに対照群について、Smad4 の発現の有無を免疫染色の手技で行った。5 μ m 厚のパラフィン切片を、Smad4 抗体(SantaCruz Biotechnology)を一次抗体に用いて染色を行った。染色の程度により、三段階の評価をおこなった。すなわち、(a)まったく染色されない群、(b)染色されるが正常粘膜よりも染色の弱いもの、(c)正常粘膜よりも染色の強いものとした。

【結果】

同時性肝転移を伴う群では、伴わない群と比して、有意に 18qLOH の割合が高かった。また、肝転移を伴う群では伴わない群に比して、有意に Smad4 の染色の低下を認めた。

これにより、18qLOH ならびに Smad4 が同時性肝転移に関与している可能性が示唆された。

(2) 18qLOH/Smad4 蛋白の大腸癌リンパ節転移への関与の有無についての検討

【対象】

当科で1987年から2004年までに手術をおこなったリンパ節転移陽性大腸癌症例のうち、血行性転移を伴わない症例を抽出した。これらの症例に対し、深達度、分化度、腫瘍の局

在が一致させた対照群との間で、Matched Pair Test をおこない、18qLOH ならびに Smad4 蛋白発現を検討した。

【18qLOH の検討】

先述の手技と同様に行った。

【Smad4 の検討】

先述の手技と同様におこなった。

【結果】

リンパ節転移を伴う群では、伴わない群と比して、有意に 18qLOH($p=0.029$)の割合が高かった。また、リンパ節転移を伴う群では伴わない群に比して、有意に Smad4 の染色の低下を認めた($p=0.00075$)。

これにより、18qLOH ならびに Smad4 が、大腸癌リンパ節転移に関与している可能性が示唆された。

(3)18qLOH/Smad4 蛋白の同時性肝転移大腸癌切除後の予後への関与についての検討

【対象】

当科で 1993 年から 2004 年までに治癒切除手術を行った、大腸癌同時性肝転移症例 56 例を対象とした。これらについて、切除後の Disease Free Survival ならびに Overall Survival について、18qLOH ならびに Smad4 蛋白染色との関連を検討した。

【18qLOH の検討】

先述と同様の手技で評価を行った。

【Smad4 の検討】

先述と同様の手技で評価を行った。ただし、染色の程度は、二段階に判断した。すなわち、正常粘膜以上の染色度を High stain、それ以下を Low Stain とした。

【結果】

Smad4 蛋白発現は、Disease-free Survival ならびに Overall Survival に有意な影響をみとめなかった(Smad4:Disease-free Survival (p=0.67),Overall Survival(p=0.38))。しかしながら、18qLOH を認める症例は、術後の Overall Survival が有意に低率であった(18qLOH:Disease-free Survival (p=0.61), Overall Survival(=0.024))。

考察

本研究では、18qLOH ならびに Smad4 が大腸癌の同時性肝転移ならびにリンパ節転移に関与することを明らかとした。また、18qLOH が大腸癌同時性肝転移切除後の予後規定因子となることを明らかとした。

18qLOH が大腸癌に高率に認められることを示唆した Vogelstein らの報告に次いで、大腸癌の進展や予後の側面から 18qLOH が解析されてきた。また、染色体 18 番長腕に遺伝子が存在する Smad4 蛋白についても同様に、大腸癌の進展や予後について検討が重ねられてきた。しかしながら、これまでの報告では、大腸癌の個々の臨床学的因子についての関与は検討されていなかった。特に、臨床学的因子のなかでも、リンパ節転移・血行性転移は、術後の予後や治療方針の選択に大きくかかわるものであり、これらの因子に対する 18qLOH ならびに Smad4 蛋白の関与を解明することは、ひいてはリンパ節転移・血行性転移のメカニズムの解明に寄与すると考えられる。

そこで、本研究では、18qLOH ならびに Smad4 蛋白の、同時性肝転移ならびにリンパ節転移への関係を検討し、これらの関与を明らかとした。これより、本研究は、大腸癌の転移に対する、新たな分子学的な治療の開発に寄与すると考える。