

Expression of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in gastric adenomas by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: en<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-11-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 荒井, 肇<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/1048">http://hdl.handle.net/10271/1048</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 195号   | 学位授与年月日 | 平成 8年 3月26日 |
| 氏名    | 荒井 肇   |         |             |
| 論文題目  | <p>Expression of transforming growth factor-<math>\alpha</math> and epidermal growth factor receptor in gastric adenomas by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction<br/>                     (胃腺腫に於ける transforming growth factor-<math>\alpha</math> 及び epidermal growth factor receptor mRNA の発現について -competitive PCR 法を用いた定量化)</p> |         |             |

博士(医学) 荒井 肇

論文題目

Expression of transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in gastric adenomas by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction

(胃腺腫に於ける transforming growth factor- $\alpha$  及び epidermal growth factor receptor mRNA の発現について- competitive PCR 法を用いた定量化)

論文の内容の要旨

〈目的〉 TGF- $\alpha$  は細胞の増殖・分化に関与する生理活性物質であるが、その受容体である EGF-R と共に上部消化管悪性腫瘍で産生が増加していることが知られており、腫瘍自身の増殖に深く関与していると考えられている。また胃癌組織に於ける増殖因子についての報告は散見されるが、その意義については未だ結論に至っていない。さらに、胃腺腫症例に於ける増殖因子及びその受容体の mRNA の発現について詳細に検討された報告はない。そこで、胃癌の良悪性境界病変・前癌病変といわれている胃腺腫に於ける TGF- $\alpha$ ・EGF-R の発現について、competitive RT PCR 法を用い胃癌・過形成性ポリープ及びそれらの背景粘膜との比較から、癌に対する腺腫の増殖因子から見た位置付けを明らかにすることを目的に検討を行った。

〈方法〉内視鏡下あるいは手術材料から得られた臨床検体(胃腺腫14例・分化型胃癌8例・過形成性ポリープ5例及びその背景粘膜として体上部大弯・前庭部小弯粘膜)につき、mRNA の抽出後 reverse transcription を行い、cDNA に変換した。次に competitive PCR を施行した。すなわち、TGF- $\alpha$ ・EGF-R の primer (各々99、153bp) と同一の primer で増幅され、塩基長で識別される DNA (competitor) を合成(各々66、81mers)し、各 tube に一定濃度で希釈したものを internal control として加えた。tube あたりの RNA 量は  $0.2 \mu\text{g}$ 、試薬・水を加え総量  $50 \mu\text{g}$  とし、32cycle の PCR を行った。PCR products をアガロースゲルで泳動後バンドの濃度をデンシトメトリーで測定し、cDNA と competitor の濃度比が1となる場所の competitor の量を求め、RNA  $0.2 \mu\text{g}$  あたりの TGF- $\alpha$  及び EGF-R の値とした。

〈結果〉胃腺腫14症例の病変部に於ける TGF- $\alpha$  mRNA の平均値は  $(4.43 \pm 1.30) \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$ 、EGF-R mRNA の平均値は  $(3.33 \pm 1.07) \times 10^{-3} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$  であり、前庭部小弯 [TGF- $\alpha$  :  $(1.95 \pm 0.79) \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$ 、EGF-R:  $(0.84 \pm 0.28) \times 10^{-3} \text{ng}/\mu\text{g}$ ] 及び体上部大弯 [TGF- $\alpha$  :  $(2.14 \pm 0.88) \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$ 、EGF-R:  $(0.28 \pm 0.09) \times 10^{-3} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$ ] の背景粘膜に比し高値であった (EGF-R は病変部/体部で  $P < 0.01$ 、病変部/前庭部で  $P < 0.05$  で共に有意差あり)。一方分化型胃癌の病変部に於ける TGF- $\alpha$  mRNA の平均値は  $(13.18 \pm 7.79) \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$ 、EGF-R mRNA の平均値は  $(3.86 \pm 2.29) \times 10^{-3} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$  であり、腺腫の病変部との間に統計学的有意差は認められなかった。過形成性ポリープでは TGF- $\alpha$  mRNA の平均値は  $(0.37 \pm 0.21) \times 10^{-5} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$ 、EGF-R mRNA の平均値は  $(0.51 \pm 0.32) \times 10^{-3} \text{ng}/\mu\text{gRNA}$  であり、これらは腺腫・分化型胃癌の病変部に比し有意に低値であった。

〈結論〉Competitive RT PCR 法により、胃粘膜組織中 TGF- $\alpha$  及び EGF-R mRNA の定量を試みた。胃腺腫では、病変部位に於いて背景粘膜に比し EGF-R mRNA の有意な上昇が見られ、TGF- $\alpha$  mRNA も上昇する傾向にあった。また過形成性ポリープに比し病変部に於ける両因子の有意な上昇が見られたが、腺腫と分化型胃癌の病変部同士では有意差は見られなかった。従来の報告では

P53やAPC遺伝子のmutationが胃腺腫においても何割かで認められ、胃癌発生の早期段階での関与が考えられている。NasimらやFlippeらの免疫組織学的検討によれば、TGF- $\alpha$ はgastric dysplasiaにおいて60%が陽性であり、担癌患者の背景粘膜においてTGF- $\alpha$ 及びEGF-Rはすでに増加していると述べている。我々の研究においても、胃腺腫・癌においてTGF- $\alpha$ とその受容体であるEGF-RのmRNAもcarcinogenesisの早い時期での関与が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ) は細胞の増殖・分化に関与する生理活性物質であり、ヒト腫瘍との関係については、上部消化管腫瘍における産生増加が知られており、その受容体であるEpidermal growth factor receptor(EGF-R)と同様、腫瘍自体の増殖への関与がいられている。一方、胃の腺腫は主に本邦で頻繁に行われる胃の内視鏡検査や、詳細な病理学的検討によって認識されている。異型性の比較的乏しい胃上皮の増生である。胃癌についてはこのような増殖因子の知見が集積しており、また腫瘍遺伝子や腫瘍抑制遺伝子などの変化については最近胃腺腫においても報告されるようになったが、胃腺腫における増殖因子やその受容体の発現やその意義に関する詳細な検討はない。

(対象及び方法) 申請者は内視鏡的に、典型的な扁平腺腫の形態をとる病変14例及び対照として、胃癌8例・過形成性ポリープ5例に関し、そのtotal RNAをsmall scaleのグアニチウムイソシアネート法でとり、DNAを消化したあとRNAを定量し、random primerをもとにマウス白血球ウイルスの逆転写酵素でcDNAを合成した。この一定量cDNAに対し、TGF- $\alpha$ とEGF-Rの遺伝子配列から99、153bpをはさむPCR primerを合成しこれらの遺伝子発現の同定を試みた。さらに定量するため、人工的なtemplateとしてそれぞれ66、81bpのヌクレオチドを用いた。これらは、両側が同じprimerで中央はそれぞれのcDNA配列の中央部からとったものである。中央部の配列はのちにPCR産物をDNAハイブリダイゼーションさせる時のprobeに用いた。この人工的templateをcompetitorとして定量的PCRを行った。申請者は試料RNAの量・サイクル数・加えるcompetitorの量を変数として検量線を描き、今回の定量の妥当性を綿密に検討した後、上記のような臨床サンプルについて以下の結果を得た。

(結果) 胃腺腫においては、背景粘膜に比してTGF- $\alpha$  mRNAもEGF-R mRNAも高値を示し、それぞれ  $(4.43 \pm 1.30) \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ gRNA、 $(3.33 \pm 1.07) \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ gRNAであった。EGF-R mRNAはモル数になおしてもTGF- $\alpha$  mRNAの約100倍存在し、両者とも胃前庭部・胃体部非腫瘍部粘膜と比べて有意に高値であった。また、分化型胃癌でもやはり非腫瘍部に比して高値で、胃腺腫と比べては差がなかった。過形成性ポリープではこれらの値は、有意に低値であった。

(結論) 申請者はこれらの観察をもとに、TGF- $\alpha$ ・EGF-Rは胃腫瘍の早期病変においてすでに高発現しており、P53やAPCとともに胃癌発生においても早期に関与する可能性があるとした。

以上の研究に関し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) 胃の腺腫に関する本邦の研究と同種の病変に対する欧米の研究との差について
- 2) 胃癌の多段階発現を論じる場合の腺腫の位置付けと、各段階におけるその腫瘍遺伝子や腫瘍抑制遺伝子の変化といった、分子病理学的な知見について
- 3) 胃の腺腫の分類について
- 4) 生検材料からRNAを抽出する際の問題点について

- 5) RNA 抽出した生検組織材料に占める腫瘍組織の割合について
- 6) Competitive PCR の template を設計する際の基準
- 7) 1 個の生検組織から RNA がどれくらい採れるか。また採れない場合はどうするのか
- 8) 非腫瘍部の粘膜部から採取する際、部位による腸上皮化生の程度などを考慮しているか
- 9) 欧米の報告に於ける胃の dysplasia という病変との異同について
- 10) TGF- $\alpha$  と EGF-R ではモル数で約100倍異なるが、その生理学的意義はどうか
- 11) 胃腺腫の部位による差はあったか
- 12) レセプターと TGF- $\alpha$  との相互関係はどうであったか
- 13) 胃癌については、早期と進行癌とで差はあったか
- 14) 定量化する際の internal control に  $\beta$ -actin を置いた場合、部位による差はあるか。また、internal marker として他にどのようなものを使用しうるか
- 15) 多発腺腫の場合、両者で差はあったか

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評価した。

|         |    |    |   |   |   |   |    |    |   |   |   |   |
|---------|----|----|---|---|---|---|----|----|---|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査 | 教授 | 梶 | 村 | 春 | 彦 |    |    |   |   |   |   |
|         | 副査 | 教授 | 馬 | 場 | 正 | 三 | 副査 | 教授 | 藤 | 田 | 道 | 也 |
|         | 副査 | 講師 | 今 | 野 | 弘 | 之 | 副査 | 講師 | 花 | 井 | 洋 | 行 |