

## 学 位 論 文 題 名

## 膵癌の浸潤・転移における Syk 発現の解析

## 学位論文内容の要旨

癌は臨床的、病理形態学的また遺伝子レベルでも前癌病変から早期癌、更には転移・浸潤能を持つ癌細胞へ多段階的に進行することが知られている。更に各段階において癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常が蓄積し、その遺伝子産物の機能の亢進あるいは低下が癌の発生、進行に密接に関与すると考えられ、ヒト大腸では Vogelstein らによって発癌過程を病理形態学的変化と遺伝子異常の蓄積を関連付けて説明したモデルが提唱されている。一方、膵臓においては、大腸や子宮頸部などの臓器と比較すると生検、手術をすることが困難である等の理由から progression model の樹立が遅れていたが、膵管の乳頭状病変が前癌病変であるとの認識が確立され、現在ではそれらの病変を pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) と呼び、progression model が確立された。この model は組織形態的に PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) を 4 段階に分け、1A は mucinous hypertrophy、1B は ductal papillary hyperplasia、2 は PanIN 1 で moderate dysplasia を示すもの、3 は severe ductal dysplasia に相当する病変であり、1A、1B、2、3、invasive ductal carcinoma の順に細胞異型、構造異型が高度となる。これに対応して cancer-associated genes の変異が蓄積すると考えられており、K-ras の活性化、HER-2/neu の発現が比較的早期に出現し、p16 の不活性が中期に、p53、DPC4、BRCA2 の不活性化が後期に起こると考えられている。しかし、浸潤に関しては TGF $\beta$  やマトリックスメタロプロテアーゼ等の分子の関与が考えられているものの、鍵になる分子は同定されておらず、コンセンサスを得られるようなモデルは提唱されていない。一方、細胞質チロシンキナーゼをコードする *syk* (spleen tyrosine kinase) は B 細胞、血小板などの血球系の細胞に広く発現し増殖、分化、貪食など様々な細胞反応を引き起こすことが知られている。また細胞質蛋白 Syk は上皮細胞にも発現が認められ、更に非浸潤性乳管癌ではその発現が保たれているものの、浸潤性乳管癌では発現が減少することが最近報告され、腫瘍の浸潤能獲得に関して鍵を握る分子である可能性が示唆された。Duct から発生する腫瘍という点で膵癌は乳癌に類似しており、Syk に関して同様の変化を認める可能性が考えられたため、過去の手術材料、剖検材料 41 症例を用い膵癌における Syk の発現と浸潤転移の相関を調べる為、免疫組織化学的手法により Syk の発現を原発部の膵、及びリンパ節など転移部分で検討した。更に、膵癌の progression model で早期 (PanIN-1A) に変異の出現する c-Ki-ras の変異の有無を LCM (Laser capture microdissection)、SSCP (single-strand conformation polymorphism) を用いて検討し、後期 (PanIN-3) に変異の出現する p53 の発現を免疫組織化学的に検討した結果を加え、膵癌の浸潤・転移のメカニズムへの関与を比較検討した。

膵腺癌組織では、手術症例 33 例中膵腫瘍本体で免疫組織化学的に Syk の発現低下を示したものは 15 例 (45.5%) 認められた。それらのうち腫瘍中心部で低下がみられたのが 11 例、辺縁部で低下がみられたのが 15 例で、部位としては腫瘍中心よりも腫瘍辺縁での発現低下がやや目立つ傾向にあると考えられた。また 2 症例では腫瘍非浸潤部に Syk の発

現低下を認めないものの、周囲組織に浸潤した腫瘍細胞の部分に Syk の発現低下を認めた。一方、剖検症例では 8 症例中 4 症例 (50.0%) で腭原発部腫瘍細胞に Syk 発現量の低下を認め、転移部で発現低下を示したものは 6 症例 (75.0%) みられた。1 つの転移先で Syk の発現低下を示す症例はほかの転移臓器でも概ね Syk の発現低下を示していた。全 41 症例において原発部で Syk の低下がみられたのが 19 例 (46.3%)、転移を有する 27 症例に限っては原発部で 19 例 (70.4%) に低下がみられた。リンパ節転移部で Syk を評価できなかった 1 症例を除く 40 症例において、原発部あるいは転移部のいずれかで Syk の発現低下がみられる症例で転移を有する率は 62.5% であり、転移を有しない症例の率 5.0% と比較すると Syk の発現低下を示す症例の方が有意に転移能を獲得していると考えられる。また転移を有する 29 症例で原発部と転移部の Syk の発現を比較した結果、両方で Syk の低下を示すものが 13 例 (44.8%)、両方とも Syk の発現低下を示さないものが 5 例 (17.2%) であり、共に低下する症例が多いことが分かった。これらの結果から腭管上皮にも Syk が発現していることが証明され、管外浸潤性腭管癌ではその発現が腭原発部、転移部で有意に低下していることが明らかとなった。また転移先臓器別で Syk の発現低下の差が認められないことから Syk の発現は転移先臓器の環境に影響を受けず、むしろ原発巣での発現の低下により腫瘍増殖能、浸潤能を獲得したものと考えられる。

また手術症例と剖検症例をあわせた全症例中 p53 の過剰発現を示したものは 31 例 (75.6%) であり、その発現量は原発巣および転移先で同様であった。転移先でのみ p53 の過剰発現を示す症例は認められなかった。この結果から p53 の過剰発現あるいは陰性化と転移に相関がみられないことが分かった。

c-Ki ras に関しては、ブロック全体から DNA を抽出した全症例 41 例中 14 例 (34.1%) に SSCP で変異バンドを認め、かつ DNA 配列は全て codon12 で (GGT→GTT) であった。Codon12 で GTT の mutation を有し転移を伴う 10 例中 8 例で転移先に SSCP で同様の変異バンドを検出し、codon12 の GTT への mutation を認めた。また転移先のリンパ節のブロック全体から抽出した DNA には SSCP に変異バンドを認めなかったものの、LCM で抽出した DNA で mutation を検出した症例が 1 例みられた。これらの結果から c-Ki-ras に関してはほとんど全ての症例で原発部および転移部でほぼ同様の変異を有しており、この変異を保持し転移することがわかった。その他 7 症例に関して腫瘍本体を小さな区画に分割し、各々の個所より LCM を用いて腫瘍腺管組織、非腫瘍腺管組織のみを採取した。このうち 3 症例ではブロック全体から抽出した DNA に mutation を認め、LCM で採取した DNA も同様の結果であったが、LCM を用いたほうがゲルで確認される変異バンドがより明瞭になることが明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## 膵癌の浸潤・転移における Syk 発現の解析

申請者は非浸潤性乳管癌と比較し浸潤性乳管癌で発現の低下する事が報告された細胞質チロシンキナーゼ Syk について膵癌の手術材料、剖検材料を用いその発現を免疫組織化学的に評価し、その転移・浸潤能獲得との関連性について検討を行った。また膵癌の progression model で初期に変異が起こる c-Ki-ras Exon1 codon12 と後期に過剰発現および変異が起こる p53 についてもそれぞれ PCR-SSCP(Polymerase chain reaction・Single strand conformation polymorphism)法、免疫組織化学的手法で検討した。

対象となった浸潤性膵管癌 41 症例中 19 例で腫瘍細胞で Syk の発現低下がみられた。また原発部あるいは転移部のいずれかで Syk の発現低下がみられる症例で転移を有する率は 62.5%であり、転移を有しない症例の率 5.0%と比較すると Syk の発現低下を示す症例の方が有意に転移能を獲得しているという結果を示した。Syk の発現低下が生じている剖検症例で、転移先臓器別に Syk の低下の変化についての検討も行ったが、差異がないことがわかった。Syk が非腫瘍膵管、非浸潤性膵管癌、intraductal papillary mucinous tumor ではその発現が保たれていることも幾つかの症例を用い示した。

また c-Ki-ras と p53 についてはそれぞれ全症例の 34%、76%程度に変異あるいは過剰発現がおこることがわかり、これらの分子が原発部と転移部で概ね同じ変化を示していることから、転移に関連する分子とは考えられなかった。また Laser capture microdissection 法を用いることにより癌細胞のみを選択的に抜き取り DNA 抽出を行うと、PCR-SSCP 法を用いた c-Ki-ras の変異バンドを容易に認識できることを示し、この方法の有用性を示した。

公開発表に当たり、副査の吉木教授より、1) Kinase 低下と転移浸潤能とに関する分子機構、2) Syk の上皮細胞での発現状況、3) 腫瘍の Syk 染色性の評価法、4) Syk knock out mouse のデータ、等に関し質問があったが、申請者は1) については膵癌で実際にマトリックスを分解するマトリックスメタロプロテアーゼとの関連が推測されること、2) については消化管上皮を含めたあらゆる上皮細胞に発現があること、3) については Syk の発現が完全に消失する症例が少ないことから評価が困難な症例もあること、4) については血小板の形成不全によりマウスが死亡すると解答した。同じく副査の加藤教授より、1) 膵癌のリンパ管、静脈、神経浸潤と Syk との関連、2) 組織学的分化度との相関、3) 予後との相関、4) 悪性度の指標、5) 臨床への応用、等に関して質問があった。申請者

は1)、3)については標本の再検鏡と患者の追跡調査を行うなど今後の検討を要すること、2)は低分化腫瘍ほど発現が低下する可能性があること、4)については生検された膀胱癌組織での Syk の発現を免疫組織学的あるいは蛋白の定量などで評価することにより良悪性の指標として応用できる可能性があること、5)については遺伝子治療の候補分子の一つと考えられると解答した。また主査の長嶋教授より Syk 減少のメカニズムに関する質問があったが、これについてはリンパ球などの血球系細胞で Syk が果たす役割は徐々に解明されてきているものの、上皮系細胞でのその役割は今までのところ全く研究されていず、上皮細胞で Syk がどのような情報伝達にかかわっているかを含め、今後の研究により解明される必要がある旨解答した。

この論文は、治療困難な癌の一つである膀胱癌の浸潤・転移の機序を解明する手がかりになると考えられ、今後の研究の発展によっては今回検討した Syk も臨床的にも応用されることが期待される。

審査員一同は、これら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十分な資格を有するものと判定した。