



Numerical centromere abnormalities in the papillary type of early gastric cancer, a further characterization of a subset of gastric cancer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宋, 剣萍 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1205

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 352号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏 名	宋 剣 萍		
論文題目	Numerical centromere abnormalities in the papillary type of early gastric cancer,a further characterization of a subset of gastric cancer (乳頭状型胃癌における染色体セントロメアの数的異常について、胃癌の一組織亜型の解析)		

博士(医学) 宋 剣 萍

論文題目

Numerical centromere abnormalities in the papillary type of early gastric cancer, a further characterization of a subset of gastric cancer

(乳頭状型胃癌における染色体セントロメアの数的異常について、胃癌の一組織亜型の解析)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

胃癌の乳頭状型(papillary type)は高分化型腺癌の一つとして扱われるが本邦の「胃癌取り扱い規約」では従来から他の分化型胃癌[管状型(tubular type)]とは別個に分類されていた。本亜型は比較的稀な、形態学的に特徴を持つ胃癌であり、そしてしばしば早期癌として発見される。実際に、本学の病理サンプルを通覧した結果、典型的かつ純粋な papillary type は非常に少なく、代わりにいわゆる管状乳頭状-管状混在型 papillotubular adenocarcinoma (pap-tub1) と分類される症例が多い。最近、我々は特にこの乳頭状増生という形態に焦点をあてたとき、このタイプの癌はマイクロサテライト不安定性(MSI)の頻度が高いという独特な分子病理学的特徴を有すると報告した(郭ら、Pathol Int 2001)。

一方、染色体数の異常で示される染色体不安定性(CIN)はヒトの癌のよく知られた現象であるが、我々は胃癌において広範囲な染色体 FISH(fluorescence in situ hybridization)解析により病気別のセントロメアの漸次的かつノンランダムな増加を報告した(北山ら、Clinical Cancer Research 2000)。しかし、その研究では組織型による染色体数の異常の差について詳細に触れることはできなかった。

今回の研究では、我々は胃癌腺の papillary structure という特異な組織学的特徴にあらためて焦点を当て、本研究室で開発したパラフィン包埋病理検体に対する新しい FISH 方法を用いて、中間期細胞のセントロメアの数的異常を調べ、このタイプの胃癌におけるセントロメア数的異常出現の独特な特徴、さらにセントロメア数の異常と MSI の関連性を明らかにすることを目的とした。

〔材料ならびに方法〕

胃癌切除例のホルマリン固定、パラフィン包埋検体を薄切し、HE 染色により識別した乳頭状形態をとる腫瘍組織部のみを用いた。前処理においてマイクロウェーブ(以下 MW)処理と酵素処理を施行し、さらにハイブリダイゼーション時にも MW 間欠照射を行う新しい FISH 法を用いた(北山ら、Lab invest 2000)。蛍光色素をラベルした動原体 α -satellite DNA プローブを用い切片上でハイブリダイゼーションを行った。各腫瘍部においてそれぞれのプローブについて、100個から200個までのほぼ完全な細胞核断面が認識できるような、重りのない腫瘍細胞核を数え、各核のシグナル数を記録した。解析には蛍光顕微鏡で観察した画像をさらに CCD カメラで取り込み、コンピュータ上で画像解析ソフト Cytovision を用いて複数の病理医によってシグナルの計数を行った。

さらに、我々は、調査した18染色体の数の異常を評価するために2つの指標を使った。一つは modal number(MN、各腫瘍細胞の細胞核においてもっとも優勢なシグナル数を示す染色体数)、もう一つは variant fraction(VF)、シグナル数がモード(autochromosome と X は 2、Y は 1)と異なる腫瘍細胞の割合(%)であった。そして、我々は20%を基準としてセットし、この基準を超えたセントロメア数異常細胞のパーセンテージを示した症例を染色体欠失(シグナル数<モードの細胞割合)あるいは染色体増加(シグナル数

>モードの細胞割合)例とした。

また、乳頭状腫瘍組織および対応する非腫瘍組織部の genomic DNA を microdissection によってパラフィン包埋組織から抽出した。マイクロサテライト不安定性(MSI)を検出するためにはNCIのCriteriaに従って5指標を選び(Bolandら、Cancer Research 1998)PCR,denatured electrophoresisそして渡銀染色(Schlegelら、Virchows Archiv 1995)で判定した。

症例はすべて早期胃癌で純粋な papillary type 3 例および papillotubular type 17例(pap-tub1)、比較として同じ病期の管状型(tubular type)の早期高分化癌(tub1-JCS、Japanese Classification System、胃癌取り扱い規約)が6例である。

[結果]

同じ早期でも papillary type の胃癌、papillotubular type の papillary 部分と早期の高分化管状腺癌(以下 tub1)における MSI と CIN の頻度には大きな差が見られた。早期の papillary type の胃癌の3例にはCINの程度少なく、すべて(100%)MSI-H(広範囲遺伝子不安定性)であった。早期の papillotubular type の papillary 部分胃癌の17症例中8例(47%)でCIN-H(高頻度染色体数異常)、MSI-L/MSS(低レベル遺伝子不安定性/遺伝子安定)であったのに対し、ほかの7例(41%)では逆にCINの程度が軽く、一部にMSI-Hが目立った。興味深いことにその中の2例(12%)は遺伝子数の異常および遺伝子不安定性は両方とも低頻度であった。一方、以上の結果に対し、6例すべての tub1 type の検体はMSI-LまたはMSSであり、同時にこれらのCINの異常は非常に高頻度であった。性染色体数についての異常はPapillary, Papillotubular, tub1 type における大きな違いが観察されなかった。Y染色体の増加がpapillotubularおよびtub1に2例ずつ存在したがpapillary type の3例には観察されなかった。

興味深いことに、染色体3番の数的異常がすべての純粋 papillary type において見られ、染色体1番、17番、20番がすべての tub1 type において見られた。後者の知見は北山らの報告(Clinical Cancer Research 2000)に合致した。

[考察ならびに結論]

Papillary および Papillotubular 型の胃癌は MSI 高頻度という特性に加え、染色体数の異常が少ないという分子生物学的特徴をもつことが明らかに示された。また、中間期核癌細胞の染色体異常とミスマッチ修復系の機能不全による MSI とが相補的な発癌機構であることが、大腸癌で主張されているが、胃癌の病理発生からも違う Pathway である可能性を示唆した。さらに、我々の観察は、胃の高分化癌中心乳頭状型を亜分類するための生物学論理的根拠を提供したことになる。つまり乳頭状型は大腸における HNPCC タイプの病態発生に対応する過程をとる胃癌の一亜型と考え得る。

論文審査の結果の要旨

DNA プローブを用いた染色体のコピー数の解析は、染色体レベルでの不安定性の指標として有用であり、多くの癌組織の解析に使われている。しかし、この手法はホルマリン固定のパラフィン包埋標本への応用では検出力の低下があり、これまで実用的ではなかった。最近、申請者を含む研究グループは、パラフィン切片にマイクロ波照射の処理を加えることにより、コピー数の良好なシグナルを得ることに成功した。そこで、申請者は、この方法を実際の胃がん標本に応用し、染色体レベルのDNA異常を調べた。胃癌のパラフィン包埋標本を用い、組織型との対比の中で染色体の不安定性を調べた。

〔方法〕

胃癌26症例から得た癌組織をホルマリン固定後、パラフィン包埋し、6-8 μ mの切片標本とした。それぞれの組織型は1995年の日本胃癌取り扱い規約に従って決めた。乳頭状(pap)型が3例、乳頭状管状混在(pap-tub)型が17例、管状(tub1)型が6例であった。標本内の典型的と思われる組織領域を解析に使用した。切片標本は、脱パラフィン後、マイクロ波照射で加熱しペプシン処理とホルムアミド処理を加えてDNAを変性させた。染色体1-4, 6-12, 15-18, 20, X, YのセントロメアDNAプローブ(市販)を用い、ハイブリダイゼーションを行った。この際、間欠的なマイクロ波照射によって、反応を促進させた。得られる蛍光シグナルを落射照明蛍光顕微鏡下で数え、組織内の染色体数の最も優勢な値、および、変異を示す細胞の割合という2つの指標を得た。プローブで染色したDNAのゲル泳動パターンから、マイクロサテライトの不安定性を調べた。

〔結果〕

正常部の上皮細胞と間質細胞からは明瞭な蛍光シグナルが得られ、80%以上の細胞で2個のシグナルを数えることができた。Pap型癌組織では全例で3番染色体数の増加があり、さらに一部に4, 12, 17番の軽度の増加があったが、他の染色体の異常はなく、それらの安定性がうかがわれた。PaP-tub型においては、共通して8番染色体に、また、症例ごとに異なる組み合わせで染色体全般に中等度の増加がみとめられた。Tub1型では、染色体数増加の変異の程度が最も著しかった。いずれの組織型においても常染色体数の減少はなかったが、pap型の一例でY染色体の減少があった。すべてのpap型でマイクロサテライトの高度の不安定性があったのに対し、pap-tub型では変異度の高いものと低いものがほぼ半々で、tub1型では変異度が低かった。

〔考察〕

Pap型の全例において3番染色体の増加が見られるのに対し、Pap-tub型の初期に選択的に8番染色体の増加が見られることは、それぞれの組織型の発癌機構を示唆するものである。形態的特徴の異なる3つの胃癌組織において、染色体数の変異度が高いとマイクロサテライト不安定性が低いという逆相関性があったことは、癌を引き起こす遺伝子の不安定化に2つの異なる経路があることを示すものである。

審査委員会は、染色体数の変異度とマイクロサテライト不安定性とを3つの組織型の胃癌において初めて系統的に調べたことを高く評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 乳頭状型腫瘍の形態学的特徴は何か
- 2) なぜセントロメアのプローブを使ったのか
- 3) 切片の厚みとカットオフ値の関係
- 4) マイクロ波処理がシグナル検出率を上げる理由
- 5) ペプシン処理の目的
- 6) プローブの蛍光シグナルが様々な形に見えるのはなぜか
- 7) 観察対象を早期癌に限った理由

- 8) マイクロサテライトの変異について、腫瘍組織の部位による差はあったか
- 9) Y 染色体の欠失はどういう意味を持つか
- 10) 染色体数異常とマイクロサテライト変異の逆相関性はなぜ起こるのか
- 11) 逆相関性とがんの増殖性とはどのように統一的に解釈できるか
- 12) 染色体数の変異と癌遺伝子との関係
- 13) ミスマッチ・リペアーの異常や染色体変異の原因は何か

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	寺 川 進	副査	梶 村 昌 良
	副査	小 出 幸 夫		