

学 位 論 文 題 名

大腸癌肝転移における腫瘍核 DNA 量および
c-erbB-2 癌遺伝子産物発現に関する研究

— 臨床病理学的所見および予後との関連 —

学位論文内容の要旨

I 研 究 目 的

大腸癌の治療成績向上を妨げる肝転移は大腸癌の10%以上に認められるが、これに対し積極的に肝切除術を行い良好な結果を得ている。しかし、肉眼的に病巣を完全に切除し得た症例でも早期に再発するものがある。従来の臨床病理学的所見からそれを推定するには限界があり、新しい見地から、よりの確な予後因子による検討が必要である。

最近、癌腫固有の生物学的悪性度の指標として腫瘍核 DNA 量や、癌遺伝子の面からの解析が進められているが、大腸癌肝転移について腫瘍核 DNA 量および癌遺伝子産物発現の両面から解析した報告は少ない。そこで著者は、フローサイトメトリー (FCM) で核 DNA 量を測定し、転移関連癌遺伝子として注目されている c-erbB-2 遺伝子産物の発現を検索し、予後因子としての意義を検討した。

II 実験の対象と方法

対象：最近10年間に治療した大腸癌肝転移67例中、原発巣および肝転移巣を共に切除した44例である。また、術後5年以上肝転移のない治癒切除、大腸癌45例を比較対照とした。

方法：パラフィン包埋検体から壊死組織の少ないブロックを3個選定し、連続する3 μ mと70 μ mの切片を作成した。前者を c-erbB-2 蛋白発現検索用とし、後者を FCM 用の試料とした。

1. 腫瘍核 DNA 量の測定

腫瘍部で変性の少ない部分をトリミングし、脱パラフィン、再水和処理の過程で金属メッシュ (150 #) を用いて機械的分散を行った。さらに、0.5% pepsin (pH 1.5) 溶液中で酵素処理 (37°C, 30分) し、Hanks' 液 (Gibco 社) で洗浄した。ナイロンメッシュ (30 μ m) に通した後 propidium iodide (50 μ g/ml, Sigma 社), 1 mg/ml の ribonuclease (Sigma 社), 0.1

%, tritonX (片山化学) を含んだ1.12% trisodiumcitrate (和光純薬) で4℃, 20分間暗所にてDNA染色し, Cytofluorograf system 50H (Ortho社) を用いて核DNA量を測定した。

腫瘍内浸潤リンパ球を内部標準とした腫瘍細胞G₀/G₁peakの相対的蛍光量をDNA index (DI値) とし, 単一のpeakを示す場合 (diploidy) はDI値を1.0とした。複数のpeakを示す場合 (aneuploidy) は, 細胞数が最も多い腫瘍G₀/G₁peakのDI値をその腫瘍のDI値とした。

2. c-erbB-2蛋白の免疫組織学的検索

脱パラフィン後, 1% H₂O₂加メタノールで処理後, 3%正常ヒツジ血清を室温で20分間反応させた。1次抗体として抗ヒトc-erbB-2蛋白ポリクローナル抗体 (Nichirei社, OPG02003×50) を用い4℃で1昼夜反応させた。2次抗体として avidin-biotin-peroxidase 複合体試薬 (Vector社) を室温で30分間で反応させ, diaminobenzidine で染色後 hematoxylin で核染色した。

判定は病巣全体の25%以上の癌細胞膜または細胞質が褐色顆粒状に染色された場合を陽性とした。陽性例のうち新鮮組織が得られたものについて Eco RI を用いた Southern blot hybridization 法でc-erbB-2遺伝子が増幅していることが確認した。

III 研究結果

1. 核DNA量の分布様式

ヒストグラムのCV (coefficient of variation) 値は, 平均4.2%であった。肝転移陰性群, 肝転移群原発巣および肝転移のDI値の分布は, diploidyのほかに $1.0 < DI \leq 1.5$ のlow ploid aneuploidy (LPA) と $1.5 < DI$ のhigh ploid aneuploidy (HPA) 3峰性を示した。

2. 核DNA ploidy

aneuploidyの頻度は肝転移陰性群53.3%, 肝転移群原発群で79.5%であった。肝転移巣では86.4%で, 肝転移陰性群に比べ肝転移群の原発巣・肝転移巣ともaneuploidyが高率に認められた ($p < 0.05$)。原発巣と肝転移巣のDI値は弱い正の相関 ($r = 0.60, p < 0.01$) を認めたが, ploidy pattern (diploid, LPA, HPA) の面から検討すると, 原発巣と肝転移巣の間でploidy patternの解離を10例22.7%に認めた。

3. c-erbB-2蛋白発現

発現陽性例の癌巣内での染色性は均一ではなく, 陰性部分が混在していた。陽性率は肝転移陰性群4.4%, 肝転移原発巣で31.8%であった。肝転移巣では27.2%であり, 肝転移群の原発巣・

肝転移巣とも有意 ($p < 0.01$) に陽性率が高かった。

4. 臨床病理組織学的所見と核 DNA ploidy

肝転移例の原発巣局在部位, 肝切除前 CEA 値, 肝転移時期, 肝転移程度, 肝転移個数, 原発巣・肝転移最大径, 組織型, 壁深達度, リンパ節転移, 脈管侵襲の臨床病理学的各因子と核 DNA ploidy の関係を検討した。原発巣 ploidy では, 異時性肝転移に diploidy が, 両葉多発肝転移例に HPA が, また静脈侵襲陽性例に LPA が有意 ($p < 0.05$) に多かった。肝転移巣 ploidy では ploidy が高いほど肝転移巣最大径が大きかった ($p < 0.05$)。

5. 臨床病理組織学的所見と c-erbB-2 発現

同様の臨床病理学的因子と c-erbB-2 蛋白発現の有無との関係では, 壁深達度と原発巣の蛋白発現との間に有意な関係を認めた。すなわち壁深達度が高度になるとともに発現陽性率は上昇し, 癌浸潤が漿膜を越えると有意 ($p < 0.05$) に発現率が高かった。

6. 核 DNA ploidy と c-erbB-2

肝転移陰性群における c-erbB-2 発現陽性例の 2 例は, いずれも HPA で, 発現陰性例の HPA 出現率との間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。肝転移群でも, 発現陰性群に比べ陽性群の HPA 出現率は高かったが, 有意差はなかった。

7. 累積生存率

相対非治癒切除 31 例の生存率を前述の臨床病理学的因子から検討したが, 肝転移個数因子でのみ有意差 ($p < 0.05$) を認めた。一方, 原発巣の ploidy からの検討では, LPA 群が最も予後不良で diploid 群, HPA 群との間に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。さらに, 肝転移巣では, diploid 群に死亡例はなく, HPA 群, LPA 群の順に有意差 ($p < 0.01$) をもって予後不良であった。c-erbB-2 での検討では, 原発巣および肝転移巣とも蛋白発現の有無で生存率に有意差を認めなかった。

IV 考 察

一般に固形腫瘍の予後と, 核 DNA 量との関係は, 染色体の量的異常を示す aneuploidy が予後不良であるとされている。しかし, 核 DNA 量が独立した予後因子であるか否かについては意見の一致をみておらず, 大腸癌肝転移の原発巣および肝転移巣両方の核 DNA 量を検討した報告は極めて少ない。

今回 DI 値の大小による核 DNA ploidy からの解析では, 原発巣および肝転移巣とも LPA 群が最も予後不良であった。特に, 肝転移巣核 DNA 量の検索は従来の臨床病理学的因子とは

独立した予後因子として有用であった。

一方、染色体の質的变化という面から癌遺伝子に着目し、c-erbB-2 蛋白の発現を検索した。肝転移群の発現率は高く、原発巣の増殖、進展、さらに肝転移の成立に関与していることが示されたが、予後因子としての有用性は認められなかった。

今回の解析のように大腸癌肝転移を予知し、予後を推定することは症例に応じた治療法を選択し、有用な情報を提供し、大腸癌の治療成績向上に寄与すると考える。しかし、癌の転移には多くの過程や、要因が存在し、核 DNA 量や単一の癌遺伝子発現だけでは、転移成立の一局面を捉えているにすぎないと考えられ、分子レベル、遺伝子レベルでのさらなる研究が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 葛 巻 暹

大腸癌肝転移に対し、肉眼的に病巣を完全に切除し得ても、早期に再発するものがある。これを従来の臨床病理学的所見から推定するには限定がある。そこで申請者は、腫瘍核 DNA 量および c-erbB-2 癌遺伝子産物の発現を検索し、予後因子としての意義を検討した。

対象は原発巣および肝転移巣をもとに切除した大腸癌肝転移44例で比較対象として術後5年以上肝転移を認めていない治癒切除大腸癌45例を用いた。

まず、パラフィン包埋ブロックから連続する70 μ mと3 μ mの切片を切り出し、前者を核 DNA 量解析用、後者を c-erbB-2 蛋白検索用の検体とした。核 DNA 量は Flow cytometry (FCM) で測定した。検体処理は、脱パラ・再水和過程で金属メッシュ (150 #) を用いた機械的分散を行い、0.5% pepsin (pH=1.5) で酵素処理 (37°C, 30分) 後、propidium iodide (50 μ g/ml) で DNA 染色し、蛍光量を測定した。判定は DNA index (D.I)=1.0 diploidy とし、1.0以外は aneuploidy とした。複数の aneuploidy peak が認められる場合は、細胞数が最大の D. I とし、検体間で異なる D. I は2c細胞に対する細胞数比が最大のものとした。

c-erbB-2 単発発現は、1次抗体に抗ヒト c-erbB-2 ポリクロナル抗体 (Nichirei 社, 020 03) を用いた ABC 法免疫組織染色で検索した。判定は、病巣全体の25%以上の癌細胞膜または

細胞質が褐色顆粒状に染色された場合を陽性とした。また、陽性例で癌巣新鮮組織が得られたものについては EcoRI を用いた Southern blot hybridization 法で c-erbB-2 遺伝子が増幅していることを確認した。

まず、核 DNA 量解析で D.I の分布は、肝転移陰性群、陽性群とも diploidy のほかに、 $1.0 < D.I \leq 1.5$ の low ploid aneuploidy (LPA) と $1.5 < D.I$ の high ploid aneuploidy (HPA) の 3 峰性に分布した。

aneuploidy の出現頻度は肝転移陰性群 53.3%、肝転移群原発巣 79.5%、肝転移巣で 86.4% であり肝転移群の原発巣、肝転移とも aneuploidy が高率に認められた。各群における aneuploid 例の D.I に差は認められなかった。原発巣と肝転移巣の D.I は正の相関 ($r = 0.60, p < 0.01$) を認めたが、原発巣-肝転移巣間で ploidy pattern の解離を 22.7% に認めた。

次いで、c-erbB-2 蛋白発現陽性率は、肝転移陰性群 4.4%、肝転移群原発巣で 31.8% であった。肝転移巣では 27.2% であり、肝転移群の原発巣、肝転移巣とも蛋白発現陽性率が高率であった。一方、蛋白発現の有無 ploidy の間に有意な関係は認められなかった。

さらに、肝転移群において従来の臨床病理学的所見と核 DNA 量との関係を検討した。原発巣 ploidy と有意な関係を認めたのは、肝転移時期、肝転移度、静脈侵襲の各因子であった。肝転移巣 ploidy と有意な関係を認めた因子は、肝転移巣最大径のみであった。

同様に臨床病理学的所見と c-erbB-2 蛋白発現との関係を検討した結果、有意な関係を認めたのは、壁深達度と原発巣蛋白発現との間であった。すなわち癌が腸管壁を貫く $s(a2)$ 以上の進行例で有意に発現率が高率であった。

次いで核 DNA 量および c-erbB-2 蛋白発現の有無が、予後因子として有用であるか否かを検討するため、臨床病理学的因子で相対非治癒切除例の累積生存率を検討した結果、有意差を認めたのは肝転移個数因子のみであった。一方、核 DNA ploidy の検討では原発巣、肝転移巣とも LPA 群が最も予後不良であった。特に肝転移巣では diploid 群に死亡例はなく、HPA 群、LPA 群の順に有意差をもって予後不良であった。c-erbB-2 での検討では蛋白発現の有無で生存率に有意差を認めなかった。

以上より、予後からみた生物学的悪性度の指標として核 DNA 量解析が有用であることが示され、特に肝転移巣核 DNA 量は、より従来の臨床病理学的因子と相関を認めず、大腸癌肝転移切除例の予後因子として有用であった。一方、c-erbB-2 蛋白発現の検索は、予後因子としての有用性はないが、大腸癌肝転移予後因子として有用である可能性が示唆された。

審査にあたって、葛巻教授より c-erbB-2 蛋白発現陽性判定基準、Southern blot 法での遺

伝子増幅頻度について、長嶋教授より c-erbB-2 蛋白発現と病理学的因子との関係についてなど質疑があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

癌の転移成立には様々の要因や過程が存在し解明されなければならない問題が多いが、大腸癌肝転移の原発巣および肝転移巣両者について、核 DNA 量および癌遺伝子という染色体の量的変化と質的変化の両面から検討した報告は極めて少なく、本研究は大腸癌の肝転移を予知し、予後を推定することの可能性を示した点で意義があり、学位授与に値するものとする。