

学 位 論 文 題 名

肝様腺癌, 通常型胃癌, 肝細胞癌における
4q LOH の解析

学位論文内容の要旨

目 的

癌の分子生物学的特徴のひとつとして染色体の loss of heterozygosity (LOH) が知られている。肝細胞癌では染色体の 1p、4q、5q、8q、11q、16q、17p などの遺伝子座における LOH が 25%以上に認められると報告されている。なかでも 4q の遺伝子座には prealbumin、albumin、 α -fetoprotein (AFP)、fibrinogen など肝細胞が産生する蛋白質がコードされており、4q は肝細胞癌と密接に関わる部位として注目されている。肝様腺癌は肝臓以外の臓器に発生する病理組織学的に肝細胞癌に類似した腺癌であり、1985 年に石倉らにより提唱された。通常血清 AFP 値の上昇を伴うが、AFP 非産生性の肝様腺癌も存在する。AFP 産生胃癌は胃癌全体の約 5% を占め、そのほとんどが肝様腺癌であると考えられている。肝様腺癌は著明な静脈侵襲を伴い肝への血行性転移を高率に引き起こすため、通常の腺癌に比較して極めて予後不良であることが知られている。しかしながら比較的稀な癌腫ゆえに、分子生物学的な検討はほとんどなされていないのが現状である。本研究では肝様腺癌と肝細胞癌の分子生物学的類似性を明らかにするため、肝細胞癌で高頻度に認められる 4q LOH が肝様腺癌でも認められるか否か検討した。同時に通常の胃癌についても 4q LOH の有無を検討した。また、胃癌における臨床病理学的因子と 4q LOH の相関を検討した。

材料と方法

1991 年から 1999 年の間に北海道大学大学院医学研究科病態解析学講座分子病理学分野および北海道大学医学部付属病院病理部において診断された肝細胞癌 26 例、各臓器に発生した肝様腺癌 13 例、通常型胃癌 52 例を対象とした。肝様腺癌の内訳は、胃癌 7 例、大腸癌と卵巣癌が各 2 例、膵癌 1 例、肺癌 1 例であった。通常型胃癌の組織型の内訳は、高分化型管状腺癌 21 例、中分化型管状腺癌 15 例、低分化型腺癌 16 例であった。LOH の解析は Yeh らの方法に従い、microsatellite marker D4S395 を用いて行った。サンプルとする DNA はホルマリン固定、パラフィン包埋した標本から、6-10 μ m の組織切片を作製し、腫瘍部と非腫瘍部を microdissection 法により採取して精製した。LOH の判定は、非腫瘍部でヘテロな allele が認められ、かつ腫瘍部のひとつの allele のバンドの intensity が 50%以下のものを LOH 陽性とした。なお、非腫瘍部においてひとつの allele しか認められ

ない場合は not informative な症例として評価対象から除いた。臨床病理学的検討として腫瘍の組織学的分化度、病期(stage)、深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移について検討した。また細胞増殖性の指標として PCNA ならびに p53 に対する免疫組織化学染色を行った。強拡大視野（対物 40 倍レンズを使用）で、異なる 3 視野においてそれぞれ 300 個の細胞をカウントし、免疫染色陽性腫瘍細胞数の比率を計算した。

結果

肝細胞癌 26 例中 19 例が informative であり、そのうち 8 例 (42.1%) に 4q LOH が認められた。胃の肝様腺癌では 7 例中 4 例 (57.1%) に 4q LOH が認められた。通常型胃癌では 52 例中 47 例が informative であり、そのうち 6 例 (12.8%) に 4q LOH が認められた。肝細胞癌と通常型胃癌では 4q LOH の出現頻度に統計学的有意差が認められた。胃の肝様腺癌の 4q LOH の出現頻度は通常型胃癌と比べ有意に高く、肝細胞癌での出現頻度と同等であった。また通常型胃癌について組織学的分化度、病期(stage)、深達度、リンパ管侵襲の有無、静脈侵襲の有無、リンパ節転移の有無、PCNA および p53 陽性率の各臨床病理学的因子と 4q LOH の関連を検討した。組織学的分化度に関して、4q LOH は高分化型管状腺癌では認めず、中分化型管状腺癌では 14 例中 2 例 (14.3%) に、低分化型腺癌では 15 例中 4 例 (26.7%) に認められた。stage I の 24 例では 4q LOH を認めず、stage II 以上のものは 23 例中 6 例 (26.1%) に認められ、両者の間に統計学的な有意差が認められた。また、静脈侵襲がなかった 35 例中、4q LOH が認められたのは 2 例 (5.7%) であったが、静脈侵襲があった 12 例では、うち 4 例 (33.3%) に 4q LOH が認められ、統計学的な有意差を認めた。

考察

本研究では、肝様腺癌では肝細胞癌と同等の頻度で 4q LOH が観察された。肝細胞癌類似性を示さない通常型胃癌での 4q LOH 出現頻度は胃の肝様腺癌での出現頻度に比べて有意に低く、4q LOH は肝様腺癌の肝細胞癌類似性に関与している可能性が示唆された。染色体 4q に LOH が生じることにより、なぜ肝細胞癌類似性が発現されるかについては不明である。しかし、4q の遺伝子座には肝細胞が産生する蛋白質をコードする遺伝子が存在しており、これらの蛋白質の産生異常と機能的形態学的な肝細胞との類似性が関係している可能性も十分に考えられる。実際に、4q LOH は血清 AFP 値の上昇に関係があるとの報告もあり、今後の研究により両者の関係が明らかになってゆくものと思われる。なお、4q の遺伝子座に癌抑制遺伝子の報告はなく、また肝細胞類似性を示さない癌の 4qLOH の報告も殆どないことから、4qLOH は発癌や癌進展よりも、肝細胞類似性に関与している可能性が考えられる。また本研究では、通常型胃癌でも低頻度ながら 4q LOH が観察された。分化度が低くなるほど 4q LOH の頻度が増加する傾向が認められた。また病期や深達度、脈管侵襲、リンパ節転移、細胞増殖性などの因子で示される癌の悪性度との関連が高いことも示唆された。今回の解析は D4S395 という一つの microsatellite marker に限定したもので、各症例ごとの染色体上の遺伝子欠損領域の広がりについては情報が得られなかった。同じように D4S395 領域の LOH

を含んでいても、肝様腺癌と通常型胃癌では遺伝子欠損領域の広がり異なっている可能性が考えられる。今後、使用するマーカーの数を増やし、腺癌の肝細胞癌類似性獲得に関わる遺伝子群をさらに絞り込んでゆく必要がある。

結語

肝様腺癌では肝細胞癌と同様に 4q LOH が高頻度に認められ、形態学的類似性だけでなく、分子生物学的異常における両者の類似性も示唆された。通常型胃癌でも低頻度ながら 4q LOH が認められた。その頻度は組織学的分化度が低くなるほど上昇した。臨床病理学的悪性度の高い胃癌症例の方が 4q LOH の出現頻度が高い傾向にあった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小野江 和 則

学 位 論 文 題 名

肝様腺癌，通常型胃癌，肝細胞癌における 4q LOH の解析

肝様腺癌は肝臓以外の臓器に発生する病理組織学的に肝細胞癌に類似した腺癌であり、著明な静脈侵襲を伴い肝への血行性転移を高率に引き起こすため、通常の腺癌に比較して極めて予後不良であることが知られている。しかしながら比較的稀な癌腫ゆえに、生物学的、遺伝子異常などの検討はほとんどなされていないのが現状である。本研究では肝様腺癌と肝細胞癌の分子生物学的類似性を明らかにするため、肝細胞癌で高頻度に認められる4q LOHに注目した。同時に通常の胃癌についても4q LOHの有無を検討し、臨床病理学的因子と4q LOHの相関を検討した。

対象は1991年から1999年間に診断された肝細胞癌26例、各臓器に発生した肝様腺癌13例、通常型胃癌52例とした。肝様腺癌の内訳は、胃癌7例、大腸癌と卵巣癌が各2例、膵癌1例、肺癌1例であった。通常型胃癌の組織型の内訳は、高分化型管状腺癌21例、中分化型管状腺癌15例、低分化型腺癌16例であった。LOHの解析はYehらの方法に従い、microsatellite marker D4S395を用いて行った。結果は肝細胞癌26例中19例がinformativeであり、そのうち8例(42.1%)に4q LOHが認められた。胃の肝様腺癌では7例中4例(57.1%)に4q LOHが認められた。通常型胃癌では52例中47例がinformativeであり、そのうち6例(12.8%)に4q LOHが認められた。肝細胞癌と通常型胃癌では4q LOHの頻度に統計学的有意差が認められた。胃の肝様腺癌の4q LOHの頻度は通常型胃癌と比べ有意に高く、肝細胞癌での頻度と同等であった。また通常型胃癌の組織学的分化度に関して、4q LOHは高分化型管状腺癌では認めず、中分化型管状腺癌では14例中2例(14.3%)に、低分化型腺癌では15例中4例(26.7%)に認められた。stage Iの24例では4q LOHを認めず、stage II以上のものは23例中6例(26.1%)に認められ、両者の間に統計学的有意差が認められた。また、静脈侵襲がなかった35例中、4q LOHが認められたのは2例(5.7%)であったが、静脈侵襲があった12例では、うち4例(33.3%)に4q LOHが認められ、統計学的有意差を認めた。

本研究では、肝臓癌では肝細胞癌と同等の頻度で 4q LOH が観察された。肝細胞癌類似性を示さない通常型胃癌での 4q LOH 出現頻度は胃の肝臓癌での出現頻度に比べて有意に低く、4q LOH は肝臓癌の肝細胞癌類似性に関与している可能性が示唆された。なお、4q の遺伝子座に癌抑制遺伝子の報告はなく、また肝細胞類似性を示さない癌の 4qLOH の報告も殆どないことから、4qLOH は発癌や癌進展よりも、肝細胞類似性に関与している可能性が考えられる。また本研究では、通常型胃癌でも低頻度ながら 4q LOH が観察された。分化度が低くなるほど 4q LOH の頻度が増加する傾向が認められた。また病期や静脈侵襲で示される癌の悪性度との関連が高いことも示唆された。今回の解析は D4S395 という一つの microsatellite marker に限定したもので、各症例ごとの染色体上の遺伝子欠損領域の広がりについては情報が得られなかった。同じように D4S395 領域の LOH を含んでいても、肝臓癌と通常型胃癌では遺伝子欠損領域の広がりが異なっている可能性が考えられる。今後、使用するマーカーの数を増やし、癌の肝細胞癌類似性獲得に関わる遺伝子群をさらに絞り込んでゆく必要があると考えられた。

口頭発表において、吉木教授より 4q LOH の詳細な解析、さらにその領域に認められると考えられる癌抑制遺伝子の特定、網羅的な既知の遺伝子検索の必要性、肝臓癌の培養株の樹立やその分析の必要性について質問があった。ついで小野江教授より肝臓癌の実際の頻度、その診断基準、産生している AFP の type、肝細胞癌の悪性度との関連性、4q LOH によってどのような現象、影響が細胞に現れるかについて質問があった。また加藤教授より胃の低分化型腺癌と肝臓癌の関連、肝細胞癌との類似性の根拠について、さらに、近い将来、LOH 検索が肝臓癌に対する手術適応を判断する情報になり得るかについて質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。

今回の 4q LOH の検索によって肝臓癌が肝細胞癌類似性に強く関与していること、また通常型胃癌の悪性度の示標として有用であることが示唆された本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。