

学位論文題名

Flow Cytometry による膀胱癌の核 DNA ploidy の研究

学位論文内容の要旨

研究目的

膀胱は管腔臓器であるため、膀胱癌の進展は平面的な広がりとは異なり、深部へ浸潤するという垂直方向の二通りの進展過程を示し、また、同時性・異時性に多発、再発したり、病理組織学的にも一つの腫瘍中にいくつかの異型度が混在するなど他の固形腫瘍とは異なる様々な特徴を有するが、その生物学的性質についてはいまだ未解明の点が多い。そこで本研究は、flow cytometry(FCM)を用いて膀胱癌の核DNAプロイデ解析を行い、膀胱癌の持つ、生物学的性質を明らかにするため、核DNA量と膀胱癌の病理組織学的因子との関係、リンパ節転移を有する癌(原発巣)組織とリンパ節(転移巣)組織における核DNA量との関係、さらに膀胱癌の核DNA量における多様性(DNA heterogeneity)との関係を見出すことを目的とした。

対象及び方法

対象：1978年1月から1988年12月までに北海道大学医学部附属病院泌尿器科にて根治的膀胱全摘術を施行された症例中、評価可能であった63例を対象とした。63例の膀胱全摘術時の年齢は40-78歳、平均61.8歳、男女比は3.85:1で、病理組織型の内訳は、移行上皮癌54例、移行上皮癌を主体とする混在癌が9例であった。また、全摘術前の術前治療は放射線治療群が43例、化学療法群7例、無治療群13例であった。検体の選択：標本採取部位は原則として、最も高い異型度が最も深い深達度の箇所を選択した。リンパ節は、標本上、腫瘍組織がリンパ節全体のほぼ1/2以上を占めるリンパ節を対象とした。全摘標本は263検体、全摘術前の内視鏡手術(TUR)による標本が入手可能だった44症例のTUR標本132検体と骨盤内リンパ節転移が認められた16例のリンパ節標本47検体、また、pT3a(膀胱筋層深部への浸潤癌)以上で、粘膜側と漿膜側におおよそ2分割しても十分に評価検体が存在すると確認された18例、36検体について、粘膜側、漿膜側の双方を解析し、総計478検体のパラフィン包埋組織を選択し、以下の方法による核DNAプロイデ解析に用いた。核懸濁液の作成：Hedleyらの方法に準じ、1-2枚の薄切標本をキシレンにて脱パラフィンし、エタノールで親水化し、0.5%ペプシン液で37℃、60分間反応させ、Vindel ϕ vらの方法に準じRNase処理後、propidium iodideにて核DNA染色(4℃,30分)を行った。DNAプロイデ解析：FCMはCoulter社製EPICS-Cを用い、平均20,000個の核DNA量をヒストグラム上に表示し、得られたDNAヒストグラムを附属のPARA-I programを用いて各細胞周期上の細胞分画の割合等を解析し、DNA index(DI)にて評価した。DNAプロイデの判定：DNA diploidは、DIが0.8-1.2で、G2+Mピークを持つものとした。DNA aneuploidはDIが0.8以下或いは1.2以上の場合、または、4C細胞の割合が10%以

上である場合とした。同一腫瘍でDIの差が0.2以上異なる場合、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量の多様性有りとした。統計学的有意差判定は χ^2 検定を用いた。

結 果

478検体において解析可能であり、その変異計数(coefficient of variation: CV)は2.8%であった。

1) DNA aneuploidの頻度: DNA aneuploidは腫瘍が存在した52例中24例(46%)に認められた。TUR症例においては、異型度が上昇するにつれてDNA aneuploidの出現率が有意に増加していたが($P<0.01$)、全摘標本においては、G2以上及びpT1以上の症例にのみDNA aneuploidを認めたが、有意差はなかった。壁内侵襲(ly,v)では、陽性例で有意にDNA aneuploidが多かった($P<0.01, P<0.02$)。

2) 原発巣とリンパ節転移巣: リンパ節転移巣のcell cloneとはほぼ同じDI値を示すcell cloneが原発巣にも存在し、原発巣由来のcell cloneが転移していた。また、DNAプロイデ別にリンパ節転移率を比較すると、aneuploid腫瘍(11/24, 46%)は、diploid腫瘍(5/39, 13%)に比し、有意に高率にリンパ節に転移していた($P<0.01$)。転移のパターンは、原発巣→リンパ節の順にD→D(5例)、D+A→D(4例)、A→A(5例)、A→D(2例) (D: DNA diploid, A: DNA aneuploid)の4種類存在した。

3) DNA量の多様性について: 膀胱癌は水平方向と垂直方向へと広がりを見せるが、水平方向のDNA量の多様性の頻度は18例(35%)であった。また、腫瘍の粘膜側と漿膜側の2分割での検討から(18例36検体)、上下両側とも同じプロイデを示したものの28検体(16検体:D, 12検体:A)、上下別の場合が8検体有り、従って、垂直方向のDNA量の多様性の頻度は18例中6例(33%)であった。

4) DNAプロイデと腫瘍浸潤について: 腫瘍の粘膜側と漿膜側の2分割での検討から、必ずしも、深部にDNA aneuploidが存在しないことから、DNAプロイデと腫瘍浸潤との間に、明確な関係は認められなかった。

考 察

膀胱癌のDNA aneuploidの出現頻度は、異型度の上昇とともに増加していたが、TUR群で高率で、放射線治療や化学療法の前治療が多い全摘術群でDNA aneuploidの出現率が低い点は、術前治療が癌細胞の核DNAに変化を及ぼしている可能性があると考えられた。

原発巣と転移巣との比較から、転移は原発巣中の一つのcell cloneが転移を起こすことが認められ、また、DNA aneuploid腫瘍が有意に効率に転移を起こしているものの、DNA diploid cell cloneも同様に転移を起こしていた事実が判明した。予後との関係では、リンパ節転移を有する膀胱癌においては、原発巣及び転移巣のDNAプロイデに関係なく、予後不良であり、原発巣及び転移巣のDNAプロイデは、予後規定因子ではないと考えられた。

また、膀胱癌は多彩な特徴を有するが、進展しながら、DNA量を増し、DNA aneuploidの出現頻度は増加するものの、膀胱癌におけるDNA量の多様性の出現頻度は35%と低率であった。この事実は、多発性腫瘍でも遺伝子としての起源は同じで、mono-clonalであるという最近の癌遺伝子の研究を裏付ける傍証であり、膀胱癌の多中心性発生は、元は一つの癌細胞から発生し、膀胱腔内に播種した腫瘍進展の結果と考えられた。

膀胱癌の進展は、水平方向のみでなく、垂直方向へも進展し、粘膜に発生した癌が、進展していくにつれ、DNA aneuploidに変化浸潤していくと考えると、腫瘍の深部ほど悪性度が高いと考えられているDNA aneuploidが認められる訳であるが、結果は逆の関係も認められたため、浸潤という行為とDNAプロイディとの間には明確な関係は認められなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

Flow Cytometry による膀胱癌の核 DNA ploidy の研究

膀胱は管腔臓器であるため、膀胱癌の進展は平面的な広がりとは異なり、深部へ浸潤するという垂直方向の二通りの進展過程を示し、また、同時性・異時性に多発、再発したり、病理組織学的にも一つの腫瘍中にいくつかの異型度が混在するなど他の固形腫瘍とは異なる様々な特徴を有するが、その生物学的性質についてはいまだ未解明の点が多い。そこで本研究は、flow cytometry (FCM)を用いて膀胱癌の核DNAプロイディ解析を行い、膀胱癌の持つ、生物学的性質を明らかにするため、核DNA量と膀胱癌の病理組織学的因子との関係、リンパ節転移を有する癌（原発巣）組織とリンパ節（転移巣）組織における核DNA量の関係、さらに膀胱癌の核DNA量における多様性(DNA heterogeneity)との関係を見出すことを目的とした。

対象は、1978年1月から1988年12月までに北大病院泌尿器科にて根治的膀胱全摘術を施行された症例中、評価可能であった63例を対象とした。検体の標本採取部位は原則として、最も高い異型度が最も深い深達度の箇所を選択した。全摘標本は263検体、全摘術前の内視鏡手術(TUR)による標本が入手可能だった44症例のTUR標本132検体と骨盤内リンパ節転移が認められた16例のリンパ節標本47検体、また、pT3a（膀胱筋層深部への浸潤癌）以上で、粘膜側と漿膜側におおよそ2分割しても十分に評価検体が存在すると確認された18例、36検体について、粘膜側、漿膜側の双方を解析し、総計478検体のパラフィン包埋組織を選択した。Hedleyらの方法やVindel ϕ vらの方法に準じ、核懸濁液を作成した。DNA ploidy解析は、Coulter社製EPICS-Cを用い、平均20,000個の核DNA量をヒストグラム上に表示し、得られたDNAヒストグラムを附属のPARA-I programを用いて各細胞周期上の細胞分画の割合等を解析し、DNA index(DI)にて評価した。DNA ploidyの判定は、DNA diploidは、DIが0.8~1.2で、G2+Mピークを持つものとした。DNA aneuploidはDIが0.8以下或いは1.2以上の場合、または、4C細胞の割合が10%以上である場合とした。同一腫瘍でDIの差が0.2以上異なる場合、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量の多様性有りとした。統計学的有意差判定は χ^2 検定を用いた。

478検体において解析可能であり、その変異計数(coefficient of variation: CV)は2~8%であった。DNA aneuploidは腫瘍が存在した52例中24例(46%)に認められた。TUR症例においては、異型度が上昇するにつれてDNA aneuploidの出現率が有意に増加していたが($P<0.01$)、全摘標本においては、G2以上及びpT1以上の症例にのみDNA aneuploidを認めたが、有意差はなかった。

壁内侵襲(ly, v)では、陽性例で有意にDNA aneuploidが多かった($P<0.01$)。リンパ節転移巣のcell cloneとほぼ同じDI値を示すcell cloneが原発巣にも存在し、原発巣由来のcell

cloneが転移していた。また、aneuploid腫瘍(11/24,46%)は、diploid腫瘍(5/39,13%)に比し、有意に高率にリンパ節に転移していた($P < 0.01$)。転移のパターンは、原発巣→リンパ節の順にD→D(5例)、D+A→D(4例)、A→A(5例)、A→D(2例) (D:DNA diploid,A:DNA aneuploid)の4種類存在した。膀胱癌は水平方向と垂直方向へと広がるが、水平方向のDNA量の多様性の頻度は18例(35%)であった。また、垂直方向のDNA量の多様性の頻度は18例中6例(33%)であった。腫瘍の粘膜側と漿膜側の2分割での検討から、必ずしも、深部にDNA aneuploidが存在しなかった。

以上の結果より、①膀胱癌のDNA aneuploidの出現頻度は、異型度の上昇とともに有意に増加し、深達度間に有意な差はなく、壁内侵襲で、有意に多かった。②リンパ節転移は原発巣中の一つのcell cloneが転移を起こすことが示唆され、また、DNA aneuploid腫瘍が有意に効率に転移を起こしていた。③膀胱癌におけるDNA量の多様性の出現頻度は35%であった。この事実は、多発性腫瘍でも遺伝子としての起源は同じで、mono-clonalであるという最近の膀胱癌の研究を裏付ける傍証であり、膀胱癌の多中心性発生は、元は一つの癌細胞から発生し、膀胱腔内に播種した腫瘍進展の結果と考えられた。④膀胱癌の進展は、水平方向のみでなく、垂直方向へも進展し、粘膜に発生した癌が、進展していくにつれ、DNA aneuploidに変化浸潤していくと考えると、腫瘍の深部ほど悪性度が高いと考えられているDNA aneuploidが認められる訳であるが、結果は逆の関係も認められたため、浸潤という行為とDNAプロイディとの間には明確な関係は認められなかった。

公開発表は約20名の聴衆の前で行われ、葛巻教授から、①全摘標本とTUR標本との比較から、術前治療の影響はどうか、②リンパ節転移のパターンから、検出されていないDNA ploidy peakがあるのではないかと、③DNA ploidyと予後との関係はどうか、④考察で引用した膀胱癌遺伝子はどの癌遺伝子についてなのか、細川教授から、①DNA ploidyの混在型は、DNA aneuploid腫瘍と考えるのか、②パラフィン標本と新鮮標本との比較検討はどうだったか、③臨床的に、FCMの意義をどうとらえるか、小柳教授から、①DNA ploidyと深達度間に有意な差が認められなかったのはどうしてか、②腫瘍浸潤とDNA ploidyの関係は、他の管腔腫瘍で検討されているかについて質問があった。また、泌尿器科篠原助手から、尿路上皮で多中心性発生を考えた場合、腫瘍の播種で説明可能かどうかについて質問があり、発表者はおおむね妥当な回答を行った。

審査員一同は、膀胱癌の核DNA ploidy解析から、膀胱癌の生物学的性質を解明し、また、臨床への応用の可能性を示した成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。