

学位論文題名

内視鏡的切除大腸ポリープ境界病変における  
分子病理学的解析

学位論文内容の要旨

緒言

大腸癌を早期に発見するために、内視鏡検査は効果的であり、内視鏡検査においてポリープ切除は日常的に行われ、切除された検体は病組織学的に診断され良悪が判定される。大腸ポリープでは形態学的診断と遺伝子変異が一致して説明されているが、実際の大腸ポリープの病理診断においては、腺腫(adenoma: Group3 or A3)と癌(carcinoma: Group 5 or A5)との間に管状腺腫(高度異型)と記載される高度異型腺腫(adenoma with severe atypia: Group 4 or A4)と呼ばれる病変がある。しかし、この病変の診断に関しては病理医個人差、施設間での差があり、臨床家として患者への説明や治療方針決定に戸惑うことが多い。この原因として Group 4 の診断基準が普遍化されていないためと考えられる。そこで、Group 4 の所見に関して、組織像と遺伝子変異の相関を検討し、これらの解析が診断への補助所見となり得るかを検索した。

材料と方法

小池胃腸科外科(札幌市)、稚内市立病院(稚内市)および札幌徳洲会病院(札幌市)にてポリペクトミー(polypectomy)、あるいは内視鏡的粘膜切除術(endoscopic mucosal resection, EMR)で切除された大腸ポリープのうち、病理診断が管状腺腫(中等度異型、高度異型)および高分化腺癌であるもの130例を使用した。病理診断は3名の病理専門医が「大腸癌取り扱い規約、1998年[第6版]」に準じて検討をおこない基準を設定した。

1. 免疫染色: ① p53: 抗体, ② MIB1: 抗体, ③ pERK: 抗リン酸化 ERK 抗体を用いた。免疫染色判定基準と有意差検定: p53 および pERK の免疫染色を4段階に分けて評価した。MIB1 index は中等度異型の腺腫 A3 では表層部で高く、深層で低い標識が明瞭なので、表層と深層とで分けて算出し、高度異型腺腫 A4 と腺癌 A5 では平均値を示した。各群の優位差は $\chi$  自乗検定で示した。
2. DNA の抽出と解析: 厚さ 10  $\mu$ m 薄切切片 5 枚を用いて、DNA extraction kit を用いて、proteinase K 処理を 15-20 時間行い、ethanol 沈殿法にて抽出した。
4. Restriction enzyme fragment length polymorphism (RFLP) 法により、抽出した DNA を該当する部位を PCR にて増幅し Ras12 番アミノ酸をコードする遺伝子の変異解析した。
5. Polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) 法を用いて Ras, p53, B-Raf の変異解析をおこなった。

結果

1. 大腸ポリープ組織基準を設定し、MIB1 および p53 の免疫組織学的検討した症例の内訳は A3 が 61 例で、A4 を含むもの A3+A4 は 29 例、A5 を含むもの A3+A5 は 13 例、A3+A4+A5 は 20 例あった。MIB1 index は、A3 の表層部で 40%、深層で 8%、平均 24% となり、A4 および A5 においてはそれぞれ平均値が 58%、65% となった。

p53 の免疫染色の染色性と腺腫の異型度と陽性率を中等度異型腺腫(A3)、高度異型腺腫

(A4), 腺癌(A5)で検討したところ, 2+または3+であるものの比率は A3, A4, A5 の各組織型において, それぞれ 25%, 47%, 70%と段階的な増加がみられ, 統計的に  $p < 0.05$  で有意差が見られた.

## 2. p53 の PCR-SSCP による遺伝子変異解析の結果

p53 の Exon 5-8 の変異解析の結果, Exon 5 の変異の A3, A4, A5 における検出率は 5%, 8%, 22%と A5 の腺癌で増加がみられた. また p53 の発現が 2+または3+であり, なおかつ PCR-SSCP 法においても陽性バンドが検出された症例は A3, A4, A5 でそれぞれ 6%, 7%, 19%であり, 高度異型腺腫 A4 と腺癌 A5 の間には 12%の差がみられた.

3. Ras の遺伝子変異解析の結果, RFLP 法にて陽性を示すものは, A3, A4, A5 の各段階で 22%, 29%, 43%と軽度段階的な増加がみられたが, PCR-SSCP にて陽性となるもの, および両方が陽性となるのは 3 群間で差が無かった.

4. リン酸化 ERK 染色の結果, 腺腫 A3, 異型腺腫 A4 および腺癌 A5 において陽性例は 27%, 28%, 54%と A5 において高値となった.

5. B-Raf の遺伝子変異解析では, 陽性変異バンド は 128 例中 2 症例にしか検出されず, 明らかな結論を得られなかった.

## 考 察

本研究は, 日常的に切除している大腸ポリープ 患者の予後を考える際に, 病理組織学的検索に加えて比較的簡便にできる遺伝子解析結果を検討し, 臨床の場へ還元することを目的に行ったものである. 特に病理診断が高度異型腺腫である場合にはその診断基準を考慮しなければならない. 検討の結果 MIB1 index, p53 免疫染色と PCR-SSCP 法を用いて変異の有無について検討を行った所, 中等度異型腺腫から腺癌まで段階的に有意差をもって増加していることが認められた. Ras の変異は腺腫から腺癌までほぼ一定であった. これらの結果から, 組織形態に加えて Ras および p53 の変異の有無, MIB1 index を検討することがさらに精確な高度異型腺腫の診断にとって重要であることが示された.

本研究において A3, A4, A5 を簡便に分類するマーカーを検索したが, p53 の陽性率に有意差が見られ, MIB1 index は A3 と A4 の間に差がみられ, Ras の変異においては A3, A4, A5 での差はみられず, また, pERK に関しては A4 と A5 の間に差がみられた. 従って, 多段階で発癌過程の中の病変を単一の因子で規定する事は困難であり, 多数の因子を検索することが重要であると思われた.

## 結 語

1. 大腸・直腸の polyp 病変に関して, p53 の免疫染色, 変異解析, Ras の変異解析, MIB1 インデックス, は組織型と相関を示し, 高度異型腺腫の評価にとって有用であることが示された.

2. パラフィンから Ras の変異解析に必要な質の DNA が抽出できない症例においては, pERK の免疫染色を行う事によって, Ras/ERK 経路の活性化の状態がある程度推察できることが判明した.

3. Polyp 状の高度異型腺腫は検索した範囲では 多段階の発癌過程の病変であり, 単一の因子では診断は困難であり, 多数の因子を検索することが重要であることが考えられた.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 野 口 昌 幸

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

## 内視鏡的切除大腸ポリープ境界病変における 分子病理学的解析

大腸癌を早期に発見するため内視鏡検査においてポリープ切除は日常的に行われ、切除された検体は病組織学的に診断され良悪が判定される。実際の大腸ポリープの病理診断においては、腺腫(ad enoma: Group 3 or A3)と癌(carcinoma: Group 5 or A5)との間に管状腺腫(高度異型)と記載される高度異型腺腫(adenoma with severe atypia: Group 4 or A4)と呼ばれる病変がある。そこで、Group 4の所見に関して、組織像と遺伝子変異の相関を検討し、これらの解析が診断への補助所見となり得るかを検索した。

小池胃腸科外科等の病院にてポリペクトミー(polypectomy)、あるいは内視鏡的粘膜切除術(endoscopic mucosal resection, EMR)で切除された大腸ポリープのうち、病理診断が管状腺腫(中等度異型、高度異型)および高分化腺癌であるもの130例を使用した。病理診断は3名の病理専門医が「大腸癌取り扱い規約」に準じて検討をおこない基準を設定した。

免疫染色として抗 p53, 抗 MIB1, 抗リン酸化 ERK 抗体を用いた。DNA の解析には、薄切片より DNA extraction kit DNA を抽出した。RFLP 法と PCR-SSCP)法を用いて Ras, p53, B-Raf の変異解析をおこなった。

ポリープ組織基準を設定し、MIB1 および p53 の免疫組織学的検討した症例の内訳は A3 が 61 例で、A4 を含むもの A3+A4 は 29 例、A5 を含むもの A3+A5 は 33 例あった。MIB1 index は、A3 の表層部で 40%、深層で 8%、平均 24%となり、A4 および A5 においてはそれぞれ平均値が 58%、65%となった。

p53 の免疫染色の染色性と腺腫の異型度と陽性率を中等度異型腺腫(A3)、高度異型腺腫(A4)、腺癌(A5)で検討したところ、陽性の比率は A3, A4, A5 の各組織型において、それぞれ 25%、47%、70%と段階的な増加がみられ、統計的に  $p < 0.05$  で有意差が見られた。

p53 の PCR-SSCP による遺伝子変異解析の結果では、p53 の Exon 5-8 の変異解析の結果、Exon 5 の変異の A3, A4, A5 における検出率は 5%、8%、22%と A5 の腺癌で増加がみられた。また p53 の発現が陽性であり、なおかつ PCR-SSCP 法においても陽性バンドが検出された症例は A3, A4, A5 でそれぞれ 6%、7%、19%であり、高度異型腺腫 A4 と腺癌 A5 の間には 12%の差がみられた。

Ras の遺伝子変異解析の結果、RFLP 法と PCR-SSCP にて陽性となるものを検討すると、3 群間で差が無かった。リン酸化 ERK 染色の結果、腺腫 A3, 異型腺腫 A4 および腺癌 A5 において陽性例は 27%、28%、54%と A5 において高値となった。

高度異型腺腫 A4 は、MIB1 陽性率と p53 陽性率で見ると腺癌 A5 に近い値を示し、Ras の変異では差異が無く、pERK の陽性率では A3 に近い値を取ることが判明した。従って、A4 は多段階で発癌過程の中の病変であり、中等度異型腺腫と腺癌の中間に位置する病変であることが示された。

口頭発表に当たり、副査の野口教授から、検討を行った分子の選択理由と今後検討すべき因子について、検索因子の他腫瘍への応用可能性に関して、同じく副査の浅香教授から、A4はcarcinomaに入れるべきかborderline病変と考えるか、今回の検討で形態を越えて確信に至る分子の存在、日本と欧米の基準の不一致に関する見解についての質問があった。次いで主査の長嶋教授から、Laser Captured Microdissectionを適用しなかった点、Polypの大きさと異型腺腫の出現との相関に関して、異型腺腫の臨床での取り扱いに関して質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね妥当な解答を行なった。

この論文は大腸高度異型腺腫の病理所見と遺伝子発現に関してその特徴を明らかにした点で高く評価され、臨床的評価にも応用可能であることが示された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。