

博士（医学） 小山 奈緒子

学位論文題名

Aneuploidy of sex chromosomes in basal cell carcinoma: Its clonality and involvement in the development of carcinogenesis

(基底細胞癌における性染色体数異常：その
clonality の解析および癌化との関連)

学位論文内容の要旨

I.序 文

基底細胞癌 (BCC) は発症頻度の高い皮膚癌であり、その発症率も年々増加傾向にある。近年、BCCにおける多様な染色体異常が報告され、また p53 癌抑制遺伝子の変異や第 9 番染色体長腕 (q22-31 領域) 上の patched 遺伝子の変異などが注目されている。これらの事実から、染色体異常もしくは遺伝子変異は、BCC の発症に強く関与していると考えられるが、その詳細な機序は未だ解明されていない。一方、BCC の clonality に関しては、その発生が単一の突然変異細胞の自律的増殖によるとの報告や複数の細胞の混在から構成されるとの報告もあり、未だ不明な点が多い。

本研究では、BCC 患者における分子遺伝学的解析並びに BCC 細胞の clonality を解析し、BCC における染色体異常と腫瘍細胞の癌化との関連性を検討することを目的とした。

II. 材料と方法

日本人 BCC 患者 18 名（男女各 9 名、年齢 40～87 歳、平均年齢 65.3 歳）を研究対象とした。各患者より、末梢血リンパ球、正常皮膚組織および腫瘍組織を採取した。腫瘍組織の一部は短期培養を行ない、培養細胞はケラチン抗体による免疫染色を行った。これらの検体を使用して Q-バンド法による分裂期細胞核の核型分析を行ない、さらに間期細胞核における性染色体数異常を解析するため、X および Y 染色体のセントロメア部分に対する DNA プローブを用いた FISH 法を行なった。BCC 患者の各種検体および健常者末梢血リンパ球間での性染色体数異常の頻度の比較は、有意差 5% ($P < 0.05$) にて Fisher's 検定により統計学的解析を行なった。BCC の clonality を調べるため、X 染色体上のヒト androgen receptor 遺伝子 (HUMARA) 領域に存在する trinucleotide (CAG) の反復配列の違いによる遺伝子多型性を解析した。女性患者の各組織より抽出した DNA を制限酵素 Hha I にて処理後 PCR を行い、その電気泳動により X 染色体の不活性化様式を分析し、腫瘍組織の細胞の由来を調べた。

III. 結 果

BCC 患者 12 名より得られた腫瘍組織の短期培養では、培養後 14 日目には腫瘍組織の周囲に上皮様細胞の増殖が認められた。上皮様細胞は外側に生育した線維芽様細胞とは形態が異なり、癌細胞に特徴的な pilling up 像を示し、BCC 細胞に特異的なタイプ 8

および17に対する抗ケラチン抗体に特異的陽性反応を示した。BCC患者の末梢血リンパ球のQ-バンド分染法による核型分析により、性染色体の欠失（45,X,-Y または 45,X,-X）が11名に認められた。また、短期培養細胞の核型分析では、12名全員に性染色体の欠失が認められた。各患者の末梢血リンパ球、正常皮膚組織、腫瘍組織および短期培養細胞の間期細胞核のFISH法による性染色体数の解析結果は、70歳以上のBCC患者群における末梢血リンパ球の性染色体欠失の頻度が、男女共に健常者群よりも有意に高値を示した。さらに、BCC患者群の各検体別の性染色体欠失およびその他の性染色体数異常の発現頻度は、男女共に腫瘍組織のみならず正常組織において健常者群と比較して有意に高値を示した。女性BCC患者の腫瘍組織と正常皮膚組織の細胞を用いたHUMARA 遺伝子のDNA解析によるBCCの clonality の解析結果は、正常皮膚組織のDNAを錆型にしたPCR では、制限酵素 *Hha* I による処理の有無にかかわらず2本のバンドが認められ、正常皮膚組織は不活性化 X 染色体が父母の両方に由来する細胞の混在 (polyclonal) からなることが示された。一方、BCC患者の腫瘍組織のDNA解析では、*Hha* I の処理により2本のうち一方のバンドが消失しており、腫瘍組織は不活性化により *Hha* I で切断されない X 染色体が父母のどちらか一方にのみ由来する、単一細胞由来 (monoclonal) であることが明らかとなった。

IV. 考 察

本研究では、18名のBCC患者について染色体分染法による核型分析に加えて、FISH 法を用いて分子遺伝学的解析を行なった。Q-バンド分染法による核型分析の結果、性染色体の欠失が末梢血リンパ球では11名に、短期培養細胞では12例全例に認められ、BCC患者の各種組織において性染色体欠失によるモザイク核型が高率に発現していることが判明した。さらに、間期核FISH法による解析では、男女とも性染色体数異常が高頻度に発現し、この傾向は加齢に伴い著明になることが明らかになった。特に、70歳以上では男女共にBCC患者群における発現頻度は健常者群よりも有意に高値を示した。これらの結果から、BCCの発症と性染色体数異常の増加との間には強い関連性があると推測される。

本研究では、腫瘍組織や短期培養細胞ばかりでなく、BCC患者の各種正常組織においても性染色体数の異常によるモザイクが高頻度に認められた。このことから、X 染色体上の HUMARA 遺伝子の多型性を分析し、X 染色体の不活性化様式を調べることによりBCCの clonality について解析を行った。この結果、BCC患者の正常皮膚組織は健常女性の末梢血リンパ球と同様に polyclonal な細胞集団から成る一方、BCC患者の腫瘍組織は不活性化 X 染色体が両親の一方にのみ由来する monoclonal な細胞集団から構成されていることが明らかになった。

これらの事実から、BCCの腫瘍組織は性染色体数の異常を含めたモザイク細胞集団であるにもかかわらず、その細胞の由来は monoclonal であることが判明した。これらの結果を考慮すると、BCCの腫瘍組織に高頻度に発現する性染色体数の異常は、単一細胞に由来するBCCの増殖過程で発生してきたものと推測される。BCCについては、癌抑制遺伝子である p53 および、第9番染色体上に存在し体節形成に強く関与している patched 遺伝子の変異が既に報告されており、各種癌遺伝子や癌抑制遺伝子の突然変異などの異常の集積がBCC発生の誘因であることが示唆されている。こうした知見と本研究結果から、BCCは幾つかの遺伝子に生じた突然変異の結果、自律的増殖能を獲得した単一細胞に由来すると推定される。本研究で認められたように、BCC患者の腫瘍組織のみならず正常組織における性染色体数異常の発現頻度の増加は、こうした各種癌遺伝子

や癌抑制遺伝子の突然変異の生じる可能性の増大を示唆しており、BCCの発生と密接な関係があると推測される。以上の研究結果より、BCC患者に特徴的に認められた性染色体数異常を詳細に解析することは、BCCの癌化機序の解明や発症の危険度の推測が可能なばかりでなく、予後の診断などの臨床応用に有益な情報をもたらすものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　加　藤　紘　之

副　查　教　授　藤　本　征一郎

副　查　教　授　西　信　三

副　查　教　授　杉　原　平　樹

学　位　論　文　題　名

Aneuploidy of sex chromosomes in basal cell carcinoma: Its clonality and involvement in the development of carcinogenesis

(基底細胞癌における性染色体数異常：その
clonality の解析および癌化との関連)

基底細胞癌 (BCC) は発症頻度の高い皮膚癌であり、その発症率も年々増加傾向にある。近年、BCCにおいて p53 癌抑制遺伝子や第 9 番染色体長腕 (q22-31 領域) 上の patched 遺伝子の変異などが注目されており、染色体異常もしくは遺伝子変異は BCC の発症に強く関与していると考えられるが、その詳細な機序は未だ解明されていない。一方、BCC の clonality に関しては、その発生が単一の突然変異細胞の自律的増殖によるとの報告や複数の細胞の混在から構成されるとの報告もあり未だ不明な点が多い。本研究では、BCC 患者における分子遺伝学的解析並びに BCC 細胞の clonality を解析し、BCC における染色体異常と腫瘍細胞の癌化との関連性を検討することを目的とした。日本人 BCC 患者 18 名（男女各 9 名、年齢 40 ~ 87 歳、平均年齢 65.3 歳）を研究対象とし、各患者より、末梢血リンパ球、正常皮膚組織および腫瘍組織を採取した。腫瘍組織の一部は短期培養を行ない、培養細胞はケラチン抗体による免疫染色を行った。これらの検体を使用して Q-バンド法による核型分析を行ない、さらに詳細に性染色体数異常を解析するため、X および Y 染色体のセントロメア部分に対する DNA プローブを用いた FISH 法を行なった。BCC の clonality を調べるため、X 染色体上のヒト androgen receptor 遺伝子 (HUMARA) 領域に存在する trinucleotide (CAG) の反復配列の違いによる遺伝子多型性を解析した。女性患者の各組織より抽出した DNA を制限酵素 Hha I にて処理後 PCR を行い、その電気泳動により X 染色体の不活性化様式を分析し、腫瘍組織の細胞の由来を調べた。その結果、BCC 患者 12 名より得られた腫瘍組織の短期培養では、培養後 14 日目には腫瘍組織の周囲に上皮様細胞の増殖が認められた。上皮様細胞は外側に生育した線維芽様細胞とは形態が異なり、癌細胞に特徴的な pilling up 像を示し、BCC 細胞に特異的なタイプ 8 および 17 に対する抗

ケラチン抗体に特異的陽性反応を示した。Q-バンド分染法による核型分析により、性染色体の欠失（45, X, -Y または 45, X, -X）が 11 名の BCC 患者の末梢血リンパ球および 12 例全例の短期培養細胞において認められた。各患者の末梢血リンパ球、正常皮膚組織、腫瘍組織および短期培養細胞の FISH 法による性染色体数の解析結果は、70 歳以上の BCC 患者群における末梢血リンパ球の性染色体欠失の頻度が、男女共に健常者群よりも有意に高値を示した。さらに、BCC 患者群の各検体別の性染色体数異常の発現頻度は、男女共に腫瘍組織のみならず正常組織において健常者群と比較して有意に高値を示した。女性 BCC 患者の腫瘍組織と正常皮膚組織の細胞を用いた HUMARA 遺伝子の DNA 解析の結果は、正常皮膚組織の DNA を鋳型にした PCR では、制限酵素 Hha I による処理の有無にかかわらず 2 本のバンドが認められ、正常皮膚組織は不活性化 X 染色体が父母の両方に由来する細胞の混在 (polyclonal) からなることが示された。一方、BCC 患者の腫瘍組織の DNA 解析では、Hha I の処理により 2 本のうち一方のバンドが消失しており、腫瘍組織は不活性化により Hha I で切断されない X 染色体が父母のどちらか一方にのみ由来する、単一細胞由来 (monoclonal) であることが明らかとなった。これらの結果から、BCC 患者の腫瘍組織は性染色体数の異常を含めたモザイク細胞集団であるにもかかわらず、その細胞の由来は monoclonal であることが判明した。BCC については、p53 癌抑制遺伝子および第 9 番染色体上に存在し体節形成に強く関与している patched 遺伝子の変異が既に報告されており、各種癌遺伝子や癌抑制遺伝子の突然変異などの異常の集積が BCC 発生の誘因であることが示唆されている。こうした知見と本研究結果から、BCC は幾つかの遺伝子に生じた突然変異の結果、自律的増殖能を獲得した単一細胞に由来すると推定され、BCC 患者の腫瘍組織のみならず正常組織における性染色体数異常の発現頻度の増加は、こうした各種癌遺伝子や癌抑制遺伝子の突然変異の生じる可能性の增大を示唆しており、BCC の発生と強く関連していると推測される。以上の研究結果より、BCC 患者に特徴的に認められた性染色体数異常を詳細に解析することは、BCC の癌化機序の解明や発症の危険度の推測が可能なばかりでなく、予後の診断などの臨床応用に有益な情報をもたらすものと考えられた。口頭発表において、副査西 信三教授から末梢血リンパ球の性染色体数異常は BCC に特異的か否か、またその解釈について、副査藤本征一郎教授より末梢血リンパ球の性染色体数異常と末梢血癌細胞の存在との関連、高齢者での性染色体欠失の機序、BCC の臨床型・組織型と染色体数異常との関連等について質問があった。さらに副査杉原平樹教授より basal cell nevus syndrome における染色体異常ならびに分子遺伝学的解析に関する知見について、また主査加藤紘之教授より健常者における末梢血リンパ球の性染色体数異常についての解釈、BCC 患者の末梢血リンパ球の性染色体数異常の多寡と臨床的病態との関連、ならびに臨床面における本研究の意義に関して質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自己の研究結果ならびに文献を引用して概ね妥当な回答をした。審査員一同は、本研究の成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。