

|         |  |       |       |
|---------|--|-------|-------|
| 氏名(本籍)  | 田村 祐樹 (大阪府)  |       |       |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |       |       |
| 学位記番号   | 博士(論) 第300号  |       |       |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当   |       |       |
| 学位授与年月日 | 平成14年12月11日  |       |       |
| 学位論文題目  | Clonal Analysis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma with Intraepithelial Components<br>(表層伸展部を伴った食道扁平上皮癌のクローン解析) |       |       |
|         | 審査委員   | 主査 教授 | 岡部 英俊 |
|         |  | 副査 教授 | 木村 博  |
|         |  | 副査 教授 | 瀬戸 昭  |

## 論文内容要旨

### 【目的】

食道扁平上皮癌では病変に隣接してまた周辺に上皮内癌や前癌病変を伴うことが多い。これは上位の呼吸器・消化管において認められるField cancerization theoryを示唆する状況である。本研究では、病変内および病変間のクローン性を検討し、食道扁平上皮癌を中心として食道病変のクローン性を明かにするとともに、病変間のクローン性から食道扁平上皮癌における発ガンの経緯、癌の進展を考察する。

### 【方法】

材料：恵佑会札幌病院にて手術切除を受けた食道扁平上皮癌のうち女性12例を対象とした。切除後、癌及び非癌部の一部を凍結標本として保存。さらに、10例は標本全体を4%パラホルムアルデヒド液に4℃15時間、その後70%エタノール液に4℃2日間浸し固定。固定後標本は全割しパラフィン包埋した。病理診断の上、癌浸潤部、上皮内癌部、隣接非癌部そして正常粘膜部から組織を顕微鏡下に採取した。DNAはQIAamp tissue kitを用いて抽出した。

方法：抽出サンプルのクローン性の検討には、ヒトアンドロゲンレセプター遺伝子メチル化法(HUMARA)を用いた。X染色体上のヒトアンドロゲンレセプター遺伝子上には、CAG繰り返し配列が存在し、父型か母型かによりCAGリピート数が異なるヘテロ接合が多い。X染色体の一本はメチル化によりランダムに不活化されており、X染色体不活化のパターンから採取組織のクローン性を検討する。抽出DNAを制限酵素Hpa IIで処理後PCRを施行すると不活化X染色体側のみテンプレートとなり増幅される。Hpa IIで処理、未処理のDNAを用いてPCRを施行し、その産物を比較してクローン性を検討する。PCR産物は定性的に6%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し銀染色を用いて評価、定量的にgenetic analyzer (ABI PRISM 310)を用いてモノクローナル成分の含有量を測定し、モノクローン性を評価した。各サンプルのモノクローン性は同一起源の細胞が80%以上含まれるものとした。

### 【結果】

女性食道扁平上皮癌12例は進行癌10例と早期癌でかつ表層拡大型を呈す2例であった。表層伸展部は6例に認められた。HUMARAにて検索した結果、ヘテロ接合の8症例について各組織におけるクローン性を検討した。8症例とも正常粘膜部はポリクローン性を示し、癌巣では浸潤部および表層伸展部ともにモノクローン性を示した。浸潤部内および表層伸展部内各々においてX染色体不活化パターンの比較は複数部で同一であった。浸潤部と表層伸展部間の比較においては、表層伸展部を付随する6例の内5例は病巣間で同一の不活化パターンを示し、1例は異なっていた。一方、

癌病巣に隣接する非癌部のクローン性はbasal cell hyperplasiaで8カ所、dysplasiaで3カ所がモノクローン性を示した。そのうち、前者で2カ所、後方で1カ所が隣接する癌巣と異なる不活化パターンを示した。

#### 【考 察】

ヒトがもつ生来のマーカー、X染色体不活化を利用したHUMARAを用いて食道扁平上皮癌のクローン性を検討した。細胞分裂や病変の変化に左右されずその性質は継代していく利点を持つ。後天的な遺伝子異常の影響を受けないため、病巣内、病変間での検討にも適すると考える。

病巣は浸潤部内だけではなく表層伸展部との関係においても1例をのぞいてはモノクローン性を示している。Field cancerization theoryからはマルチクローンと予想される表層拡大型の症例でもモノクローン性が認められたことの意義は大きい。一方、隣接する非癌部でbasal cell hyperplasia、dysplasiaがモノクローン性を示したことは、腫瘍性変化を示唆し、前癌病変として認識された。さらに、隣接する癌巣とのクローン性が2例ずつ同一、非同一性がみられ、非癌部まで検討するとマルチクローン性の頻度が上がる。食道扁平上皮癌では病変に隣接している前癌病変まで含めるとField cancerization theoryが相当すると考えられる。癌病巣が浸潤・進展すると表層拡大型を含めてモノクローンを構成が優位となっているが、隣接非癌部を含めたクローン性の検討から初期段階ではマルチクローン性の時期があることが示唆された。その後、癌の進展経過において一部のクローンが増殖して優位なクローンに成立していくと推察された。

今後の課題として、発癌や癌の進展において重要な役割を示す遺伝子変化をとらえるためには、モノクローン性で起源を同じくする病変間、例えば、前癌病変、上皮内癌そして浸潤癌部での遺伝子異常の検討が重要であると考えられる。

#### 【結 論】

今回検討した食道扁平上皮癌は表層拡大型を含めてモノクローンを構成が優位であった。しかしながら、食道扁平上皮癌は異クローン性の表層伸展部やモノクローン性前癌病変を複数伴っていることがあり、癌の進展に際してはモノクローン性の生長に先立ってマルチクローン性の生長の時期があることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、食道扁平上皮癌及び食道病変クローン解析から、病変及び病変間のクローン性を検討し、食道扁平上皮癌の発生・進展を考察したものである。

ヒトアンドロゲンレセプター遺伝子メチル化法を用い、癌浸潤部、表層伸展部、隣接非癌部のクローン性を検討した。多発病変の癒合と考えられていた表層拡大型を含む食道扁平上皮癌の大半がモノクローン性であることを示唆した。その一方、癌浸潤部と表層伸展部が異なるクローン性を示すマルチクローナルな癌巣、及び癌巣とは異なるクローン性を示す隣接非癌部を有する症例を示した。以上より、食道扁平上皮癌発生初期には複数のクローンが混在するが、癌の進展過程では一つのクローン性が生長し他のクローンを凌駕していくと推察している。

これらの成果は、食道扁平上皮癌の発生・進展に関する研究を進めるうえで、寄与すること大であり、博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

尚、本学位授与申請者は、平成14年11月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。