



大腸腫瘍の形態とアポトーシス関連因子に関する検討

佐野, 寧

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Date of Publication)

2012-07-24

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2145

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3173084>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002145>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	佐野寧 ^{やすし} （兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1288号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成12年3月31日
学位論文題目	大腸腫瘍の形態とアポトーシス関連遺伝子に関する検討

審査委員	主査 教授 前田 盛
	教授 春日 雅人 教授 黒田 嘉和

論文内容の要旨

【背景および目的】

近年、腫瘍内のアポトーシスの出現頻度と予後の関係、抗癌剤や NSAIDs 製剤投与によるアポトーシス誘導の機構が報告され治療にも応用できる可能性が示されている。進行大腸癌の発育経路として隆起型由来（adenoma-carcinoma sequence）と平坦陥凹型癌由来（de novo 発癌）があることが明らかになってきたが、大腸腫瘍の隆起・陥凹といった形態にアポトーシスが影響をおよぼしているどうかは興味深い。そこで本研究では、アポトーシス関連因子である p53, bcl-2 遺伝子の蛋白発現とアポトーシスの出現頻度が、形態の異なる大腸腫瘍で発現・出現様式を異にするかを明らかにすることを目的とした。

【対象】

1990年4月から1996年10月までに神戸大学附属病院、東京女子医科大学消化器病センターおよび獨協医科大学で、内視鏡的切除あるいは手術にて摘出された Depressed（以下 D）type の粘膜下浸潤癌（以下 sm）9 症例、Polypoid（以下 P）type の sm 癌 21 症例、粘膜内癌（以下 m）11 症例、腺腫内癌 10 症例、腺腫 8 症例、計 59 症例を対象とした。性差は男性 42 症例、女性 17 症例、年齢は 23～86 歳、平均 63.5 歳である。

【方法】

免疫組織学的に p53, bcl-2 遺伝子蛋白の発現と TUNEL 法（terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling assay, Apoptag in situ apoptosis detection kit, Oncor）によるアポトーシス細胞の出現率について検討した。p53, bcl-2 染色の評価はそれぞれ三段階に評価し、TUNEL 法の評価は 200 倍鏡検で任意の腫瘍細胞 500 個あたりのアポトーシス細胞の出現率を算出し、最大百分率を TUNEL 法の apoptosis-labeling index（ALI）とした。また、これらの染色性や標識率の評価は連続標本における同一部位間での比較を行った。

【結果】

1. 大腸腺腫と P-,D-type 早期大腸癌における p53 蛋白発現率および bcl-2 蛋白発現率について。

腺腫18病変中1病変 (5.6%), P-type42病変中24病変 (55.6%), D-type 9 病変中5 病変 (57.1%) に p53 蛋白過剰発現を認めた。腺腫の p53 蛋白過剰発現率は P-,D-type 早期大腸癌と比較して発現率が低率であった ($p < 0.01$)。一方, 腺腫18病変中病変(100%), P-type40病変中32病変 (80.0%), D-type 8 病変中1 病変 (12.5%) に bcl-2 蛋白発現を認めた。D-type 早期癌の bcl-2 蛋白の発現は腺腫, P-type 早期癌と比較して低頻度であった ($p < 0.01$)。

2. 大腸腺腫および P-,D-type 早期大腸癌における ALI について。

TUNEL 法により算出した ALI は腺腫 4.12 ± 2.65 (mean \pm SD), D-type 1.31 ± 0.39 , P-type 1.73 ± 1.54 であった。P-,D-type 早期大腸癌と比較して腺腫でアポトーシス細胞が高頻度に認められたが, ($p < 0.05$), P-,D-type 間に有意差は認めなかった。

3. 大腸腺腫と P-,D-type 早期大腸癌における p53 蛋白, bcl-2 蛋白の染色性と ALI について。

p53 蛋白の染色性と ALI は, negative 群 3.17 ± 2.50 (mean \pm SD), focal or multifocal 群 1.78 ± 1.60 , diffuse 群 1.43 ± 1.30 で, diffuse 群は negative 群と比較し ALI が低率であった。 ($p < 0.05$)。一方, bcl-2 蛋白の染色性と ALI は, none 群 1.93 ± 1.55 (mean \pm SD) weak 群, 2.27 ± 2.35 , strong 群 3.15 ± 2.21 で, weak 群は strong 群と比較し ALI が低率であった ($p < 0.05$)。また, P-type sm 癌の19病変中 (not informative; NI=2) 9 病変 (47.4%) に none から weak までの染色性の heterogeneity が認められた。

【考察および結論】

大腸腺腫と早期大腸癌を P-,D-type に二分し, 各群における p53, bcl-2 の蛋白発現とアポトーシス細胞の出現頻度について検討し以下の結論を得た。

1) 早期大腸癌において陥凹型と隆起型とでアポトーシスの出現頻度に差は認められなかった。このことは浸潤癌が陥凹するか隆起するかはアポトーシスの出現頻度には関係がないという結果と理解され, アポトーシスが形に影響を与えるのはあくまで初期病変のみかもしれず, 腫瘍の懐死・脱落といった二次的な影響も考慮する必要があると考えられた

2) p53 蛋白過剰発現と ALI の間に負の相関関係があり, 腺腫では早期大腸癌と比較し有意にアポトーシスの出現頻度が高率で, 野生型 p53 依存性アポトーシスの経路が関与している可能性が示唆された。すなわち, 腺腫はアポトーシスを介し可逆性に腫瘍数や形態を変化し得る可能性があると考えられる。しかし, 陥凹型腺腫の p53 蛋白過剰発現が高率であるという報告もあり, 粘膜内病変の病理組織診断の基準も含め陥凹型腺腫に関してはさらに検討が必要であろう。

3) D-type 早期癌の bcl-2 蛋白の発現 (発現率12.5%) は腺腫, P-type 早期癌と比較して有意に低頻度であった。近年, 活性化 *ras* が bcl-2 蛋白の発現を介してアポトーシスを調節している可能性が報告されており, *k-ras* の点突然変異が低頻度であるとされる D-type 癌の bcl-2 蛋白の発現が低率であったことは興味深い, bcl-2 蛋白の発現は腺腫からの癌化に関与すると考えられており, 初期より bcl-2 蛋白の発現が低率である D-type 癌は腺腫, P-type 癌とは異なる遺伝子変異様式を経る可能性が考慮された。

論文審査の結果の要旨

近年, 腫瘍内のアポトーシスの出現頻度と予後の関係, 抗癌剤や NSAIDs 製剤投与によるアポトーシス誘導の機構が報告され治療にも応用できる可能性が示されている。進行大腸癌の発育経路として

隆起由来 (adenoma-carcinoma sequence) と平坦陥凹型癌由来 (de novo 発癌) があることが明らかになってきたが、大腸腫瘍の隆起・陥凹といった形態にアポトーシスが影響をおよぼしているどうかは興味深い。本研究では、アポトーシス関連因子である p53, bcl-2 遺伝子の蛋白発現とアポトーシスの出現頻度が、形態の異なる大腸腫瘍で発現・出現様式を異にするかを明らかにすることを目的とした。

【対象】

1990年4月から1996年10月までに神戸大学付属病院、東京女子医科大学消化器病センターおよび獨協医科大学で、内視鏡的切除あるいは手術にて摘出された Depressed (以下 D) type の sm 癌 9 症例, polypoid (以下 P) type の sm 癌 21 症例, m 癌 11 症例, 腺腫内癌 10 症例, 腺腫 8 症例, 計 59 症例を対象とした。性差は男性 42 例, 女性 17 例, 年齢は 23~86 歳, 平均 63.5 歳である。

【方法】

免疫組織学的に p53, bcl-2 遺伝子蛋白の発現と TUNEL 法 (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling assay, Apoptag in situ apoptosis detection kit, Oncor) によるアポトーシス細胞の出現率について検討した。p53, bcl-2 染色の評価はそれぞれ三段階に評価し, TUNEL 法の評価は 200 倍鏡検で任意の腫瘍細胞 500 個あたりのアポトーシス細胞の出現率を算出し, 最大百分率を TUNEL 法の apoptosis-labeling index (ALI) とした。また, これらの染色性や標識率の評価は連続標本における同一部位間での比較を行った。

【結果】

1. p53 蛋白発現率および bcl-2 蛋白発現率について。

腺腫 18 病変中 1 病変 (5.6%), P-type 42 病変中 24 病変 (55.6%), D-type 9 病変中 5 病変 (57.1%) に p53 蛋白過剰発現を認めた。腺腫の p53 蛋白過剰発現率は p, D-type 早期大腸癌と比較して発現率が低率であった ($p < 0.01$)。一方, 腺腫 18 病変中 18 病変 (100%), P-type 40 病変中 32 病変 (80.0%), D-type 8 病変中 1 病変 (12.5%) に bcl-2 蛋白発現を認めた。D-type 早期癌の bcl-2 蛋白の発現は腺腫, P-type 早期癌と比較して低頻度であった ($p < 0.01$)。

2. 大腸腺腫および P, D-type 早期大腸癌における ALI について。

TUNEL 法により算出した ALI は腺腫 4.12 ± 2.65 (mean \pm SD), D-type 1.31 ± 0.39 , P-type 1.73 ± 1.54 であった。D-type, P-type 早期大腸癌と比較して腺腫でアポトーシス細胞が高頻度に認められたが ($p < 0.05$), D-type, P-type 間に有意差は認めなかった。

3. p53 蛋白, bcl-2 蛋白の染色性と ALI について。

p53 蛋白の染色性と ALI は, negative 群 3.17 ± 2.50 (mean \pm SD), focal or multifocal 群 1.78 ± 1.60 , diffuse 群 1.43 ± 1.30 で, diffuse 群は negative 群と比較し ALI が低率であった ($p < 0.05$)。一方, bcl-2 蛋白の染色性と ALI は, none 群 1.93 ± 1.55 (mean \pm SD), weak 群 2.27 ± 2.35 , strong 群 3.15 ± 2.21 で, weak 群は strong 群と比較し ALI が低率であった。 ($p < 0.05$)。また, P-type sm 癌の 19 病変中 (not informative; NI = 2) 9 病変 (47.4%) に none から weak までの染色性の heterogeneity が認められた。

【考察および結論】

1) 早期大腸癌において陥凹型と隆起型とでアポトーシスの出現頻度に差は認められなかった。このことは浸潤癌が陥凹するか隆起するかはアポトーシスの出現頻度には関係がないという結果と理解され, アポトーシスが形に影響を与えるのはあくまで初期病変のみかもしれず, 腫瘍の壊死・脱落といった二次的な影響も考慮する必要があると考えられた。

2) p53 蛋白過剰発現と ALI の間に負の相関関係があり腺腫では早期大腸癌と比較し有意にアポト-

シスの出現頻度が高率で、野生型 p53 依存性アポトーシスの経路が関与している可能性が示唆された。腺腫はアポトーシスを介し可逆性に腫瘍数や形態を変化しえる可能性があるとして推測される。しかし、陥凹型腺腫の p53 蛋白過剰発現が高率であるという報告もあり、粘膜内病変の病理組織診断の基準も含め陥凹型腺腫に関してはさらに検討が必要であろう。

3) D-type 早期癌の bcl-2 蛋白の発現 (発現率 12.5%) は腺腫、P-type 早期癌と比較して有意に低頻度であった。近年、活性化 *ras* が bcl-2 蛋白の発現を介してアポトーシスを調節している可能性が報告されており、*K-ras* の点突然変異が低頻度であるとされる D-type 癌の bcl-2 蛋白の発現が低率であったことは興味深い。bcl-2 蛋白の発現は腺腫からの癌化に関与すると考えられており、初期より bcl-2 蛋白の発現が低率である D-type 癌は腺腫、P-type 癌とは異なる遺伝子変異様式を経る可能性が考慮された。

以上、本研究は、大腸腫瘍の二種類の発癌過程について、その関与遺伝子の役割を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったアポトーシス関連因子発癌過程に及ぼす役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。