HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Mutational analyses of multiple target genes in replication error positive gastric cancer with histological heterogeneity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 瑩 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1091

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　２３８号	学位授与年月日	平成１０年　３月２６日
氏　　名	王　　瑩		
論文題目	Mutational analyses of multiple target genes in replication error positive gastric cancer with histological heterogeneity (多彩な組織像をもった胃癌における複製エラーと、その標的遺伝子の変異について)		

博士(医学)　王　　瑩

論文題目

Mutational analyses of multiple target genes in replication error positive gastric cancer with histological heterogeneity

(多彩な組織像をもった胃癌における複製エラーと、その標的遺伝子の変異について)

論文内容の要旨

〔背景および目的〕

ヒト腫瘍にはしばしば同一組織内に光学顕微鏡レベルで認識できる多彩な組織像が認められることがある。とくに胃癌では一つの腫瘍内で、複数の組織像、つまり管腔形成のつよい部分、粘液産生のつよい部分といったものが同時に存在する症例が存在し、喜納らはこの傾向の著しい症例を gastric cancer with varied structureと呼んでいる。一方、ゲノム中に散在するCA反復配列 (CA repeats) などにおけるマイクロサテライト (microsatellite) の変化がさまざまな腫瘍で解析され、腫瘍内の遺伝的多様性の一指標としても用いられる。胃癌においても多くの研究がなされていて、従来発表された文献によると胃癌におけるマイクロサテライトの変化であらわされる遺伝的不安定性 (microsatellite instability、以下MI) の頻度は15%から39%となっている。これらの報告のなかには、組織型との関係についてふれているものもあるが、同一胃癌内の異なった組織型におけるMIを詳細に論じている報告は少ない。本研究では、多彩な組織型をもった胃癌におけるMIを解析することにより、形態学的にみる腫瘍の多彩な様相が、分子レベルでの遺伝的不安定性と対応しているものかどうかを検討した。また、ここに示した MI はいくつかのミスマッチ修復遺伝子の機能不全による replication error(RER) をみているのであるが、最近機能不全をおこしたミスマッチ修復遺伝子の標的となって腫瘍の生物学的性質に影響を与え得る遺伝子がいくつか明らかになってきた。その中の3つの遺伝子、つまりTGFβのtypeⅡレセプター、ミスマッチ修復遺伝子そのものであるhMSH3とhMSH6の変化についても検討した。

〔症例ならびに方法〕

1．サンプルの選択

浜松医科大学附属病院ならびに関連病院において手術された、多彩な組織像をもった進行性胃癌20例を選んだ。男性8例、女性12例で、年齢は42才から89才におよんでいた。

2．パラフィンDNA抽出

10μパラフィン切片5枚をキシレンで脱パラフィンし、Tween−20をふくむ溶解液中で、Proteinase K処理を行い、煮沸した後の上清を新しいチューブに移し、上清中のDNAを以下の polymerase chain reaction(PCR)に用いた。

3．Microsatellite Instabilityの解析

CA repeatのlociとして、D1S116、D2S136、D3S1067 、D5S82、MSX2、D10S197、D17S261、TP53を選び、その部分をはさむプライマーで、抽出したDNA のPCR を行った。腫瘍組織において少なくとも1ケ所microsatellite locusで異常なバンド(extra−band)が確認されればreplication error陽性とし、3 loci以上でRER陽性であった症例をextensive RER(mutator phenotype)とした。

4．標的遺伝子の解析

ミスマッチ修復 (mismatch repair) 遺伝子の標的遺伝子として、TGFβ受容体Ⅱ型遺伝子(TGFβR

Ⅱ）のエクソン３にあるアデニンの10回繰り返し配列（codon 125−128）と DNA ミスマッチ修復遺伝子 hMSH3のアデニンの８回繰り返し配列（codon 381−383)、hMSH6のシトシンの８回繰り返し配列(codon 1116−1118)を RI−SSCP 法で検出をした。RI−SSCP で異常バンドの出た症例に関してはさらに塩基配列を決定した。

〔結果〕

20例の gastric cancer with histological heterogeneity について、異なった組織像を示す40ヶ所の DNA の genetic instability を検索した。異なった組織型の組み合わせとしては高、中分化型腺癌（well to moderately differentiated adenocarcinoma）に相当する、pap、tub1または tub2（胃癌取り扱い規約による組織分類名)と低分化型腺癌（poorly differentiated adenocarcinoma)(por）の組み合わせが、15例と最も多く、残りは por 又は tub と signet−ring cell carcinoma(sig)の共存であった。とりあげた症例はいずれもひとつの組織型が少なくとも30％から50％をしめるものに限り、つまり腫瘍のごく一部が異なった形態を呈するといった症例は含めなかった。20例中どちらかの component に少なくとも１カ所の locus でRER陽性であったのは７例（35％）であった。７例の中６例が３カ所以上の loci で異常が見られた。同一症例では、低分化型（poorly differentiated）の部分で、多数の loci で RER が見られ、共存する高分化型(well differentiated)部分では見られなかった症例、またはその逆の症例もあった。両方の部分でRER陽性を呈する症例が大部分（４例）であった。

RER 陽性の症例について現在知られている標的遺伝子のうち TGFβRⅡ、hMSH3、hMSH6の変化を調べた。７例のうち４例、５病変にSSCP検索でTGFβRⅡ遺伝子のpoly(A)10tractに異常バンドが認められた。これらの症例において塩基配列を決定すると、１塩基欠損が確認された。hMSH3のpoly(A)8tract内では異常は４例に変化が見られ、塩基配列を決めると、４例８病変のうち６病変で同一組織型内の異なった部位で、それぞれ１および２塩基欠損という複数の変異の存在することが明らかになった。ほかの２病変では１塩基欠損のみが確認できた。今回検索した症例ではhMSH6遺伝子のpoly（C)8tractの変異は認められなかった。これら RER 陽性症例の正常組織では変異は認められず、いずれも体細胞変異によるものと考えられた。

〔結論〕

今回検討した多彩な組織型をもった胃癌症例ではRERが35％の症例に認められ、諸家報告の頻度（15％−39％）の範囲内ではあったが、３か所以上 microsatellite loci の RER 頻度は極めて高率（6/7、85.7％）であった。一方 RER 陽性症例について TGFβRⅡ、hMSH3標的遺伝子としての変異が各４例に認められた。特にミスマッチ修復遺伝子 hMSH3では同一組織型内でも１と２塩基欠損という複数の変異がはじめて確認された。これらの結果、同一腫瘍組織内の異なった組織像の部分の MI およびその標的遺伝子の解析から、多彩な組織型をもつ腫瘍の分子レベルで heteroclonality が明らかになった。それらの標的遺伝子の変化により実際にその遺伝子の不活化が起こって、胃癌が進展していく可能性がある。

論文審査の結果の要旨

胃癌において同一腫瘍内にしばしば多彩な組織像が認められる。管腔形成性や乳頭状に増殖した分化度の高い部分、粘液産生の強い部分、管腔形成がくずれ異型性の強い部分などが一つの症例に複合して存在することがある。一方、ゲノム中に散在する CA 反復配列によるマイクロサテライトの不安定性が

様々な腫瘍で解析され、腫瘍のゲノムの多様性の指標とされている。胃癌において従来報告されている論文によると、この遺伝的不安定性（microsatellite instability、以下 MI）の頻度は15％から39％とされている。組織型との関連では未分化の腫瘍ほど MI が高い傾向が示されている。しかし、同一腫瘍内の異なった組織型における MI の解析はされていない。本研究では、同一腫瘍のなかで異なった組織型を有する症例について、形態学的にみる癌組織の多様性が遺伝子レベルの遺伝子不安定性と如何に対応するか検討された。MI はミスマッチ修復遺伝子の機能不全による replication error(RER)をみているのであるが、今回ミスマッチ標的遺伝子のうち、癌抑制遺伝子 TGFβRⅡ、ミスマッチ修復遺伝子であるhMSH3およびhMSH6の変化について検討された。

対象は浜松医科大学および関連病院において手術された、多様な組織像をもった進行性胃癌20例が選ばれた。高中分化腺癌と低分化腺癌の組み合わせ15例、残りは高中分化腺癌あるいは低分化腺癌と印環細胞癌の組み合わせであった。これらの症例について顕微鏡下で組織型のことなる切片から切り取り、DNA が抽出された。これらのサンプルを用いてPCR によるMIの解析が行われた。腫瘍内に少なくとも１カ所microsatellite locus で異常なバンドが認められるものをRER陽性とした。標的遺伝子の塩基配列による解析が行われた。20例、40箇所の DNA を解析した結果、７症例（35％）に RER 陽性が認められた。７症例中４例に TGFβRⅡに異常を認め、hMSH3では４例、hMSH6では異常が認められなかった。同一腫瘍内の異なった組織型において異なる遺伝子異常を示す症例が３例認められ、多彩な組織型をもつ胃癌の分子レベルの多様性が明らかになった。高中分化癌部分に認めても、低分化癌部分に変異を認めない症例も存在することが明らかになった。

審査委員会では、これらの結果は、同一の胃癌において組織型の多様性によって異なる遺伝子異常が起こることを直接示した研究として高く評価した。

審査の過程において、申請者において次のような質疑がされた。

1）同一組織型の胃癌の異なった部位から異なる遺伝子異常が起こる可能性もあるのではないか、すなわち、組織型と無関係に異なる変異の起こる可能性について
2）癌の早期から分子レベルの多様性が生じたのか、途中から生じたのか、分子レベルの異常は癌の進行に伴って累積していくと考えるか
3）研究をスタートするに当たってどの点に一番興味があったのか
4）３つの標的遺伝子をなぜえらんだか、標的遺伝子をもっと多く選べば変異はもっと多く見つかるか
5）標的遺伝子に異常が見つかればそのことがその癌の発生の原因と考えてよいか
6）RER陰性の癌はどうして発生するのか、また、RER陽性の癌とどこが異なるか
7）標的遺伝子に人工的に障害を与えれば癌はおこるのか
8）標的遺伝子の変異の起こりやすさと年齢、性、人種などの関係を示した研究について
9）今後どのように研究をすすめる予定か

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　筒井祥博
副査　教授　大関武彦　副査　講師　今野弘之