



癌細胞核DNA量とS期 (DNA合成期) 細胞標識率よりみた大腸癌の解析

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: 小里, 俊幸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1404

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	医博論第 127号	学位授与年月日	平成 4年 9月18日
氏 名	小 里 俊 幸		
論文題目	癌細胞核 DNA 量と S 期(DNA 合成期)細胞標識率よりみた大腸癌の解析		

医学博士 小里俊幸

論文題目

癌細胞核 DNA 量と S 期 (DNA 合成期) 細胞標識率よりみた大腸癌の解析

論文の内容の要旨

[はじめに]

従来より癌の生物学的特性や予後を反映する指標としては、主に臨床病理学的所見に頼ってきた。しかし近年、Atkin により癌細胞核内の DNA 量の異常が癌の進展や予後を反映する因子となる可能性が示された。DNA 量の異常とは細胞周期における G_0 、 G_1 期の細胞核 DNA 量が正常 2 倍体細胞核 DNA 量とは異なる場合を示し、一般的には異数倍数体 (aneuploid) と表現されている。

本研究では大腸癌を対象に、flowcytometry を用いて癌細胞 DNA 量を測定し、癌細胞核 DNA 量と癌の進展、予後との関連について検討するとともに、DNA 量の異常を伴う癌 (aneuploid) と伴わない癌 (diploid) で細胞動態学的に増殖態度が異なるかどうかについても検討を加えた。

[対象と方法]

(研究 1) DNA ploidy pattern と大腸癌の進展、予後

1. 対象 1978年から1983年までの6年間に浜松医科大学第2外科で原発巣切除を行い、予後の判明している大腸癌122例 (直腸癌55例、結腸癌67例) を対象とした。
2. 方法 切除材料のホルマリン固定パラフィンブロックを用いて、Hedley の方法を modify して行った。すなわちブロックを薄切 ($30\mu\text{m} \times 3$)、癌巣の部位をトリミングし、キシレンで脱パラ、エタノールで加水後ペプシン処理を行い単離細胞群を作製した。これに propidium iodide で DNA 染色を行い、flow-cytometry にて DNA 量を測定、DNA ヒストグラムより ploidy pattern を決定した。この解析により、正常 DNA 量の diploid 群と異常 DNA 量の aneuploid 群の間で、大腸癌の進展と予後についての比較検討を行った。

(研究 2) DNA ploidy pattern と S 期細胞標識率

1. 対象 1985年から1987年までの3年間に教室で切除を行った大腸癌29例 (直腸癌18例、結腸癌11例) を対象とした。
2. 方法 thymidine の analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) を、われわれの開発した ex-vivo organ perfusion 法にて摘出大腸を灌流し、癌組織に取り込ませた。標本をエタノール固定した後パラフィン包埋ブロックを作製した。ブロックから研究1の方法で単離細胞群を作製し、得られた細胞群を2つに分け、一方は研究1と同様に DNA ploidy pattern を求め、もう一方は免疫蛍光法にて BrdU を取り込んだ細胞を flowcytometry で固定し、S 期細胞標識率を求めた。

[結果]

(研究 1) DNA ploidy pattern と大腸癌の進展、予後

DNA ヒストグラムの解析結果より、大腸癌122例は diploid 78例 (64%)、aneuploid 44例 (36%) に分

類された。癌の進展につき臨床および病理組織学所見で比較したところ、リンパ節、肝転移において aneuploid は diploid より転移率が高い傾向を認めた。予後（5年生存率）について比較したところ、絶対治癒切除症例では ploidy pattern による差は認めなかったが、全症例および治癒切除症例では aneuploid は diploid に比べ有意に予後不良であった ($p < 0.05$)。

（研究2）DNA ploidy pattern と S 期細胞標識率

研究1の retrospective study により aneuploid を示す大腸癌は転移しやすい性質をもち、予後も不良であったため、その原因として aneuploid で細胞動態が亢進しているか否か prospective に調べた結果である。S 期細胞標識率は diploid (11例)、 $19.3 \pm 5.4\%$ 、aneuploid (18例)、 $20.8 \pm 5.1\%$ となり、ploidy pattern による細胞動態学的相違は認められなかった。

〔考察〕

研究1の retrospective study における大腸癌の進展と ploidy pattern の解析結果では、DNA 量の異常を伴う大腸癌は転移しやすい性質を持ち、その予後も不良であることから、DNA ploidy pattern は大腸癌の進展や予後を反映する因子と成りうることが示された。とくに大腸癌の臨床に際して治癒切除症例の予後判定に有用で、切除後の生存率の差に加え、治癒切除後遠隔転移をきたし再切除にて生存中の症例（3例）はいずれも aneuploid であったことより、aneuploid 症例では再発にさらなる注意が必要であることが示された。

また研究2の prospective study による細胞動態からみた検討では、注 ploidy pattern による増殖能の相違を認めなかったため、aneuploid 癌が生物学的悪性性質を現わす原因となる因子をさらに検索する必要があるものと考えている。

論文審査の結果の要旨

大腸癌の核 DNA 量を flow cytometry（以下 FCM）によって測定し、DNA 量と予後等の臨床病理学的事項との関連性が研究され始めてから未だ年月は浅く、その成果は十分とはいえない。また、大腸癌の DNA 量と細胞動態との関連を検索した報告は未だない。

ここに申請者は多数の大腸癌症例の DNA 量を FCM によって測定し、臨床病理学的事項との関連性について詳細な検討を行った。即ち、予後の判明している大腸癌切除例122例を検索の対象とした。そのパラフィンブロックから $30 \mu\text{m}$ に薄切し、癌の部分を取り出した後、キシレンによって脱パラフィン後ペプシンで消化し、単離細胞群を作製した。これを RNase で処理した後、propidium iodide で30分染色した。これらの細胞群10,000個以上の DNA 量を FCM で測定しヒストグラムを作製した。そして、 G_0/G_1 peak が単一のもを diploid とし、この peak が2本以上のものを aneuploid とした。大腸癌症例を diploid 群と aneuploid 群に二分し、予後その他種々の臨床病理学的事項との関連を検索した。

この結果、次の事が判明した。

1. 大腸癌122例は、diploid 78例64%、aneuploid 44例36%であった。
2. 年齢、男女比、腫瘍の大きさでは両者差を認めなかった。しかし、aneuploid は直腸癌の方が結腸癌よ

り多かった。

3. 病理的事項との関連では、組織型、分化度、脈管浸襲で差はなかった。深達度では腸壁内に限局する（pmまで）癌では1例を除いてすべて diploid であった。リンパ節転移は aneuploid に陽性率が高く、肝転移では aneuploid が有意に多かった。stage 分類では stage V で aneuploid が多い傾向にあった。
4. 予後との関連では、全症例の5年生存率は diploid 79.1%、aneuploid 58.9%と有意に diploid の予後が良好であった。治癒切除例でも同様に diploid の予後が有意に良好であった。

このように aneuploid は予後が不良であったので、その理由を探る目的で、申請者は癌の細胞動態をS期に焦点をあてて検索を行った。これには ex vivo organ perfusion を利用した。すなわち、29例において切除後直ちに主幹動脈から BrdU を溶解した perfluorochemical（酸素運搬体）で灌流した。BrdU に対する FITC 標識モノクローナル抗体を使用して免疫蛍光法により単離癌細胞を FCM で測定した。その結果、S期の FITC 標識率は、diploid（11例）19.3%、aneuploid（18例）20.8%と ploidy pattern によるS期の率に差はなく、細胞動態的相違を見いだし得なかった。

この発表に続いて次のような質疑、討論がなされた。

1. 早期癌の症例数をふやせば、有意の差で diploid が多く aneuploid が少ないことを明らかにしうるのでないか。
2. aneuploid は直腸癌が多いため予後より不良という結果を得たのではないか。
3. 同一症例の sampling による ploidy の違いの有無を確かめる必要があるのではないか。
4. 将来大腸癌の DNA 量の測定を routine 検査として使う必要はあるか。
5. 大腸癌の aneuploidy は遺伝子の分子レベルのどの変化と対応しているのか。

以上の質問に対する申請者の解答は概ね適切であり、研究内容も博士（医学）の学位論文としての水準に達しているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 喜 納 勇

副査 教授 金 子 榮 藏 副査 教授 中 野 稔

副査 助教授 中 村 達 副査 助教授 木 村 泰 三