

学 位 論 文 題 名

Flow cytometry による精巣胚細胞性腫瘍
の核 DNA ploidy の研究

学位論文内容の要旨

I 研究目的

精巣腫瘍は胚細胞性腫瘍として、組織学的多様性や発生過程での形態的分化能、年齢と出現する組織型との関係など他の固形腫瘍とは異なる様々な特徴を有するが、その生物学的機序や発生病因論についてはいまだ未解明の点が多い。一方高い抗癌剤感受性を示すことから近年治療成績が飛躍的に向上し、進行癌といえども治癒可能な固形腫瘍のモデルとして、臨床的にも注目されている。本研究は flow cytometry を用いて精巣腫瘍の核 DNA ploidy 解析を行い、核 DNA 量の面から精巣腫瘍の生物学的性質を評価し、その組織発生上の機序について考察することを目的とした。

II 対象および方法

対象：1969年から1989年までに北海道大学医学部附属病院で精巣摘除術を行った精巣腫瘍76例を対象とし、組織分類は成人型59例中セミノーマ：35例（平均36.5歳；定型的セミノーマ28例、退形成性セミノーマ7例）、非セミノーマ（nonseminomatous germ cell tumor）：24例（平均30.5歳）であり、小児型は17例（平均1.6歳）中ヨークサック腫瘍：9例、奇形腫：8例であった。標準組織として前立腺癌患者の正常精巣5例（64歳～77歳）、および6歳児の正常精巣1例を用いた。

検体の選択：ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックとして保存されていた腫瘍組織より HE 染色標本を作成、鏡検により壊死組織を除いた腫瘍部分を確認しランダムに1症例につき1～4検体、計190検体（1症例平均2.5検体）を選択した。なお成人の複合組織型のうち4例で組織成分による検体の分離が可能で、同一腫瘍中のセミノーマ部分とそれ以外の部分の核 DNA 量の相違を比較した。

核懸濁液の作成：選択した組織標本を50 μ で薄切後1～2枚の組織を手動的に乱切し、Hedley

の方法に準じキシレンにて脱パラフィンし100%, 80%, 60%エタノールで漸次再水和, 0.5%ペプシンで37℃, 60分処理後 triton X - 100で処理し裸核化を行った。ついで Vindel ϕ v の方法に準じ RNase ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) 処理後, propidium iodide ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$) にて核 DNA 染色 (4℃, 30分) を行った。

DNA ploidy 解析: flow cytometer は Coulter 社 EPICS-C を用い, 488nm Ar イオンレーザーにて励起された赤色蛍光量を相対的核 DNA 量を反映するものとして DNA ヒストグラム上に表示した。測定条件は核流速200個/秒, 1 検体あたり15000~20000個の核を測定し DNA diploid standard は正常精巣組織の 2 C 細胞の G_0/G_1 ピークを用い, 得られた DNA ヒストグラムは DNA index (DI) で評価した。DI は腫瘍細胞の G_0/G_1 ピークのチャンネル数を正常細胞の G_0/G_1 ピークのチャンネル数で除して求めた。

DNA ploidy の判定: DNA ヒストグラム上の 1 C, 2 C, 4 C 以外のチャンネルに G_0/G_1 ピークが存在するものを DNA aneuploid とし, 2 C に単一の G_0/G_1 ピークを持つもの, あるいは 1 C, 2 C, 4 C にのみピークをもつものを DNA diploid とした。小児型では 2 C に単一の G_0/G_1 ピークを示す場合 DNA diploid, 全細胞数に対し 4 C 分画が15%を超えるものは DNA tetraploid とした。なお同一腫瘍で DI 値の差が0.2以上異なるピークが出現した場合, または同一検体内に複数の DNA aneuploid ピークが出現した場合を DNA heterogeneity ありとした。統計的有意差判定は Wilcoxon の順位和検定を用いた。

III 結 果

DNA ヒストグラムは成人の奇形腫の 1 例を除く 75 例 (99%) において変異係数 (coefficient of variation; CV) が 3~10% の範囲で解析が可能であった。

1) DNA aneuploid の頻度: セミノーマでは 35 例全例に, 非セミノーマは解析可能であった 23 例中 22 例 (96%) に, 成人型全体では 58 例中 57 例 (98%) に DNA aneuploid を認めた。これに対し小児ではヨークサック腫瘍の 3 例が DNA tetraploid であった他は DNA dioloid であった。すなわち小児型は全例 “DNA euploid” を示し, 成人例に多く見られた triploid 周辺の DNA aneuploid は認められなかった。

2) 成人型の組織分類と DI: セミノーマのなかで増殖能がより高いと考えられる退形成性セミノーマは定型的セミノーマに比べ小さい DI を示す傾向があった ($P < 0.06$)。さらにセミノーマに比べ生物学的悪性度が高いと考えられる非セミノーマが有意に小さい DI を示した ($p < 0.01$)。

3) DNA heterogeneity について：組織学的に heterogeneous な複合組織型は解析できた非セミノーマ23例中19例(83%)あったが、DNA heterogeneity はそのうち4例(17%)に認められたのみであった。セミノーマと非セミノーマが混在する混合型で組織成分ごとの比較が可能であった4例では、セミノーマ部分と他の組織型部分の間で異なる DNA ploidy を示したものは4例中1例(25%)のみであった。

IV 考 察

一般に悪性腫瘍では当初は DNA dioloid から発癌し、生物学的進展とともに DNA aneuploid の頻度が増加すると考えられており、悪性度が高まると DI 値は増大すると報告されている腫瘍が多い。一方精巣腫瘍の核 DNA ploidy は、成人型ではほぼ全例が DNA aneuploid を示し DNA diploid の腫瘍は稀であるとともに、組織学的に悪性度が高いものほど DI 値が小さいこと、小児精巣腫瘍では同じ組織型でも核 DNA 量パターンは成人型とは大きな相違があることなど DNA ploidy 上の特徴が他の固形腫瘍とは大きく異なるものであった。精巣腫瘍の発生はセミノーマは胚細胞が直接癌化し、非セミノーマの各組織型は胎児性癌から分化発生すると考えられた従来の説に対し、近年その発生母地として精巣の carcinoma in situ (CIS) が注目され、精巣腫瘍の各組織型は多分化能を有する CIS 細胞より一元的に発生するとの考え方が一般的となっており、さらに最近 Oosterhuis らは DNA tetraploid 付近の CIS 細胞から核 DNA 量が減少することによりセミノーマをへて非セミノーマが発生するとしている。染色体の4倍体化とそれに引き続く染色体の欠失または構造異常の形成による核 DNA の減少により癌の genetic evolution がもたらされるとする Shackney らのモデルに従えば、今回の結果は成人の精巣腫瘍は DNA tetraploid の胚細胞から腫瘍化し、生物学的悪性度が高くなるにつれ核 DNA 量が少なくなるものと解釈することが可能であろう。また異なる組織型が混在しても、核 DNA 量上は均一な場合が多いことは複合組織型でもその組織発生は一元的に説明できる最近の学説をより支持するものである。さらにこれは臨床的には精巣腫瘍が高い化学療法感受性示すことを説明する傍証とも考えられるとともに、セミノーマ成分と非セミノーマ成分が混在する混合型腫瘍ではセミノーマ部分が形態的にはセミノーマでもその発生や性格はむしろ非セミノーマに近いものであり、混合型は臨床的には非セミノーマとして取り扱うというわれわれの日常の認識を支持するものである。一方高率に CIS を随伴する成人型に対し、CIS を伴わない小児型は DNA ploidy のパターンも大きな相違があり、成人型が減数分裂期の胚細胞から CIS を経て発生するのに対し、小児型は減数分裂開始前の原始生殖細胞由来の腫瘍であるという発生起源の違

いを反映したものと考えられる。

V 結 語

Flow cytometry を用いて精巣胚細胞性腫瘍の核 DNA ploidy 解析を行い、その組織発生上の特徴について考察した。CIS を経て発生するとされる成人型は DNA tetraploid の胚細胞から腫瘍化し生物学的悪性度が高くなるほど核 DNA 量は減少すると考えられる一方、小児型は組織学的に同じでもその発生起源は成人型とは異なることが推定された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 葛 巻 暹

精巣腫瘍は胚細胞性腫瘍として組織学的多様性や発生過程での形態的分化能、年齢分布など他の固形腫瘍とは異なる特徴を有するが、その生物学的機序や発生病因論についてはいまだ未解明の点が多い。一方臨床的には進行癌といえども治癒可能な固形腫瘍のモデルとして最近注目されている。本研究は Flow cytometry を用いた核 DNA ploidy 解析から精巣腫瘍の生物学的性質とその組織発生上の機序について考察することを目的とした。

対象は成人精巣腫瘍59例：seminoma35例，nonseminomatous germ cell tumor（NS-GCT）24例，および小児精巣腫瘍17例：yolk sac tumor（YST）9例，teratoma：8例，計76例で、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から鏡検により壊死組織を除いた腫瘍部分を確認しランダムに1症例につき1～4検体，計190検体（1症例平均2.5検体）を選択した。なお成人の複合組織型の4例で同一腫瘍中のseminoma部分とそれ以外の部分の核DNA量を比較検討した。

選択した組織標本を50 μ で薄切後Hedley法に準じxyleneで脱パラフィンしethanolで再水和，pepsinとtritonX-100で裸核化後Vindel ϕ v法に準じRNase処理後propidium iodideで核DNA染色した。FCMはCoulter社EPICS-Cを用い，得られたDNAヒストグラムはDNA index（DI）で評価した。DIは腫瘍細胞のG₀/G₁ピークのchannel数を正常細胞の

G_0/G_1 ピークの channel 数で除して求めた。DNA ploidy の判定は 1 C, 2 C, 4 C 以外に G_0/G_1 ピークが存在するものを DNA aneuploid, 2 C に単一の G_0/G_1 ピークを持つものを DNA diploid とし、小児型で 4 C 分画が全細胞の 15% を超えるものは DNA tetraploid とした。また同一腫瘍で DI の差が 0.2 以上異なるピークが存在する場合を DNA heterogeneity ありとし、統計的有意差判定は Wilcoxon 順位和検定を用いた。

DNA ヒストグラムは成人型 1 例を除く 75 例 (99%) において変異係数 3~10% で解析可能であった。1) seminoma は 35 例全例、NSGCT は解析できた 23 例中 22 例 (96%), 成人型全体で 58 例中 57 例 (98%) に DNA aneuploid を認めた。一方小児型は YST の 3 例が DNA tetraploid の他 DNA diploid で全例 “DNA euploid” を示し、成人型に多い triploid 周辺の DNA aneuploid は認められなかった。2) seminoma のなかで増殖能が高い anaplastic seminoma は typical seminoma に比べ小さい DI を示す傾向にあった ($p < 0.06$)。さらに seminoma に比べ生物学的悪性度が高い NSGCT が有意に小さい DI を示した ($P < 0.01$)。3) Indiana 分類による臨床進行度では予後不良な advanced extent は予後良好な minimum / moderate extent に比べ有意に小さな DI を示した ($p < 0.05$) 4) 組織学的に heterogeneous な複合組織型は解析できた NSGCT 23 例中 19 例 (83%) あったが、DNA heterogeneity はそのうち 4 例 (17%) にのみ認められた。同一腫瘍で seminoma 部分と NSGCT 部分の比較が可能であった 4 例では、異なる組織型で異なる DNA ploidy を示したものは 4 例中 1 例 (25%) のみであった。

一般に悪性腫瘍では DNA diploid から progression により DNA aneuploid の頻度が増加し、悪性度が高まると DI 値は増大すると考えられている。精巣腫瘍では成人型ではほぼ全例が DNA aneuploid を示し DNA diploid の腫瘍は稀であるとともに、組織学的・臨床的に悪性度が高いものほど DI 値が小さいこと、小児型は核 DNA 量パターンが成人型とは大きな相違があることなど他の固形腫瘍とは異なる DNA ploidy 上の特徴が示された。精巣腫瘍の発生は、セミノーマは胚細胞が直接癌化し、非セミノーマの各組織型は胎児性癌から分化発生すると考えられた従来の説に対し、近年その発生母地として精巣の carcinoma in situ (CIS) が注目され、精巣腫瘍の各組織型は CIS 細胞より一元的に発生するとの考え方が一般的である。さらに最近 Oosterhuis らは DNA tetraploid の CIS から核 DNA 量の減少により seminoma をへて NSGCT が発生するとしており、染色体の tetraploidization とそれに引き続く染色体の loss または structural abnormality の形成による核 DNA 量の減少により癌の genetic evolution がもたらされるとする Shackney らのモデルに従えば、今回の結果は成人の精巣腫瘍は DNA

tetraploid の胚細胞から腫瘍化し、生物学的または臨床的悪性度が高くなるにつれ核 DNA 量が少なくなるものと解釈することが可能であろう。また核 DNA 量上 homogeneous の場合が多いことは複合組織型でもその発生は一元的とする最近の学説を支持するとともに、臨床的には精巣腫瘍の高い化学療法感受性を説明する傍証であり、混合型の seminoma 部分は形態的に seminoma でもその性格はむしろ NSGCT に近く、混合型は臨床的には NSGCT として取り扱うという我々の日常の認識を支持するものである。一方 CIS を伴わない小児型は DNA ploidy も大きな相違があり、成人型が減数分裂期の胚細胞から CIS を経て発生するのに対し小児型は減数分裂開始前の原始生殖細胞由来であるという発生源の違いが示唆された。本研究は精巣腫瘍に対して細胞解析の手法を用いて行われた数少ない研究の 1 つで、その生物学的特性、発生等について新たな知見を与えてくれたもので学位の授与に値すると判定された。