

A very large villous adenoma with an adjacent cancer of the rectum : an informative case for testing the proposed molecular basis of colorectal tumorigenesis

メタデータ	言語: jpn 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: 金岡, 繁 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1524">http://hdl.handle.net/10271/1524</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	医博論第 247号	学位授与年月日	平成 9年 3月 7日
氏名	金岡 繁		
論文題目	<p>A very large villous adenoma with an adjacent cancer of the rectum : an informative case for testing the proposed molecular basis of colorectal tumorigenesis                      (直腸癌を合併した大きな絨毛腺腫の遺伝子解析：大腸癌における多段階発癌説を示唆する症例)</p>		

博士(医学) 金岡 繁

## 論文題目

A very large villous adenoma with an adjacent cancer of the rectum: an informative case for testing the proposed molecular basis of colorectal tumorigenesis

(直腸癌を合併した大きな絨毛腺腫の遺伝子解析：大腸癌における多段階発癌説を示唆する症例)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

近年、分子生物学の発展・普及により癌は遺伝子の病気であることが判明してきた。遺伝子異常が癌の発生・進展とともに多段階的に蓄積されてゆくという多段階発癌説は、Vogelstein や中村らの大腸癌の発生・進展のモデルとして現在広く認められている。これは腺腫-癌相関 (adenoma-carcinoma sequence) をもとに良性の腺腫から転移性の癌までの様々な段階の多数の腫瘍の遺伝子解析から得られたもので、adenomatous polyposis coli (APC) 遺伝子に異常がおきると正常粘膜から初期の腺腫となり、次に *K-ras* 遺伝子に異常がおきると大きさや異型度の増した後期の腺腫となりさらに *p53* 遺伝子に異常がおきると癌化し、その後複数の遺伝子異常が加わりより悪性度を増した癌となる。

大きな絨毛腺腫に合併した直腸癌は adenoma-carcinoma sequence のモデルと考えられ、多段階発癌説の直接の証明となる可能性があり、その遺伝子の解析は興味深く意義深いものと考えられ、同病変について、APC、*K-ras*、*p53* の3つの遺伝子解析を試みた。

[材料ならびに方法]

症例は遺伝性大腸癌の家族歴を有さない54歳、男性。直腸・S状結腸部に2型の大腸癌を合併する6.5×5.4cmの絨毛腫瘍がみられ、組織学的には中等度の異型を示す絨毛腺腫と中分化型腺癌であった。近接する正常組織1ヶ所と腺腫部、癌部各々3ヶ所よりDNAを抽出しAPC遺伝子についてはエクソン5からエクソン15の前半を20の領域に分け、*K-ras* 遺伝子についてはエクソン1を、*p53*遺伝子についてはエクソン5からエクソン8を polymerase chain reaction (PCR) にて増幅し、銀染色による single strand conformation polymorphism (SSCP) にて遺伝子変異をスクリーニングした。また SSCP にて異常とおもわれるバンドはゲルより切り出してDNAを溶出し再度PCRにて増幅し、<sup>35</sup>S-ダイレクトシーケンシングにて解析した。

[結 果]

腺腫と癌部においてAPCと*K-ras*にPCR-SSCPで各々共通の異常バンドが得られたが、*p53*では癌部にのみ異常バンドが得られた。引き続きおこなったダイレクトシーケンシングで今まで報告されていないAPCのコドン479にTTG (ロイシン) からTAG (ストップコドン) と*K-ras*のコドン12にGGT (グリシン) からGAT (アスパラギン酸) への点突然変異が腺腫と癌部にみられ、また癌部にのみ*p53*のコドン248にCGG (アルギニン) からTGG (トリプトファン) への点突然変異がみられた。

[考 察]

腺腫と癌部にAPCと*K-ras*遺伝子の各々共通の点突然変異がみられたことはこの大きな腫瘍が絨毛腺腫と癌が衝突してできたものではなく、癌は腺腫から連続して発生した可能性を強く示唆するものと

思われた。

そして *APC* と *K-ras* 遺伝子の異常が腺腫の形成に寄与し、*p53* 遺伝子の異常が発癌において決定的なでき事であるという Vogelstein らの大腸の多段階発癌説にのっとった腫瘍発生・進展をしていると思われた。

### [結 論]

腺腫と癌部に *APC* と *K-ras* 遺伝子の各々共通の点突然変異と癌部にのみ *p53* 遺伝子の点突然変異がみられたことから、adenoma-carcinoma sequence の多段階発癌説を強く示唆するものと思われた。

## 論文審査の結果の要旨

申請者が検証した仮説は大腸癌の発生・進展のモデルとして知られる以下のようなものである。つまり、adenomatous polyposis coli (*APC*) 遺伝子に異常がおきると正常粘膜から初期の腺腫となり、次に *K-ras* 遺伝子に異常がおきると大きさや異型度の増した後期の腺腫となりさらに *p53* 遺伝子に異常がおきると癌化し、その後複数の遺伝子異常が加わりより悪性度を増した癌になるというものである。この有名な説 (adenoma-carcinoma sequence) は、実は良性の腺腫から転移性の癌までの様々な段階の多数の症例の遺伝子解析を総合しそれぞれの変化の頻度をもとに類推して得られた説である。今日まで、腺腫と癌が同一個体の同一病変にみられる現象を詳しく遺伝子解析した研究はほとんどない。

[方法] 大腸癌の家族歴を有さない症例で直腸・S 状結腸部に 2 型の大腸癌を合併する 6.5×5.4cm の絨毛腫瘍 (組織学的には中等度の異型を示す絨毛腺腫と中分化型腺癌) において、近接する正常組織 1 ヶ所と腺腫部、癌部各々 3 ヶ所より DNA を抽出した。*APC* 遺伝子については全コーディング領域の 51% に渡るエクソン 5 から 15 の前半を約 200~450bp にあたる polymerase chain reaction (PCR) 産物が生ずるように 20 対のプライマーを設計し、*K-ras* 遺伝子についてはエクソン 1 を、*p53* 遺伝子についてはエクソン 5 から 8 を PCR にて増幅し非特異的余剰バンドのないことをアガロースゲルで確認後、クロロホルム抽出とマイクロスピニン S-400HR カラム (ファルマシア) で精製した。さらに通常の 138×130×0.75mm のポリアクリルアミド電気泳動用のガラス板を用いた泳動槽にチューブをつけ 4℃ と 21℃ のトリスグリシン緩衝液を循環させ、さらにプレート面を均一温度にして PCR 産物を泳動した。ゲルは 10~20% の濃度勾配ゲルを作製し、バンドの同定は銀染色にて行った。これによって上記の多数領域について、再現性・感度ともに優れた single strand conformation polymorphism (SSCP) 解析を非放射性かつ迅速に行い得るようになった。また SSCP にて異常とおもわれるバンドはゲルより切り出して DNA を溶出し上記と同様にクロロホルム抽出とマイクロスピニン S-400HR カラムにて精製した後、非対称 PCR (プライマーモル比 1:100) にて増幅した。再びアガロースゲルで確認後 UFC-THK カラム (ミリポア) で余剰のプライマーなどを精製後 Sequenase, Ver2.0 (ユナイテッドステーツバイオケミカル) を使用した <sup>35</sup>S-ダイレクトシーケンシングにて解析した。

[結果] 腺腫と癌部において *APC* と *K-ras* に PCR-SSCP で各々共通の異常バンドが得られたが、*p53* では癌部にのみ異常バンドが得られた。引き続きおこなったダイレクトシーケンシングで今までに報告されていない *APC* のコドン 479 に TTG (ロイシン) から TAG (ストップコドン) と *K-ras* のコドン 12 に GGT (グリシン) から GAT (アスパラギン酸) への点突然変異が腺腫と癌部に共通してみられ、ま

た癌部にのみ p53 のコドン 248 に CGG (アルギニン) から TGG (トリプトファン) への点突然変異がみられた。

[考察] 申請者はこれらの分子生物学的変化をもとに、この症例の大きな腫瘍が絨毛腺腫と癌が独立して発生し衝突してできたものではなく、癌が腺腫から同じ遺伝子の変化を保ちながら引き続いて生じた可能性を証明するものであると考えた。そして本個体で APC と K-ras 遺伝子の異常がともに腺腫の形成に寄与し、癌化においては p53 遺伝子の異常が決定的なでき事であったという確証を得た。ここに示したような具体的実証と手法は今後多くの症例に敷衍可能である。

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) いわゆる de novo 発癌モデルでは後半の APC の突然変異は必要なのか
- 2) APC の 7 塩基繰り返し配列 (heptad repeat) とは何か、またカテニンの具体的な結合部位はどこか
- 3) APC 蛋白は常に二量体 (dimer) で存在するのか
- 4) APC にドミナントネガティブ (dominant negative) の現象はあるのか
- 5) この腫瘍の腺腫はすべて絨毛腺腫なのか、また腺管腺腫の部位の遺伝子解析をおこなっているのか
- 6) APC の exon11 に、ここで見いだされた以外の突然変異は報告されているのか
- 7) 濃度勾配ゲルを作製したが、今回の結果を得るために必須であったか
- 8) SSCP に使った緩衝液はなぜトリスグリシン緩衝液なのか、また泳動条件は
- 9) SSCP で解析するとき再現性のよい明確な結果を迅速に得るための反応条件について
- 10) PCR 産物の精製に使うマイクロスピニングカラムの種類と規格について
- 11) 銀染色したバンドからの DNA の回収率とその増幅成功率は
- 12) K-ras のコドン 61 の解析はしたのか
- 13) 大腸に他の病変はあったのか
- 14) 同一腫瘍内の標本の採取部位により差はあったか
- 15) 同様に腺腫と癌が混在するような症例で突然変異の一致した症例の報告はあるのか

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 小 出 幸 夫      副査 講師 今 野 弘 之