

学位論文題名

Increased apoptosis associated with depressed type
of early intestinal gastric cancer

(陥凹型早期腸型胃癌におけるアポトーシス増大の関与)

学位論文内容の要旨

目的：胃癌は肉眼形態から、陥凹型胃癌と隆起型胃癌に大別される。胃癌の肉眼形態を組織型別に検討すると、腸型胃癌 (intestinal type) は隆起型胃癌、陥凹型胃癌のいずれの形態もとりうるが、未分化癌 (diffuse type) は陥凹型胃癌の形態が圧倒的に多い。一方で、隆起型胃癌は早期に血行性転移をきたしやすいことが報告されており、胃癌の肉眼形態の相違は組織学的、生物学的特性を反映している可能性がある。これらの肉眼形態の違いは潰瘍が存在しない早期癌の段階からすでに認められる。しかし、胃癌の肉眼形態の違いを説明するメカニズムはこれまで明らかにされていない。他臓器の癌では腫瘍細胞の増殖と細胞死のバランスによって形態的発育が規定されるという報告がある。一方、細胞死は necrosis と apoptosis に分類されるが、早期癌では necrosis は無視できる程度のもので、細胞死はほぼすべて apoptosis によるものと考えられる。そこで今回我々は、胃癌の肉眼形態と、腫瘍の増殖能および apoptosis の関連性について、また apoptosis 制御因子である Bcl-2 関連蛋白 (Bcl-2 および Bax) との関連性について検討した。

対象と方法：1995年から1997年までに北海道大学医学部附属病院で切除された早期腸型胃癌44例 (男性32名、女性12名、平均年齢58歳、陥凹型胃癌28例、隆起型胃癌16例) を対象とした。未分化癌は極性が明らかでないこと、腫瘍先進部を検討することが困難であること、および隆起型胃癌がほとんどないことより除外した。早期胃癌の定義は、日本胃癌取り扱い規約の定義 (深達度が粘膜層、粘膜下層に限局した胃癌) に準じた。ホルマリン固定、パラフィン包埋標本を使用した。apoptosis は TUNEL 法にて検討し、さらに、細胞増殖能の指標である Ki-67、apoptosis 抑制蛋白である Bcl-2、および apoptosis 誘導蛋白である Bax を免疫組織化学法にて検討した。腫瘍内での各因子の局在を検討するため、全ての検体を内腔側から腫瘍先進部にかけて3領域 (胃内腔領域、中間領域、腫瘍先進部領域) に等分し、それぞれの領域での各因子の比較を行った。計測にはオリンパス社製微量計測用タブレットユニットを

用いた。腫瘍 1000 個における TUNEL 陽性細胞および Ki-67 陽性細胞の比率を apoptosis index (%) および Ki-67 index (%) として算出した。Bcl-2 および Bax については陽性細胞数が 10% 以上の場合を陽性群と判定した。3 領域間の apoptosis index (%) および Ki-67 index (%) の比較は Kruskal-Wallis 法によって、2 領域間の比較については Fisher's PLSD によって検討した。Bcl-2 および Bax の発現頻度は χ^2 検定を用いた。P<0.05 をもって有意差ありと判定した。

結果：検討したすべての早期腸型胃癌において apoptosis に陥った腫瘍細胞が散見された。全 44 症例における apoptosis index (%) の平均は 0.98 ± 1.24 (±SD) であった。肉眼型別および領域別に検討すると、陥凹型胃癌では、apoptosis index (%) は胃内腔領域 (0.76 ± 0.85) に比べ、腫瘍先進部領域において有意に高かった (1.76 ± 2.04 , P<0.05)。また、陥凹型胃癌の腫瘍先進部領域における apoptosis index (%) は、隆起型胃癌の腫瘍先進部領域 (0.63 ± 0.81) における apoptosis index (%) と比較しても有意に高かった (P<0.05)。隆起型胃癌の各領域間には apoptosis index (%) に有意差は無かった。さらに apoptosis 抑制蛋白である Bcl-2 陽性症例は早期腸型胃癌全体の 45.5%、apoptosis 誘導蛋白である Bax 陽性症例は早期腸型胃癌全体の 79.5% に認められた。肉眼型別および領域別に検討すると、Bax 陽性率は全ての領域において陥凹型胃癌の方が隆起型胃癌より有意に高かった。しかし、Bcl-2 陽性率は全ての領域において陥凹型胃癌と隆起型胃癌の間に有意差を認めなかった。さらに腫瘍先進部領域においては、Bax 陽性胃癌は Bax 陰性胃癌に比べ apoptosis index (%) が有意に高かった (P<0.05)。しかし Bcl-2 陽性胃癌と Bcl-2 陰性胃癌の間には apoptosis index (%) に有意差を認めなかった。一方、増殖能の指標である Ki-67 index (%) は陥凹型胃癌と隆起型胃癌の間、各領域間のいずれでも有意差を認めなかった。

考察：早期腸型胃癌においては陥凹型胃癌では、隆起型胃癌に比べて腫瘍先進部領域の apoptosis が多いことが示された。一方で増殖能には両者に差がないため、腫瘍先進部の apoptosis 増加による細胞損失が両者の肉眼形態に関与している可能性が示唆された。本報告は我々の知る限り、胃癌の肉眼形態と apoptosis の関連性を示した初めての報告である。正常の消化管では apoptosis は内腔側に多く、陰窩領域には少ない。陰窩領域は腸管粘膜細胞の増殖域であるため、その部位の apoptosis が少ないことは生理的に合目的である。陥凹型の早期腸型胃癌では、陰窩領域に相当する腫瘍先進部領域に apoptosis が多いことから、細胞損失が極めて異常な部位に起こっていることを示している。陥凹型の早期腸型胃癌で腫瘍先進部の apoptosis が増加している機序については明らかではないが、腫瘍先進部周辺の組織からの免疫学的刺激を受けている可能性が推測される。また今回の検討では、腫瘍先進部領域で Bax の発現と apoptosis との関係が認められた。Bax は G(8) micro satellite instability を有していることから、*Helicobacter pylori* などの刺激によって細胞周期回転が亢進すると障害を受けやすい事が推測されるが、腸型胃癌の発育段階での Bax の役割についてはさらなる検討が必要と考

えられる。

結論：早期腸型胃癌においては、apoptosis 増加による細胞損失の多いことが陥凹型胃癌と隆起型胃癌の肉眼形態の相違に関与している。その機序の一部は、腫瘍先進部領域の Bax の過剰発現によって説明される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

学 位 論 文 題 名

Increased apoptosis associated with depressed type of early intestinal gastric cancer

(陥凹型早期腸型胃癌におけるアポトーシス増大の関与)

早期胃癌肉眼形態は隆起型、陥凹型に大別されるが、その肉眼型を決定する因子は明らかではない。陥凹型胃癌は胃癌の大半を占め、腸型あるいはびまん型の組織型をとるのに比べ、隆起型胃癌はほとんどが腸型であり血行性転移が多いなど、両者には病理組織学的のみならず臨床的にも異なった特徴が認められる。一方で、早期腸型胃癌は隆起型、陥凹型の両極端な肉眼形態を呈しうるが、それぞれの肉眼型への進展のメカニズムについては十分に知られていない。胎生期臓器形成、多臓器腫瘍発育過程では細胞損失、細胞増殖の比によって形態、増大が決定されるという報告がある。Bcl-2、Bax は apoptosis 制御因子として知られているが、近年 *Helicobacter pylori* 感染によりその発現に異常が認められるという報告がある。申請者は早期腸型胃癌 44 例、44 病変（男性 32 例、女性 12 例、隆起型 16 例、陥凹型 28 例）の検体を用い、apoptosis による細胞損失を TUNEL 法を用いて、細胞増殖能を Ki-67 染色を用いて検討した。さらに apoptosis 制御因子である Bax、Bcl-2 の関連を免疫染色にて検討した。各因子の局在を明らかにするため検体を内腔側から腫瘍先進部まで 3 等分し、それぞれの領域で各因子を検討した。判定には正確を期すため微小計測用メジャーユニットを用いた。腫瘍 1000 個あたりの apoptosis 細胞を apoptosis index (%)、増殖能を示す Ki-67 陽性細胞を Ki-67 index (%)として算出した。Bax、Bcl-2 は 10%以上の染色がある場合を陽性と判定した。陥凹型胃癌では、apoptosis index は胃内腔領域 (0.76 ± 0.85 、平均 \pm SD) に比べ、腫瘍先進部領域において有意に高かった (1.76 ± 2.04 、 $P < 0.05$)。また、陥凹型胃癌の腫瘍先進部領域における apoptosis index は、隆起型胃癌の腫瘍先進部領域 (0.63 ± 0.81) における apoptosis index と比較しても有意に高かった ($P < 0.05$)。隆起型胃癌の各領域間には apoptosis index に有意差は無かった。さらに Bcl-2 陽性症例は早期腸型胃癌全体

の 45.5%、Bax 陽性症例は早期腸型胃癌全体の 79.5%に認められた。肉眼型別および領域別に検討すると、Bax 陽性率は全ての領域において陥凹型胃癌の方が隆起型胃癌より有意に高かった。しかし、Bcl-2 陽性率は全ての領域において陥凹型胃癌と隆起型胃癌の間に有意差を認めなかった。さらに腫瘍先進部領域において、Bax 陽性胃癌は Bax 陰性胃癌に比べ apoptosis index が有意に高く ($P<0.05$)、胃癌 apoptosis と Bax との相関が示唆された。しかし Bcl-2 陽性胃癌と Bcl-2 陰性胃癌の間には apoptosis index に有意差を認めなかった。一方、増殖能の指標である Ki-67 index は陥凹型胃癌と隆起型胃癌の間、各領域間のいずれでも有意差を認めなかった。以上の結果より、早期腸型胃癌における肉眼形態形成には腫瘍先進部領域の apoptosis 増大が関与している可能性が示唆された。また、その apoptosis の発現には Bax の過剰発現との相関が示唆された。

発表後、副査長嶋教授から、腫瘍先進部に apoptosis が多い機序について質問があった。申請者は最近の胃癌 apoptosis における樹状細胞の関与の報告をあげ、免疫学的防御機構が考えられると回答した。更に apoptosis のメカニズムについての質問があったが、未発表データより p53 非依存経路によると回答した。副査秋田教授から、同一腫瘍内での apoptosis、Bax の分布についての質疑があったが、分布に極端なばらつきはなかったと回答した。また、形態の差異を説明する apoptosis 以外の機序についての質疑に対し、接着、遊走因子、浸潤能の違いが考えられると回答した。副査西村教授より胃潰瘍でも apoptosis は亢進するのではとの質疑があったが、胃潰瘍の細胞損失は necrosis が主体であり、更に内腔側より先進部に細胞死が多い点について回答した。最後に主査浅香教授よりびまん型胃癌、あるいは進行癌における肉眼型と apoptosis の関連性について質疑があった。未発表データではびまん型胃癌でも同様の結果が得られたがその関与は腸型胃癌より小さく、進行癌の場合は apoptosis の局在は失われていたと回答した。さらに apoptosis の陽性細胞が Bax 陽性細胞に比べて少ないのではないかと質疑があったが、TUNEL 法では apoptosis 直前の細胞のみを検出するのでそのような違いが生じると回答した。また、統計学的な妥当性について質疑があったが、データが下に凸の非正規分布しているため non-parametric 検定を用い、十分な信憑性があると回答した。

本論文は、消化管腫瘍形態学の見地から、早期胃癌肉眼形態と apoptosis の関係、及び Bax の関与についての初めての報告である。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。