



Chromosomal numerical abnormality profiles of gastrointestinal stromal tumors

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山下, 公裕 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/280

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 450号	学位授与年月日	平成18年 3月 9日
氏 名	山 下 公 裕		
論文題目	Chromosomal numerical abnormality profiles of gastrointestinal stromal tumors (消化管間葉系腫瘍における染色体の数的異常)		

博士(医学) 山下 公 裕

論文題目

Chromosomal numerical abnormality profiles of gastrointestinal stromal tumors

(消化管間葉系腫瘍における染色体の数的異常)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

消化管間葉系腫瘍(GISTs)は生物学的に様々なバリエーションを持つことが知られており、その悪性度は腫瘍の大きさや細胞分裂数などの臨床病理学的な規定が用いられているが、その予後因子に関しては未だ議論されている。本研究では臨床的に明らかな高悪性度のGISTsである転移、再発症例について無転移、無再発症例とをmicrowave-assisted fluorescent in situ hybridization (MW-assisted FISH)法を用いて、染色体数の異常(Chromosomal numerical abnormality, CNA)を比較し、CNAがGISTsの転移、再発の予測因子となり得るかどうか検討した。また、加えて、ヒトの悪性腫瘍で増幅する遺伝子や、これまでの研究で行われてきたComparative genomic hybridization (CGH)で変化のあった染色体の遺伝子を含む、細菌人工染色体(Bacterial artificial chromosome, BAC)、もしくはP1ファージ人工染色体(P1-phage derived bacterial artificial chromosome, PAC)のDNAプローブを用いたFISHを行い、検討をおこなった。

〔材料ならびに方法〕

GISTs転移、再発症例7例を含む12例23病変を対象とした。組織マイクロアレイ標本を作製し、まず市販のセントロメアプローブ(CEP)を用いたMW-assisted FISHを行いCNAを調べた。次に染色体腕上にある過去の研究のCGHの結果や、予備的なSingle nucleotide polymorphism (SNP) アレイの結果などを参考にして選択した24個の遺伝子配列を含む、細菌人工染色体BAC、もしくはPACから抽出されたDNAを蛍光標識したプローブ(Locus specific identifier, LSI)を用いてその数的異常についても検索した。LSIの計測はComputer softを用いて自動的に行いLSI/CEPのシグナルの比を求め遺伝子の染色体数に対する相対的な増幅あるいは欠損を検討し、それを転移、再発症例(n=7)と無転移、無再発症例(n=4)の原発巣で統計学的に比較した。市販のCEPがない場合にはセントロメア近傍のDNA配列を含むBACをCEPの代替とした。また、腫瘍の大きさや細胞分裂数を用いた臨床病理学的な危険度や、Ki-67免疫染色での陽性率(Ki-67 labeling index)でも同様に比較した。

〔結果〕

GISTsの原発巣でCNAを比較すると再発、転移症例でのみ染色体の数的異常が認められ、無転移、無再発症例では認められなかった。また、数的異常は染色体の欠損であり増幅は17番染色体がGISTs肝転移症例1例のみに認められるのみであった。興味深いことにCNAは原発巣と転移、再発巣とで相似性が認められた。BACもしくはPACを用いた染色体腕上の特定遺伝子のFISHでの検索では、20番染色体長腕(20q)上にあるAurora kinase遺伝子のLSIのプローブを用いた検討で、肝転移症例4例中3例のみに相対的な増幅が認められた。一方、14番染色体長腕(14q)上の遺伝子は高頻度で欠失が起こっており、特に14q24.3の位置で全体の78.3%で欠失が認められた。その頻度は再発、転移症例の方がやや高いようにみえたが統計

学的有意差は認められなかった。臨床病理学的な検討では、腫瘍径、細胞分裂数、Ki-67 labeling indexにおいて両群間に差異はなかった。

〔考察〕

GISTsの予後を規定する因子を決定するのに従来の病理学的な検索だけでは、この研究のように転移、再発を予測し得ない可能性がある。そこで分子生物学的にKIT遺伝子の変異やCGH等による検索が行われてきたが、まだ確実なものは見つかっていない。本研究では以前から言われてきた様に14qの欠失は悪性度に関わらずGISTsに高頻度で認められ、GISTsの発生に大きく関与していると考えられた。また、20qの増幅が肝転移症例のみに認められたことよりこの部位にある遺伝子の増幅がGISTの血行性転移の機序に何らかの関わりを持つ可能性が示唆された。最近ではゲノムワイドにDNAの変化を検索するCGHやSNPアレイの解析が盛んに行われているが、MW-assisted FISHは遺伝子の局在変化をin situで検索でき、これらの検査の付加的手段として有用であると考えられる。

〔結論〕

20qの遺伝子の増幅がGISTsの血行性転移の予測因子となり得る可能性がある。MW-assisted FISHを用いたCNAの検索はGIST転移、再発の予測に対し有用な付加的手段となりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

腫瘍は、様々な病態を持つが、特に悪性度の高い消化管間葉系腫瘍(GIST)ではその組織型の変異の幅が大きく、予後の判定には困難を伴うものが多い。腫瘍の大きさと細胞分裂像の数などの形態に基づく病理学的検査からは予後の判断が難しい。このような状況で申請者は、細菌やP1ファージを用いて作った人工的染色体のDNAを用いたfluorescence in situ hybridization(FISH)を応用して、腫瘍での変異の様子を網羅的に調べ、これを整理することを試みた。特に、悪性度が高く発生頻度は低いGISTについては、これまでのところ、予後判定に有用な研究データが少なかった。そこで申請者は、ヒトGIST標本を集め、遺伝子の代表的な変異を調べて、DNAの変異状態に基づいて予後判定ができるようにするための、基礎データを作ることを目指した。

〔方法〕

まず、GISTの病変を対象とした組織マイクロアレイ標本を作った。この標本において、マイクロウェーブ照射法を組み合わせたFISH解析をおこなった。セントロメアプローブを用いて染色体数の異常(CNA)を調べた。細菌やウイルスを用いて人工染色体を作り、特定遺伝子配列を含むDNAを取り出して蛍光標識し、これをプローブ(locus specific identifier: LSI)として、それらの遺伝子の数的異常について検索した。CNAとLSIシグナル数の比をとり、染色体数に対する遺伝子数の相対的な増幅と欠失を数値化した。この結果について、転移の有無と再発の有無に対して相関を調べ、また、形態学的な悪性度との相関を調べた。

〔結果〕

GISTでは、転移・再発症例でのみ、CNAの正常からの逸脱が認められた。その内容は染色体の欠失で

あったが、肝転移症例の1例では17番染色体での増幅があった。原発巣と転移・再発巣を比較すると、変異のパターンは類似していた。人工染色体由来DNAによって20番染色体長腕(20q)上のAurora kinase遺伝子の解析をしたところ、肝転移症例の4例中の3例に増幅が認められた。また、同様の解析で14番染色体長腕(14q)上に高頻度の遺伝子欠失が認められた。欠失率の高い部位では、調べた標本の78.3%で欠失があった。この頻度は転移・再発症例で特に高いということではなかった。

これらのことから申請者は、20qでの増幅がGISTの肝への血行性転移と関わるものであること、また、14qでの欠失は、悪性度と相関するというより、GISTの発生原因に関係するものであることを考察した。審査委員会は、比較的まれな症例であるGISTの標本を集め、GISTの予後を判断するのに有用な根拠のひとつを明らかにしたことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) c-kitの発現細胞とその役割について
- 2) 腸管のリズム運動について
- 3) 有糸分裂をどのように組織像の中に見つけるか
- 4) 観察定量用の切片厚を6 μ mに決めた理由
- 5) バクテリア内での増幅でFISHプローブを作る方法について
- 6) マイクロウェーブの一般効果について
- 7) 自動画像処理を用いた方法で算出する統計値のずれについて
- 8) Debiec-Rychterらが得た20番染色体の解析結果との差について
- 9) 20qの変異と病状の間の相関の判定について
- 10) 正常部組織に遺伝子異常はみとめられるか
- 11) 呼吸器系組織におけるGIST(管状癌)はあるか

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	宮 本	愛	副査	梶 村 昌 良