



## Microsatellite instability of papillary subtype of human gastric adenocarcinoma and hMLH1 promoter hypermethylation in the surrounding mucosa

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 郭, 榮軍 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1175">http://hdl.handle.net/10271/1175</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 322号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	郭 榮 軍		
論文題目	<p>Microsatellite instability of papillary subtype of human gastric adenocarcinoma and hMLH1 promoter hypermethylation in the surrounding mucosa  (ヒト胃ガン乳頭状型にみられるマイクロサテライト不安定症と周囲粘膜における hMLH1 プロモーター領域のメチル化)</p>		

博士(医学) 郭 榮 軍

## 論文題目

Microsatellite instability of papillary subtype of human gastric adenocarcinoma and hMLH1 promoter hypermethylation in the surrounding mucosa

(ヒト胃ガン乳頭状型にみられるマイクロサテライト不安定性と周囲粘膜におけるhMLH1プロモーター領域のメチル化)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

胃癌は組織型、細胞の表現型、遺伝子型、生物学的マーカー、生物学的行動などによって顕著な異質性を示す。乳頭状型(以下papillary type)の胃癌は比較的稀で、形態学的に特徴を持った胃癌であり、そしてしばしば早期癌として発見される。事実、進行癌では典型的なpapillary typeを定義することは困難なことがあり、代わりにいわゆるpapillotubular adenocarcinoma(pap-tub1)という分類用語を用いる。Papillary typeの分子生物学的entityはあやふやなままである。おそらくそれは、日常の業務では多くの病理学者が一般的にこれを高分化型胃癌や他の腸型のカテゴリーに含め、別個の分類としないことが多いためであろう。最近特にこの形態に焦点をあててきた我々は、すでにmicrosatellite instability(MSI)の頻度が高いという予備的な知見を報告したが、少数例にすぎなかった。今回、我々は胃腺癌のpapillary structureの特異的な形態学的phenotypeに焦点を当て、さらに症例をふやしてその明確な分子生物学的特徴を明らかにすることを試みた。

### 〔材料ならびに方法〕

腫瘍組織と対応する非腫瘍組織のgenomic DNAをmicrodissectionによってパラフィン包埋組織から抽出した。MSIを検出するためにPCR、denatured electrophoresisそして渡銀染色が用いられた。MSIに付随した変異の検出や、hMLH1遺伝子のプロモーター中のCpG islandのメチル化を分析するためにはPCR、ダイレクトシーケンスそして制限酵素消化法を用いた。免疫組織学的染色は抗hMLH1, hMSH2, p53抗体そして粘液性状を検出するための抗体を用いて行った。外科的に切除された134人の日本人の胃癌の保存されたホルマリン固定、パラフィン包埋検体を用いた。症例はpapillary優位のpapillotubular adenocarcinomaを含む74例のpapillary typeの検体(27例が早期癌で47例が進行癌)、比較として同じ病期の管状型(以下tubular type)の早期高分化癌(tub1-JCS, Japanese Classification System, 胃ガン取り扱い規約)が16例、そして44例のsignet-ring cell cancer(26例が早期癌で18例が進行癌)である。

### 〔結果〕

早期のpapillary typeの胃癌と早期の高分化管状腺がん(以下tub1)におけるMSI-Hの頻度に有意な差が見られた。早期のpapillary typeの胃癌の27例中7例(26%)でMSI-H(広範囲遺伝子不安定性)であったのに対し、一方16例すべてのtub1 typeの検体はMSI-LまたはMSSであった( $p < 0.01$ )。興味深いことに、(papillotubular phenotypeを含む)papillary typeの胃癌におけるMSI-Hの頻度は早期癌より進行癌で有意に低い結果であった。すなわち進行癌では47例中3例(6%)であった。我々はダイレクトシーケンスを用いてすべてのMSI-Hの症例においてすでに知られているMSIの標的遺伝子TGF $\beta$ RII(BATRII), IGFRII, BAX,

hMSH3そしてhMSH6遺伝子の一部の塩基配列を決めた。MSI-Hの10症例のうち9例でTGF $\beta$  II遺伝子の(A)<sub>10</sub>領域においてフレムシフト変異が明らかになり、5例でhMSH3遺伝子の(A)<sub>8</sub>領域のフレムシフト変異、3例でhMSH6遺伝子の(C)<sub>8</sub>領域とIGFIR遺伝子の(G)<sub>8</sub>領域のフレムシフト変異、2症例で、BAX遺伝子の(G)<sub>8</sub>領域におけるフレムシフト変異が認められた。

調べた全ての検体でhMSH2は陽性に染色され、すべてのMSI-Hの腫瘍部でhMLH1は染色されなかった。hMLH1染色陰性の癌組織症例においては隣接する非癌組織でもしばしば陰性であった。さらにhMLH1免疫染色陰性例(計10症例)と、10例のhMLH1陽性例において、hMLH1のプロモーター領域のメチル化の状態を分析した。ここで分析された領域はすでに、大腸癌において特にhMLH1の発現の欠如に関係するメチル化が報告されている小さい領域である。hMLH1染色陰性の10例全てにおいてhMLH1のプロモーター部位の異所性メチル化がそのCpG islandにおいて認められたが、hMLH1染色陽性の10例ではメチル化されていなかった。我々はさらに、MSI-Hの症例において腫瘍に隣接するあるいは遠隔の非腫瘍粘膜において、hMLH1のこの部位メチル化とMSIについて検討した。10例中4例(40%)で隣接する非腫瘍粘膜においてもメチル化が検出された。しかしその程度は腫瘍より低い程度であった。この知見は免疫染色の結果と一致する、すなわち隣接する粘膜は免疫組織学的にもhMLH1について部分的に陰性に染色され、遠隔の粘膜は陽性に染まるということである。興味深いことに、MSIはどの検体においても隣接する非腫瘍粘膜には認められなかった。

#### [結果ならびに考察]

我々はpapillaryあるいはpapillary-dominant typeの胃癌を周囲粘膜を含め、ミスマッチ修復系の機能不全に傾きやすいという分子生物学的性格をもつものとして特徴づけた。このタイプの癌はMSI関連の変異について独特のプロフィールを有していた。hMLH1のプロモーターのメチル化がこの場合のミスマッチ修復系の機能不全の原因であり、このタイプの癌の発がん過程の早期の出来事として起こっていることが想定された。

### 論文審査の結果の要旨

乳頭状型(papillary type)胃癌は早期癌として発見されることが多い比較的稀な、形態学的に特徴を持つ胃癌である。しかし、進行癌では、典型的なpapillary typeを同定することは困難であり、papillotubular adenocarcinoma(pap-tub1)と分類されることが多い。申請者らは、この形態学的な特徴を示すpapillary type胃腺癌の分子生物学的性格を明らかにすることを試みた。得られた主な結果は以下の通りである。

(1)microsatellite instability(MSI)：5種類のマイクロサテライトについて検討した結果、早期のpapillary type胃癌で7/27例(26%)がMSI-H(広範囲遺伝子不安定性)であったのに対し、早期の高分化管状腺癌(tub1)の16例ではMSI-Hを示すものは無かった。また、papillary typeの進行癌では3/47例(6%)がMSI-Hを示し、早期癌より有意に低値であった。(2)MSI標的遺伝子：5個のMSI標的遺伝子をMSI-Hの症例において検討した結果、TGF $\beta$  RII(BATRII)遺伝子のフレムシフト変異が最も高頻度(90%)に認められ、次いでhMSH3遺伝子(50%)、hMSH6遺伝子(40%)の順で高頻度に変異を認め、BAX遺伝子の変異は20%と最も低かった。(3)免疫組織学化学的染色：hMLH1、hMSH2、p53に対する抗体、および粘液性状を検出する抗体を用いた結果、すべてのMSI-Hの腫瘍部でhMLH1は染色されず、また粘液性状は腸型であった。この場合、隣接する非腫瘍組織でもhMLH1はしばしば陰性であった。しかし、hMSH2は調べたすべての検体

で陽性に染色された。(4)hMLH1遺伝子プロモーター領域のメチル化の解析：bisulfite修飾により、CpG islandのメチル化の状態を解析したところ、hMLH1染色陰性10例すべてにhMLH1遺伝子プロモーター領域の異所性メチル化が認められた。逆に、hMLH1染色陽性10例ではメチル化を認めなかった。(5)腫瘍隣接組織におけるメチル化とMSI: MSI-Hの症例10例中4例で隣接する非腫瘍粘膜にhMLH1遺伝子プロモーター領域のメチル化が認められた。この結果はhMLH1免疫染色と一致し、腫瘍隣接粘膜は部分的に染色されなかった。しかし、MSIはすべての検体で隣接する非腫瘍組織には認められなかった。

以上より、申請者らはpapillaryあるいはpapillary-dominant typeの胃癌はその隣接粘膜も含め、ミスマッチ修復の機能不全を起こしやすいことを示唆した。さらに、この原因としてhMLH1遺伝子プロモーター領域のメチル化が関与する可能性を示唆した。

審査委員会では、組織学的に多様な胃癌の中でpapillary typeに注目し、その分子生物学的特徴、および発癌機構に示唆を与える結果を示した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) MSI-H, MSI-L, MSSの定義について
- 2) papillary typeの胃癌におけるMSI-Hの頻度が早期癌より進行癌で低い理由について
- 3) 用いたmethylation analysis (bisulfite修飾法)の感度は
- 4) 腫瘍部において認められたhMLH1プロモーターのメチル化はヘテロか
- 5) メチル化を検討したプロモーター領域には重要な転写要素が存在するか
- 6) 腫瘍に隣接する粘膜でメチル化が認められ、遠隔の粘膜ではメチル化が認められないというパターンは全ての症例で検出されたか
- 7) hMLH1遺伝子の変異は検出されたか
- 8) hMLH1に対する抗体の特異性について
- 9) hMLH1遺伝子の発現を免疫染色以外の方法で検討したか
- 10) p53に対する抗体は正常または変異のどちらを認識するものか
- 11) プロモーターのメチル化によるMSI-Hはpapillary typeの胃癌のみに認められるものか
- 12) TGF  $\beta$  RIIが癌抑制遺伝子となりうる理由は
- 13) MLH1 KOマウスはpapillary typeの胃癌を発症するか
- 14) 胃癌も大腸癌と同様の遺伝子異常で発症するのか
- 15) MSI-H/MLH1(+)は早期胃癌の検出に有用か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	小 出 幸 夫	
	副査	北 川 雅 敏	副査 今 野 弘 之