

学 位 論 文 題 名

大腸癌の形態形成における増殖能と apoptosis の意義

学位論文内容の要旨

研究目的

Shimoda らは、大腸癌をその粘膜内増殖様式により polypoid growth (PG)型と nonpolypoid growth (NPG)型に分類し、NPG 型は PG 型に比較してより早期に深部に浸潤することを報告した。それ以降 NPG 型は PG 型に比較してリンパ節転移が高率であるなど、両者は異なった生物学的特性を有していることが明らかとなってきた。このような大腸癌の形態形成には、癌細胞浸潤に対する免疫細胞反応、線維化など生体側の要因とともに、癌細胞自体の増殖及び崩壊のバランスが重要な要素であると考えられる。しかし、これまで PG 型及び NPG 型の形態形成に関する検討は少ない。

本研究の目的は手術で切除された大腸癌を対象に、PG 型、NPG 型で分類される形態の違いと PCNA から見た癌細胞の増殖能及び apoptosis との関係を明らかにするとともに、apoptosis の発現における p53 の役割について検討することである。

対象と方法

1991 年 5 月から 1994 年 9 月までに恵佑会札幌病院で切除された大腸癌 82 症例（男性 40 例、女性 42 例、平均年齢 62.4 歳）82 病変を対象とした。

摘出標本を固定しパラフィン包埋後、連続切片を作成した。腫瘍の病理組織学的な評価はヘマトキシリンエオジン(H-E)染色で行い、大腸癌取り扱い規約に従って判定した。Shimoda らの分類に従い、粘膜内の腫瘍細胞が隆起性増殖を形成するものを PG 型、粘膜内隆起性増殖の見られないものを NPG 型に分類した。症例は、sm 癌 21 例（PG 型 9 例、NPG 型 12 例）、mp 癌 19 例（PG 型 8 例、NPG 型 11 例）、ss 及びそれ以降の癌(ss-a) 42 例（PG 型 22 例、NPG 型 20 例）である。

PCNA、p53 は免疫染色を行った。一次抗体として PCNA は PC10 を、p53 は Pab1801 を用い、Streptoavidin-biotin 抗体で反応後 diaminobenzidine (DAB)にて発色させた。また apoptosis の評価は ApopTag *in situ* apoptosis detection Kit を用い、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL 法)を行った。

標本は以下の基準で評価した。PCNA に関しては、腫瘍細胞 1000 個に対する陽性細胞の割合を PCNA labeling index (L.I. %) とした。apoptosis については、TUNEL 法により染色された細胞を陽性とし、腫瘍細胞 1000 個に対する陽性細胞の割合を apoptosis labeling index (Apo L.I.%) とした。また H-E 染色との対比で necrosis の部位を避けた。さらに mp 癌については腫瘍を上、中、下に三等分し、各部位の腫瘍核 500 個当たりの TUNEL 陽性細胞を計測した。p53 は 癌細胞の核が 30%以上陽性である場合 p53 陽性とした。

統計処理に関しては、Apo L.I.と PCNA L.I.は、平均値±標準偏差で示し、PG 型と NPG 型の Apo L.I.、PCNA L.I.の比較は Mann-Whitney U test を、mp 癌の部位別 Apo L.I.の比較は Friedman と Wilcoxon test を行い危険率 5%以下を有意とした。

結果

1) PG 型と NPG 型での PCNA L.I. の比較

PG 型、NPG 型の PCNA L.I.は全症例においてそれぞれ 658.5 ± 127.1 、 651.9 ± 176.2 と差を認めなかった。また sm 癌から ss-a 癌までの各深達度別でも PG 型、NPG 型との間には PCNA L.I.に差は認めなかった。

2a) PG 型と NPG 型での Apo L.I. の比較

PG 型全症例での Apo L.I. は 19.9 ± 9.8 であり、各深達度では sm 癌で 29.2 ± 9.7 , mp 癌で 21.7 ± 9.0 , ss-a 癌で 15.4 ± 7.0 であった。一方 NPG 型の Apo L.I. は全症例で 52.8 ± 25.1 と PG 型に比較して有意に高く、深達度別での検討でも sm 癌で 67.5 ± 25.6 , mp 癌で 37.2 ± 9.4 , ss-a 癌で 52.6 ± 26.3 と検討したすべての深達度で PG 型より高値であった ($p < 0.01$)。

2b) mp 癌での apoptosis 細胞の比較

mp 癌での上部、中部、下部の腫瘍細胞 500 個あたりの apoptosis 細胞数は PG 型ではおのおの 8.0 ± 4.8 , 11.8 ± 3.9 , 12.9 ± 5.9 であり、NPG 型ではおのおの 26.6 ± 7.6 , 17.3 ± 5.3 , 11.8 ± 4.3 であった。PG 型では順に apoptosis 細胞が増加するのに対し、NPG 型では順に減少していた。両型での比較において上部、中部では NPG 型の方が apoptosis の発現が有意に多く ($p < 0.01$)、下部では PG 型、NPG 型で差を認めなかった。

3) p53 染色性と apoptosis との関係

全症例での p53 陽性例は 64 例、陰性例 18 例であり、陽性率は 78% であった。また両型において陽性率に差はなく、apoptosis についても PG, NPG 型ともにその染色性と Apo L.I. には差を認めなかった。

考案

本研究の目的は大腸癌の形態と癌細胞の増殖能、apoptosis との関係を明らかにすることである。

PCNA を用いた増殖能の検討では、PG 型と NPG 型との間に差はなく、また sm 癌から ss-a 癌までの各深達度ごとの比較でも両型に差を認めなかった。大腸癌細胞における増殖能の意義については Ki-67 など他の増殖因子で検討がされているが、形態の違いとは相関がないとの報告が多い。本研究においてもこれまでの報告同様、PG 型と NPG 型に分類した形態形成とは関係ないことが確認された。

一方細胞崩壊の一種である apoptosis に関しては、NPG 型は PG 型と比較して有意に apoptosis が多く形態と関連していることが示された。また、各深達度別の検討においても NPG 型は PG 型よりも有意に Apo L.I. が高かったことより、癌発生初期の段階でも apoptosis の量が形態形成に関係していることが示唆された。大腸癌は、癌細胞が表層から深部に浸潤するに従って組織型が変化するなど発育進展過程で細胞生物学的性格が変化することを経験する。癌組織の表層では癌発生初期の性質が残存している可能性があるため mp 癌を対象に腫瘍を上部、中部、下部に三等分し、各部位における apoptosis の発現を検討した。その結果上部、中部では NPG 型は PG 型に比較し有意な apoptosis の発現が見られたのに対し、深部では NPG 型、PG 型共に発現に差を認めなかった。この結果は癌発生初期での apoptosis の量が形態と関係しているという考えをより支持するものと考えられた。

このような apoptosis の発現には外的要因とともに多くの関連遺伝子の存在が知られてきている。特に p53 蛋白は、癌の増殖進展に関与するとともに apoptosis 関連遺伝子の転写調節に重要である。本研究で観察された apoptosis の誘導に関し、Pab1801 抗体を用い p53 との関係についても検討を行ったが、PG 型、NPG 型ともに p53 の染色性と apoptosis との間には関係は認めず、大腸癌細胞での apoptosis の発現は p53 非依存性の系である考えられた。

結語

PG 型、NPG 型に分類した大腸癌の形態形成には、癌細胞の増殖能は関係しないが apoptosis による細胞崩壊が関与している。また、大腸癌における apoptosis の発現には p53 は関与していないと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

大腸癌の形態形成における増殖能と apoptosis の意義

大腸癌を腫瘍の粘膜内発育増殖様式に従い polypoid growth (PG) 型及び nonpolypoid growth (NPG) 型に分類しうることが Shimoda らにより報告されて以来、その臨床的意義が広く研究されてきている。しかしながら、これまで PG 型、NPG 型の形態形成に関する検討はほとんど行われていない。本研究は手術で切除された大腸癌を対象に、PG 型、NPG 型で分類される形態の違いと PCNA から見た癌細胞の増殖能及び apoptosis との関係を明らかにするとともに、apoptosis 発現における p53 の役割について検討した。研究対象は大腸癌 82 症例【sm 癌 21 例 (PG 型 9 例、NPG 型 12 例)、mp 癌 19 例 (PG 型 8 例、NPG 型 11 例)、ss 及びそれ以深の癌 (ss-a) 42 例 (PG 型 22 例、NPG 型 20 例)】を用いた。腫瘍の病理組織学的な評価はヘマトキシリンエオジン染色で行い、大腸癌取り扱い規約に従って判定した。Shimoda らの分類に従い、粘膜内の腫瘍細胞が隆起性増殖を形成するものを PG 型、粘膜内隆起性増殖のないものを NPG 型に分類した。一次抗体として PCNA は PC10 を、p53 は Pab1801 を用い免疫染色を行った。また apoptosis は ApopTag *in situ* apoptosis detection Kit を用い、TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL 法) を行った。評価は、PCNA に関しては、腫瘍細胞 1000 個に対する陽性細胞の割合を PCNA labeling index (L.I. %) とした。apoptosis については、TUNEL 法により染色された細胞を陽性とし、腫瘍細胞 1000 個に対する陽性細胞の割合を apoptosis labeling index (Apo L.I. %) とした。さらに mp 癌について腫瘍を上、中、下に三等分し、各部位の腫瘍核 500 個当たりの TUNEL 陽性細胞を計測した。p53 は 癌細胞の核が 30% 以上陽性である場合 p53 陽性とした。統計処理に関しては、Apo L.I.、PCNA L.I. の比較は Mann-Whitney U test を、mp 癌の部位別 Apo L.I. の比較は Friedman と Wilcoxon test を行い危険率 5% 以下を有意とした。結果は、PCNA を用いた増殖能の検討では、両型に差はなく、また各深達度ごとの比較でも両型に差を認めなかった。大腸癌細胞における増殖能の意義については、形態の違いとは相関がないとの報告が多く、本研究においても PG 型と NPG 型に分類した形態形成とは関係ないことが確認された。また

apoptosis に関しては、NPG 型は PG 型と比較して有意に apoptosis が多く発現しており、apoptosis は形態と関連していることが示された。各深達度別の検討においても NPG 型は PG 型よりも有意に Apo L.I.が高かったことより、癌発生初期の段階での apoptosis の量が形態形成に関係していることが示唆された。更に mp 癌での apoptosis は上部、中部では NPG 型の方が有意に多く、下部では PG 型、NPG 型で差を認めなかった。この結果は癌発生初期での apoptosis の量が形態と関係しているという考えをより支持するものと考えられた。PG 型、NPG 型ともに p53 の染色性と apoptosis との間には関係は認めず、大腸癌細胞での apoptosis の発現は p53 非依存性の系であると考えられた。結論として、PG 型、NPG 型に分類した大腸癌の形態形成には、癌細胞の増殖能は関係しないが apoptosis による細胞崩壊が関与し、大腸癌における apoptosis の発現には p53 は関与していないことを明らかにした。

審査に当たって、各教授より以下の順で質問があった。副査浅香教授からは、1.PG 型、NPG 型分類の妥当性に関して、2.apoptosis の発現の原因に関して、3.PCNA の発現に関して、4.リンパ節転移に関して、5.p53 の検討に関して質問があった。

副査長嶋教授からは、1.apoptosis の発現と予後の関係、2.apoptosis の発現を決定する因子に関して、癌細胞の性質あるいは周囲組織との関係、3.増殖能の検討に関して、4.癌の浸潤に関して質問があった。

主査川上教授より、免疫染色の定量的評価の再現性に関しての質問があった。

申請者はこれらに対しておおむね適切な解答を行った。

この研究は、大腸癌の形態と増殖能、apoptosis、p53 の関係を考察し、大腸癌の形態形成を解明する上で貴重なものと評価される。

審査員一同はこの研究が大腸癌の形態形成を解明した研究として高く評価し、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。