

平成11年度厚生科学研究費補助金
がん克服新10か年戦略研究事業

がんの浸潤・転移に関する病理学的及び
分子生物学的研究

(分野2 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究)

研究報告書

平成12年3月

主任研究者 原田昌興
(神奈川県立がんセンター臨床研究所)

目 次

1. がんの浸潤・転移に関する病理学的及び分子生物学的研究
平成 11 年度 総括研究報告書 ----- 原 田 昌 興 1
2. 前立腺癌の増殖浸潤・転移並びに再燃の病理学的研究
平成 9～11 年度 分担研究報告書 ----- 原 田 昌 興 7
3. がんの進展過程における遺伝子不安定性に関する研究
平成 9～11 年度 分担研究報告書 ----- 松 隈 章 一 14
4. 細胞基質間接着による増殖制御に関する研究
平成 9～11 年度 分担研究報告書 ----- 高 橋 和 秀 17
5. がん細胞の分化/ アポトーシス抵抗性とカスパーゼの発現異常
平成 9～11 年度 分担研究報告書 ----- 菊 地 慶 司 20
6. がんの浸潤・転移に関する病理学的及び分子生物学的研究
平成 9～11 年度 総合研究報告書 ----- 原 田 昌 興 25

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

総括研究報告書

分野 2： 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究

研究テーマ がんの浸潤・転移に関する病理学的及び分子生物学的研究

主任研究者 原田昌興（神奈川県立がんセンター臨床研究所長）

研究要旨 前立腺がん、乳がん等ホルモン依存性がんを視点に据え、浸潤転移性ヒトがんの特性、悪性化進展過程に関わる要因・分子機構を病理学的並びに分子生物学的に解析し、個々症例における的確な診断・予後指標、難治性がんに対する新たな制御方策の開発に資する知見の集積を目指し研究を行った。前立腺癌個々例は多様な組織構成を示し、神経内分泌細胞、PTHrP 陽性例はともに髄様・索状増殖要素の組織内構成率が高率で、高増殖活性、予後不良傾向を示し、PTHrP 発現は骨転移と関連すること、髄様・索状要素の予後規定因子としての重要性を明らかにした。高率なマイクロサテライト異常を示す胃癌では、しばしば TGFβRII, hMSH3 遺伝子などの複合フレームシフト変異を認めるが、その変異態様は同一症例の部位、組織型により相違することを見出した。前立腺癌、胃癌など多くのヒトがん細胞系ではしばしばカスパーゼ 1 及び 4 の発現減弱・消失を認め、乳癌 MCF-7 ではカスパーゼ 3 も消失し、カスパーゼ失調とがん細胞のアポトーシス抵抗性との関連が示唆された。MCF-7 は非基質依存性増殖能を示し、この増殖には基質接着時とは異なる DNA 合成系の活性化が関与している可能性を示唆する知見を得た。

分担研究者

原田昌興 神奈川県立がんセンター臨床研究所 所長

松隈章一 神奈川県立がんセンター臨床研究所

主任研究員

菊地慶司 神奈川県立がんセンター臨床研究所

主任研究員

高橋和秀 神奈川県立がんセンター臨床研究所

専門研究員

A. 研究目的

ヒトがんにおける浸潤・転移性がんの動的病態を知るためには、実際の臨床例の病理学的解析は不可欠である。代表的なホルモン依存性がんである前立腺がん、乳がんは欧米においては

前から発生率、死亡率ともにきわめて高く、その克服は重要な課題とされている。進行性前立腺がん個々症例の臨床経過は同一分化度、同一病期症例でも一様ではなく、治療反応性あるいは再燃予知に関わる的確な指標の確立が望まれている。また、前立腺がん死の主要要因である骨転移の機構についても不明な点が多々ある。がんの多段階進行過程ではマイクロサテライト不安定性も関与すると想定され、近年ヒトがんにおけるミスマッチ修復遺伝子異常によると想定されるがん関連遺伝子蛋白コード領域のフレームシフト型変異の存在が知られてきた。ヒトがんにおけるマイクロサテライト変異とがん関連遺伝子変異の関連を解析することは、がんの

浸潤・転移性獲得過程での遺伝子不安定性の実態を知る上で重要であるのみでなく、再発予知の指標あるいは新たながん制御法開発の道筋にも寄与するものと考えられる。がん細胞の浸潤・転移性と接着分子機構特にカドヘリン・カテニン系の異常との関連が解明されつつあるが、上皮系がん細胞における細胞基質接着分子の動態と細胞増殖シグナル伝達系との関連についての知見は未だ乏しい。また、がんの進展過程には細胞死の抑制、アポトーシス抵抗性獲得も関与していると想定されるが、ヒトがんにおけるアポトーシス過程に重要なカスパーゼの発現動態と悪性化進展との関連は未知の部分が少なく、その分子機構を解明することは新たながん転移抑制法開発への展開も期待される。本研究は、前立腺がん、乳がん等ホルモン依存性がんを視점에据え、浸潤転移性ヒトがんの特性、悪性化進展過程に関わる要因・分子機構を病理学的並びに分子生物学的に解析し、個々症例における的確な診断・予後指標を明らかにし、難治性がんに対する新たな制御方策の開発に資する知見の集積を目的とする。

B. 研究方法

(1) 前立腺癌における神経内分泌細胞出現及びPTHrP発現に関する研究

前立腺癌個々症例の浸潤・転移性に関わる的確な診断指標を得るために、66例の前立腺癌症例における診断時生検組織材料を用い、クロモグラニンA (ChrA)、ニューロン特異エノラーゼ (NSE)、bonbesinなどを指標とする神経内分泌性細胞の出現および副甲状腺ホルモン関連蛋白・PTHrP発現を組織化学的に検出し、組織分化度、WHO組織型構成率および進行度等との関連、予後指標としての意義について検討した。

(2) 胃癌臨床例におけるマイクロサテライト不安定性 (MSI) に関する研究

ヒト胃癌40例の臨床外科材料を用い、各例のがん及び非がん部組織よりそれぞれDNAを抽出し、8染色体の13遺伝子座のマーカーによるマイクロサテライト変異 (MSI) の有無およびミスマッチ修復遺伝子 hMSH3、がん関連遺伝子 BAX、TGFβRII の単純塩基繰り返し配列の変異をPCR法により検出、塩基配列決定による変異様式についての解析を行うとともに組織型との関連を検討した。

(3) ヒトがん由来細胞系におけるカスパーゼ発現とアポトーシス抵抗性に関する研究

ヒトがん進展過程における細胞死抵抗性獲得の実態を解析するために、前立腺癌4株 (LNCaP, PC-3, DU-145, TSU-P1)、胃癌4株 (STKM1, STKM2, MKN28, MKN45)、子宮頸癌3株 (C33A, SiHa, Caski)、乳癌1株 (MCF-7) のヒトがん由来細胞系を用いて、カスパーゼ1, 4, 3, 7の発現動態をRT-PCR法およびウエスタン分析により解析検討し、併せてアノイキス抵抗性、抗がん剤処理に対する反応性等との関連について検討した。

(4) 非足場依存性増殖における増殖シグナル伝達に関する研究

がん細胞の特性の一つである非足場依存性増殖における接着分子動態と増殖シグナル伝達経路の関連を解析するために、乳癌細胞MCF-7及び正常乳腺上皮細胞系を用い、基質接着増殖時と浮遊培養時のIGF-1刺激により活性化されるDNA合成系について、各種酵素阻害剤、特異抗体を用いたウエスタン分析、免疫沈降蛋白による酵素基質のリン酸化活性の測定等により解析した。

(倫理面への配慮)

臨床材料による検索は、神奈川県立がんセンター病院検査科に提出された病理組織材料を用いて行ったものであるが、検索に当たっては特

に患者個人を識別することなく結果の解析を行い、個人のプライバシーの侵害、差別化などに関わるものではないと考える。細胞系などによる検索は、市販されている系ないし供与者の了解のもとに使用したもので倫理面での問題はなないと判断した。

C. 研究結果

(1) 前立腺癌における神経内分泌細胞出現及びPTHrP発現に関する研究

前立腺癌臨床例の診断時組織において、NSE、ChrA などいずれかの指標により5%以上のがん細胞が陽性を呈する例を神経内分泌細胞(NEC)陽性と判定した結果、陽性例は13/42例・31%であった。NECの出現は多くは少数散在性であり、癌巣内びまん性のNECを示す症例はみられなかった。NEC陽性例では組織学的に高異型度の充実・索状組織要素の構成率が高率、Ki-67標識率・増殖周期細胞率も有意に高く、内分泌療法後の予後が有意に不良などの特徴を示すことを見出した。また、PTHrPの発現は44/66例・68%に認められ、うち17例は高発現を示し、陽性例の71%は診断時すでに骨転移陽性(Stage D2)、逆にD2の25/29例・86%にPTHrP発現を認め、PTHrP発現と悪性化進展、骨転移との関連が示唆された。また、診断時生検組織における低分化の髄様・索状要素の構成率のみにより0%、1-20%、21%以上に群別した症例の内分泌療法後の予後は有意に異なっていた。

(2) 胃癌臨床例におけるマイクロサテライト不安定性(MSI)に関する研究

ヒト胃癌臨床例において15/40・38%にマイクロサテライト異常が検出され、そのうち50%以上の高率なMSIを示す5症例・13%においては、同時にBax, TGFβRII, hMSH3 遺伝子の複合フレームシフト型変異が検出された。TGFβRII とhMSH3 遺伝子の複合変異の検出された1例にお

いて、癌巣の12箇所の異なる部位の組織からDNAを抽出してMSIを検索した結果、組織学的に中分化管状腺管癌 tub2 型を示す大半の部分ではTGFβRIIの異常のみが検出され、低分化腺癌 por1 型の部分からはhMSH3の変異のみが検出され、TGFβRIIには変異を認めなかった。

(3) ヒトがん由来細胞系におけるカスパーゼ発現とアポトーシス抵抗性に関する研究

多くの転移巣由来ヒトがん細胞系は基質接着喪失状態でもアポトーシス(アノイキス)抵抗性を示し、検索細胞株のうち胃癌2/4株、前立腺癌2/4株、子宮頸癌1/3株及び乳癌においてカスパーゼ1および4の発現減弱ないし消失が認められ、カスパーゼ1は前立腺癌の他の2株でも消失していた。また、乳癌細胞MCF-7ではカスパーゼ3の消失も見出され、抗がん剤ないしアポトーシス誘導剤スタウロスポリン処理によりアポトーシスとは異なる50kb単位のDNA断片化が観察された。このDNA断片化はカスパーゼ3の阻害剤、セリンプロテアーゼ阻害剤のいずれによっても抑制された。

(4) 非足場依存性増殖における増殖シグナル伝達に関する研究

このアノイキス抵抗性を示す乳がん細胞MCF-7における、増殖因子IGF-1刺激によるDNA合成シグナル伝達経路を解析した結果、非基質依存性増殖状態・浮遊培養下のMCF-7では基質接着増殖時には認められないRaf1-MEK-ERK系の活性化が認められ、この各キナーゼ活性はPI3KあるいはMEKの阻害剤により阻害された。この結果から非足場依存性増殖能を有するがん細胞では正常細胞ないし基質接着増殖がん細胞の主要増殖カスケードであるPI3K-PKB/Aktの系に加えて、Raf-1, MEKの活性化を介するERKの活性化によるシグナル伝達により増殖有利状態を獲得している可能性が示唆された。

D. 考察

前立腺癌は近年本邦でも人口の高齢化と共に増加傾向著しく、その制御が緊要な課題となっている。これまでの研究から前立腺臨床癌個々例は通常多様な組織構成を示し、各組織型とアンドロゲン依存性、増殖能などには相関の見られることを明らかにしてきた。前立腺には分泌腺上皮に介在して少数の神経内分泌性細胞の存在することが古くから知られているが、近年前立腺癌における神経内分泌細胞の意義について様々な議論がなされている。そこで今年度は前立腺癌に出現する神経内分泌細胞（NEC）に焦点を当て研究を行った。NECは傍分泌的に増殖因子を分泌している可能性が指摘されているが、実際にNEC陽性例では有意に増殖周期細胞率が高率であったことはこの仮説を支持する結果と考えられる。また、同一分化度症例においてもNEC陽性例は予後不良との結果は予後指標としてのNEC検索の有用性を示唆する知見と考えられる。また、PTHrP発現と骨転移との関連については、乳癌においても認められており、前立腺癌、乳癌はとも高率に骨転移を示し、PTHrP発現前立腺癌細胞の骨基質との関わり、骨組織への親和性に何らかの役割を演じている可能性が示唆され、今後の重要な検討課題となる。NECあるいはPTHrP陽性例ではともに低分化の髄様・索状要素の組織内構成率が高く、これらの組織要素はアンドロゲン非依存性の高増殖能を示すことから、悪性化進展過程での髄様・索状組織要素の重要性を追認する結果と考えられる。実際に、髄様・索状組織要素の構成率のみで群別した症例の内分泌療法後の予後が有意に異なっていたとの結果は、前立腺癌個々症例の予後は優勢組織型よりも劣勢な組織要素であっても様々な悪性形質の蓄積した組織要素である髄様・索状組織要素の構成率で規定されていることを示唆するもので、今後の的確な悪性度診

断基準の策定に重要な示唆を与える結果と考えられる。

高率なマイクロサテライト不安定性（MSI）を示す胃癌症例において、がん関連遺伝子のフレームシフト型変異の併存していたことは、大腸癌、前立腺癌と同様胃癌進展過程にもMSI、ミスマッチ修復異常が関与する場合のあることを示唆する重要な結果と考えられる。特に一遺伝子の異常ではなく複数の遺伝子に変異が認められたことから、検索した以外のがん関連遺伝子にもフレームシフト変異の生じている可能性もあり、今後この様MSIに伴う遺伝子異常を示すがんの実態、特性を明らかにする必要がある。また、このがん関連遺伝子の変異態様は一様ではなく、同一症例内で部位、組織型により変異遺伝子が異なる例が存在した事実は、前立腺癌における組織学的多様性と同様多くのヒトがんはその進展過程において生物学的性状の異なる不均一な組織構成へと転換する可能性を示唆する重要な知見と考えられる。従って、今後がんの性状についての分子生物学的な解析に際しては、詳細な病理組織像などとの対応のもとに検討することが必要と考えられる。

前立腺癌、胃癌ほか多くのヒトがん細胞系においてカスパーゼ1および4の発現減弱ないし消失の認められたことは、検索がん細胞系はいずれも転移巣より樹立されればしばしばアノイキス抵抗性を示す細胞系であることを考慮すると、カスパーゼ失調のがん細胞における細胞死抵抗性獲得機構との関連のみならず、転移性にも関与している可能性が示唆される。胸水由来の乳癌細胞MCF-7においてはアポトーシス誘導に中心的役割を担うカスパーゼ3の消失も認められ、カスパーゼ1はカスパーゼ3の活性化に関与する可能性、あるいはIL-1 β 、IL-18前駆体の成熟型への転換能を介してFasLの発現誘導活性化の可能性があること、さらにカスパーゼ4がカ

スパーゼ 1 の活性化に関与すると推測されていること等からも、がん細胞の悪性化進展とカスパーゼ群失調の関連が強く示唆される。また、MCF-7 では抗がん剤ないしアポトーシス誘導剤スタウロスポリンにより 50kb の DNA 断片化が誘導され、この断片化がカスパーゼ 3 ないしセリンプロテアーゼ阻害剤で阻害されたことから、細胞死の過程にはアポトーシスすなわちヌクレオゾーム単位の DNA 断片化とは異なる経路の存在も示唆される。

がん細胞の特性の一つである非基質依存性増殖能に関連して、乳癌 MCF-7 細胞では IGF-1 刺激によって基質接着増殖時とは異なる Raf1-MEK-ERK の DNA 合成系が活性化されていたとの結果は、IGF-1 刺激による PI3K-PKB/Akt の DNA 合成系と Raf1-MEK-ERK の系には何等かのクロストークが存在する可能性を示唆するものと考えられる。今後、細胞基質間接着分子動態と接着分子のシグナル伝達系におけるこれら DNA 合成系の相互作用の解析はがん細胞の増殖特性を解明する糸口となるものと考えられる。

これらの研究結果から、ヒトがん個々症例はしばしば発現形質、遺伝子変異態様の異なる組織要素の混在からなり、患者病態、予後予測には組織像に対応した遺伝子発現の詳細な分析の必要性が示唆される。がん細胞の浸潤、転移能獲得過程には、接着分子異常に伴う細胞増殖系の活性化及び細胞死・アポトーシス抵抗性の関与が示唆され、今後各要因相互の関連についての検討、ヒトがん臨床材料での解析を進め、的確な診断指標、がんの個性に対応した制御方策の構築が必要と考えられる。

E. 結論

1) 前立腺癌において神経内分泌細胞の出現は予後不良因子であり、PTHrP 発現は骨転移の指標として重要と想定される。2) 高率 MSI を示す

胃癌では TGF β RII, Bax, hMSH3 等のフレームシフト型複合変異を伴うことが多いが、変異態様は癌巣部位、組織型により異なることがある。

3) 多くの転移巣由来がん細胞ではカスパーゼの発現消失、減弱を認めこのカスパーゼ失調と細胞死抵抗性の関連が示唆される。5) 乳癌細胞 MCF-7 は浮遊培養下では、IGF-1 刺激により活性化される増殖系として、基質接着時とは異なる DNA 合成系の活性化されている可能性が示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda M, Iki M, Noguchi S, Mikata K, Kubota Y, Harada M, Hosaka M: The worst histologic elements predict prognosis in moderately-differentiated prostate cancer patients with androgen-withdrawal endocrine therapy. *Eur Urol*, (1999) 36: 197-202.
2. Yoshida A, Nakamura Y, Imada T, Asaga T, Shimizu A, Harada M: Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors. *Jpn J Surg*, (1999) 29: 204-208.
3. Ochi T, Nakajima F, Shimizu A, Harada M: Induction of multinucleated cells in V79 Chinese hamster cells exposed to dimethylarsinic acid, a methylated derivative of inorganic arsenics: Mechanism associated with the formation of aberrant mitotic spindles. *Toxicol in Vitro*, (1999) 13: 11-25.
4. 原田昌興: 前立腺癌の組織異型度— Gleason 分類と本邦取扱い規約分化度分類の比較. *泌尿器外科*, (2000, in press) 13:
5. 原田昌興: 前立腺に発生する神経内分泌腫瘍. *病理と臨床*, (1999) 17: 1269-1273.
6. 原田昌興, 根本良介: Gleason 分類の本邦取扱い規約および WHO 組織分類との関連. *泌尿器外科*, (1999) 12: 1033-1036.

7. Matsukuma S, Kondo M, Yoshihara M, Matsuda M, Utakoji T and Sutou S. Mea2/Golga3 gene is disrupted in line of transgenic mice with a reciprocal translocation between chromosome 5 and 19 and is responsible for defective spermatogenesis in homozygotes. *Mammal Genom* (1999) 10 :1-5.

8. Takahashi K : Cadherin-mediated cell-cell adhesion and growth regulation. *Curr Topics Biochem Res*, (1999) 1: 249-253

9. Suzuki K, Takahashi K. Reduced substratum adhesion and decreased expression of $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins in human breast cancer cells with a property of anchorage-independent cell growth.

Int J Oncol, (1999) 14 : 897-904

10. Kikuchi K, Yasumoto S : Retention of cell adhesion and growth capability in human cervical cancer cells deprived of cell anchorage. *Jpn J Cancer Res*, (1999) 90: 867-873.

2. 学会発表

1. 原田昌興、中村圭靖、根本良介、窪田吉信、内田克紀、清水昭男：前立腺癌組織の多様性に関する組織化学的・分子生物学的解析。第58回日本癌学会総会（1999）

2. 三好康秀、上村博司、藤浪潔、池田直弥、三好代志子、北村均、原田昌興、窪田吉信、穂坂正彦：FISH法を用いた前立腺癌におけるc-myc, androgen receptor 遺伝子増幅及び8番、X染色体数的異常の解析。第58回日本癌学会総会（1999）

3. 西嶋由貴子、内田克紀、赤座英之、根本良介、原田昌興：LNCaP による骨転移像—マウスの頭頂骨骨転移モデルによる検討。第58回日本癌学会総会（1999）

4. 原田昌興、中村圭靖、清水昭男、亀田陽一、

山口正直：進行前立腺癌の病理学的特性に関する組織化学的検討。第88回日本病理学会総会（1999）

6. 高瀬和紀、上村博司、窪田吉信、穂坂正彦、原田昌興：前立腺癌組織における human TR3 orphan receptor の発現と Ki-67 標識率について。第87回日本泌尿器科学会総会（1999）

7. 増田光伸、野口純夫、窪田吉信、原田昌興、穂坂正彦：中分化前立腺癌における充実性（髄様）／索状（柱状）組織構築成分の意義について。第87回日本泌尿器科学会総会（1999）

8. 原田昌興：前立腺癌の悪性度分類—本邦規約分類と Gleason 分類の比較。第64回日本泌尿器科学会東部総会（1999）

9. 原田昌興：前立腺癌 Gleason 分類の実際。第4回日本外科病理学会学術総会（1999）

10. 吉田明、中村圭靖、清水昭男、原田昌興、永野篤、麻賀太郎：乳癌組織における parathyroid hormone-related protein (PTHrP) の発現と骨転移。第7回日本乳癌学会総会（1999）

11. 松隈章一、吉原光代、宇多小路正：マウス染色体における転座断端と転座に伴う微小欠失の radiation hybrid による mapping 解析。第58回日本癌学会総会（1999）

12. 高橋和秀、鈴木勝雄：浮遊細胞特異的な PI3K を介した MAP キナーゼの活性化。第58回日本癌学会総会（1999）

13. 菊地慶司、森村茂、安本茂：ヒトがん細胞株でのカスパーゼの発現異常とアポトーシス。第58回日本癌学会総会（1999）

14. 安本茂、木口一成、菊地慶司、国村忠司、森村茂：ヒト再生上皮幹細胞の分離培養と発癌実験系構築の試み。第58回日本癌学会総会（1999）

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

分野 2 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究
研究テーマ がんの浸潤・転移に関する病理学的及び分子生物学的研究
分担課題 前立腺がんの増殖浸潤・転移並びに再燃の病理学的研究

分担研究者 原田昌興（神奈川県立がんセンター臨床研究所長）

研究要旨 前立腺臨床癌の増殖進展、再燃に関わる要因を主に組織化学的発現形質により分析し、個々症例の治療反応性、予後などの的確な指標の開発を目指して研究した。前立腺癌は通常生物学的性状の異なる多様な組織要素の混在からなり、低分化・高異型度の髓様・索状増殖要素ではアンドロゲン非依存性、高増殖能など多くの悪性形質の蓄積されている可能性が示唆された。また、E-カドヘリンの発現低下ないし分布異常、Bcl-2 蛋白発現、神経内分泌性細胞の出現等と髓様・索状要素の構成率にも関連が認められ、優勢組織型より髓様索状要素が予後因子として重要性であることを明らかにした。Bcl-2発現は異型度、病期とは独立した予後因子であり、神経内分泌細胞出現も予後不良指標となり得ること、PTHrP 発現は骨転移と関連する等の知見を見出した。前立腺癌の再燃は、既存の混在アンドロゲン非依存性癌細胞の選択的増殖および治療に伴う内分泌環境の変化などに対応した非依存性細胞への形質転換との両要因によりもたらされると想定された。

A. 研究目的

ヒトがんの確定診断は組織学的になされ、組織異型度は多数例の解析では予後因子として有意であるが、個々症例の予後の予測は困難なことが少なくない。その一因はヒトがんは生物学的性状の異なる多様な組織要素により構成されるため、優勢組織異型度のみでは個々例の治療反応性などを的確に把握し得ないことにあると考えられる。前立腺癌は基本的にはアンドロゲン依存性癌であるが、診断当初より内分泌療法抵抗性を示さないし一時的反応に留まる症例も少なくなく、また内分泌療法後再燃癌の多くはアンドロゲン非依存性である。従って、前立腺癌制御の最大の課題はアンドロゲン非依存性癌の特性、その発生要因の解明および高率な骨転

移発生の要因を解明し、非依存性癌および骨転移の制御方策を見出すことにある。本研究はこの様な背景のもとに、浸潤・転移性前立腺癌の病理学的特性を解析し、個々症例の的確な診断、予後指標を見出すとともに骨転移発生要因を明らかにし、新たな治療法、骨転移制御方策の構築に資する知見の集積を図ることを目的とする。

B. 研究方法

前立腺癌臨床例の診断時生検組織、臨床的早期癌の前立腺全摘出術組織材料、剖検組織などを対象として、アンドロゲン受容体（AR）、増殖周期細胞核抗原 KI-67、アポトーシス関連蛋白 Bcl-2、細胞間接着分子 E-カドヘリン、神経内分泌細胞指標ニューロン特異エノラーゼ（NSE）・

クロモグラニン A (ChrA)ほか、副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) などの発現についての免疫組織化学的検索、第 7、11、17 番および X、Y 染色体に対する特異プローブを用いた *in situ* hybridization 法による染色体数的異常細胞出現などを検索し、各症例における分化度、Gleason 分類、WHO 組織型構成率等の組織学的指標との対応、浸潤、転移性癌の病理学的特性について分析した。また、各発現形質の相違による、内分泌療法後の予後について Kaplan-Meier 法により検討した。一部症例については TRAP アッセイ法によるテロメラーゼ活性を測定、組織像との対応についての検討を行った。

(倫理面への配慮)

この研究は病理組織診断のために採取、検査科に提出された組織材料を用いた後ろ向き研究であるが、データの解析は特定の個人を識別せずに行う。従って、検索結果の公表がプライバシーの侵害に触れるものではなく、特定個人の不利益などをもたらすものではないと考える。

C. 研究結果

(1) 前立腺癌の組織学的多様性について (平成 9 年度)

前立腺癌は本邦の取扱い規約では分化度により高、中、低分化腺癌に分類されるが、異なる分化度要素の混在例が多く、優勢分化度あるいは Gleason スコアが同一の症例でも個々例における WHO 組織型分類に準拠した 6 組織型、単純腺管・微小腺管・篩状腺管・融合腺管・充実／髄様・索状増殖の組織内構成率は極めて多様であることを明らかにした。また、臨床的組織内限局性癌でも病理学的には約半数は被膜貫通性浸潤を示す pT3 の症例で、25～27%は既に精嚢浸潤ないしリンパ節転移が認められ、組織学的に高異型度の髄様・索状増殖要素の組織内構成率が高率な症例ほど浸潤・転移は高頻度である

傾向を認めた。髄様・索状増殖要素の構成率は剖検例の検討でも、生検診断時に比べ著明に増加し、特に転移陽性例では平均 60%以上の構成率であった。

(2) 前立腺癌 WHO 各組織型要素のアンドロゲン依存性、増殖能、染色体数的異常細胞出現率等との関連 (平成 9 年度)

前立腺癌 43 例の未治療診断時組織を用い、アンドロゲン受容体 (AR) の発現、増殖周期細胞核抗原 Ki-67 標識率を WHO 各組織型別に検索した結果、同一症例組織内においても組織型により発現状態の異なることを見出した。特に、低分化の髄様・索状増殖要素では AR の陰性化が約 50%に認められ、Ki-67 標識率は全平均 7%に対して 16～18%と高値で、この髄様索状要素はアンドロゲン非依存性の高増殖能を有することが示唆された。また、7 番、17 番染色体の多倍体細胞出現率は高異型度症例ほど高率であり、特に髄様・索状増殖部では検索したいずれの染色体においても、多倍体細胞の出現率が他の組織型に比して高率である傾向を示した。

(3) 前立腺癌におけるテロメラーゼ活性の検討 (平成 10 年度)

前立腺癌診断時の鏡面切半組織を用い、組織所見と TRAP assay 法によるテロメラーゼ活性の関連を検討した。テロメラーゼ活性は良性肥大症組織では検出されず、腺癌では 29/31・94%の陽性率で、半数以上 55%の症例では抽出検体の 10 倍以上希釈でも明らかな活性の認められる高活性が検出された。診断時被膜外浸潤ないし転移陽性例では前立腺内限局癌に比してテロメラーゼ高活性例が有意に高率であった。これらの高活性例では異型度高度の症例が多く、WHO 組織型構成で髄様・索状増殖の平均構成率が高く、Ki-67 標識率も低活性群に比して明らかに高値を示し、テロメラーゼ活性と増殖能との関連が示唆された。

(4) 前立腺癌における Bcl-2 蛋白発現の意義 (平成 10 年度)

前立腺組織において組織化学的 Bcl-2 蛋白発現は非癌腺管では基底細胞層に陽性所見が得られ、分泌腺上皮は肥大症組織でも陰性である。癌組織においては 18/42 例・43% の陽性率であった。高異型度症例ほど陽性率は高く、特に陽性例における髄様・索状増殖要素の組織内平均構成率は陰性例に比して高率で、Ki-67 標識率も陰性例の 2 倍弱の高値を示した。病期別でみると、Stage C までの症例では 17% の陽性率に対して、転移陽性の Stage D 症例では 60% が陽性であり、内分泌療法後の予後解析では進行病期の同一異型度症例においても、陽性例の予後は有意に不良であり、異型度とは独立した予後因子である可能性が示唆された。

(5) 接着分子 E-カドヘリンの発現について (平成 10 年度)

組織化学的 E-カドヘリン発現の検索では、診断時転移陽性例では 70% の症例で発現低下ないし細胞表面分布異常を示し、転移陰性例における 27% に比して明らかに高率であった。E-カドヘリン発現異常と分化度には明瞭な関連はないが、発現異常例においては、微小腺管、融合、索状増殖の構成率が高い傾向を示し、発現動態と組織型、転移性との関連が示唆された。また、Bcl-2 発現例には E-カドヘリン発現低下ないし分布異常例が多く、転移陽性 Stage D 症例において Bcl-2 と E-カドヘリンの複合異常を示す症例群の予後は両蛋白の発現異常陰性例に比して有意に不良であった。

(6) 神経内分泌細胞出現の意義 (平成 11 年度)

NSE, ChrA などの組織化学的発現を指標とする神経内分泌細胞 (NEC) の検索で、いずれかの指標陽性細胞が 5% 以上認められる例を NEC 陽性例とすると、13/42 例・31% の陽性率であった。NEC は散在性ないし巣状に認められ、

腫瘍巣が瀰漫性陽性を呈する例はなかった。陽性細胞を含む例は高異型度症例が多く、髄様・索状増殖要素の平均構成率が高率で、陰性例に比して明らかに Ki-67 標識率は高値、内分泌療法後の予後不良の傾向を示していた。

(7) 副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 発現について (平成 11 年度)

前立腺癌における PTHrP 高発現例は 17/66 例 26% であったが、弱陽性例を含めると 68% の陽性率であった。高発現例の 71% は診断時骨転移陽性で、逆に骨転移陽性例の 86% が PTHrP 発現を示し、PTHrP 発現の骨転移との関連が示唆された。また、PTHrP 陽性例では陰性例に比して髄様・索状増殖要素の構成率が高率で、Ki-67 標識率も有意に高値を示していた。

(8) WHO 組織型構成率と内分泌療法反応性 (平成 9~11 年度)

診断時生検組織と内分泌療法のみによる治療 1 年後の組織について WHO 組織型構成ははじめ病理学的分析を行い比較検討した。内分泌療法有効例では診断時の髄様・索状要素の平均構成率は 14% に過ぎなかったが、効果不全例では平均 30% の構成率を示し、1 年後の生検組織では平均 60% にまで増加していた。また、診断時組織における髄様・索状要素の構成率を 0%、1~20%、21% 以上の 3 群に分類し、内分泌療法後の予後を比較検討した結果、明らかな統計的有意差をもって予後は異なり、中分化腺癌例に限定して同様に髄様・索状要素の構成率で群別した症例の予後も 15% を境界値として明らかに異なることが示された。

D. 考察

一般に癌の組織学的異型度は悪性度と同義的に用いられ、予後因子としての有意性が求められる。前立腺癌の組織異型度については 1926 年の Broders による腺癌についての 4 段階の grading

の適応以後、数十の分類法が提唱され未だに国際的統一は図られていない。本邦においては、多くの病理医が抵抗なく適用可能で再現性に優れた分類法とするため、組織分化度のみを指標とする3段階分類が規定され、異なる分化度の混在例については量的に優勢な組織分化度をもって代表することとされている。この分化度分類は多数の集積例に適用した予後解析の結果では、米国における Gleason 分類あるいは他の分類法と同様、明らかに有意性が認められる。しかし、ヒトがんはしばしば異なる分化度要素の混在を示し特に前立腺癌は組織学的多様性に富み、優勢な組織分化度、組織異型度による個々症例の治療反応性、予後予測は困難との指摘がなされ、実際、個々中分化腺癌例の臨床経過は定常的ではない。米国では前立腺癌の組織学的多様性を考慮して優勢組織型と副次的組織型両者により組織異型度を判定する Gleason 分類の適用が推奨されているが、この分類法は前立腺癌のみの特異な組織分類法であり、単純な指標による本邦規約分化度分類と比較して観察者間での判定偏差あるいは同一観察者における異時的再現性に優れているとは言えない。また、Gleason 分類では副次的組織型を考慮しているとは言え、個々症例では平均約 2.7 の異なる組織型が混在するとの指摘もあり、個々症例において優勢組織型と副次的組織型の予後に対する影響度を平均化することの妥当性については十分に検討されていない。従って現在、前立腺癌個々症例の臨床経過、予後予測に優れ、普遍化が容易で再現性にも優れた異型度分類の構築が望まれている。また、前立腺癌制御の最大の課題は内分泌療法抵抗性癌の特性ならびにその発生の機構、高率な骨転移、特に造骨性転移の機構解明ならびに制御方策の構築である。この様な視点から、まずヒト前立腺癌、特に浸潤・転移性癌の特性ならびに悪性化進展の要因を病理学的に分析し、

個々例の性状についての的確な診断、治療反応性の指標を明らかにするべく研究を進めてきた。

前立腺癌各症例の組織学的構成を WHO 組織型分類に準拠した 6 型の組織型構成率により分析検討した結果、同一分化度に分類される症例であっても個々例は極めて多様な構成を示すことが明らかとなった。特に、臨床的限局性癌でも病理学的被膜外浸潤癌、リンパ節転移陽性例では、診断時組織における高異型度の組織型の構成率が組織内限局性癌に比べて明らかに高率であったことは、浸潤転移性に関わる高異型度組織要素の混在有無の重要性を示唆するものと考えられる。実際に、WHO 各組織型別の種々の組織化学的形質発現の比較検討の結果、組織型とアンドロゲン依存性、増殖能、多倍体細胞出現率などには一定の相関があり、低分化の髄様・索状増殖要素はアンドロゲン非依存性増殖能を有し、しかもその増殖率は同一症例内においても極めて高く、染色体数的異常細胞出現率も他の組織要素に比して明らかに高率で、多くの遺伝子異常が蓄積している可能性が示唆された。また、Bcl-2 発現、E-カドヘリンの発現低下ないし分布異常などを示す症例においてはこの髄様・索状増殖要素の平均構成率がこれらの形質発現異常のない症例に比して高率であったことは、髄様・索状組織要素では高増殖能とともにアポトーシス抵抗性を獲得し、浸潤性に関連する接着分子機構の破綻を来している可能性が示唆される。実際 E-カドヘリンの発現は高分化単純腺管癌、中分化篩状腺管癌では細胞膜に均等高発現を示すが、微小腺管・融合索状増殖要素等においてはしばしば発現の減弱・消失あるいは不均一分布発現を示し、単純腺管癌において E-カドヘリンの発現低下ないし分布異常が生じると微小腺管型ないし融合索状増殖へと転換し、浸潤性を獲得するものと想定される。また、骨転移陽性例では E-カドヘリンの発現低下ない

し分布異常が転移陰性例に比して有意に高率であったことは、E-カドヘリン発現異常の浸潤性のみならず転移性との関連、診断時生検組織における発現異常の検索による潜在的転移予測に対する有用性を示唆する結果と考えられる。Bcl-2 蛋白の発現も転移陽性例で明らかに高率であり、転移陽性群の中でも Bcl-2 発現例における Ki-67 標識率は有意に高値を示したことは、浸潤転移性癌は増殖活性の亢進とともにアポトーシス抵抗性獲得により進行が促進されている可能性が示唆され、予後不良要因となっているものと推測される。事実、診断時被膜外浸潤転移陽性例において Bcl-2 発現例の予後は陰性例に比して明らかに予後不良であった。また、内分泌療法のみによる治療例において、有効例では診断生検時にアンドロゲン非依存性要素は少量しか含まれていないが、効果不全例では平均 30%以上が低分化要素であり、治療 1 年後の組織においてこの低分化髄様・索状要素が 60%にまで増加が認められた。この事実は、治療前の組織にもともと混在したアンドロゲン非依存性要素の選択的増殖に加え、治療に伴う内分泌環境変動に適応した形質転換組織要素の生じた可能性を示唆するものと考えられる。

近年神経内分泌細胞は傍分泌的に増殖因子を産生する可能性が示唆されている。神経内分泌性細胞陽性例では明らかに Ki-67 標識率が高値であったことはこの仮説を支持する結果と考えられる。また、診断時組織での PTHrP 発現と骨転移との関連が示唆され、PTHrP 陽性例では有意に Ki-67 標識率が高かったことも同様の機転に基づき可能性が考えられる。前立腺癌の高率な骨転移の要因としての解剖学的な傍脊椎静脈叢の重要性については既に報告したが、前立腺癌と同様に造骨性転移の比較的高頻度にみられる乳癌においても PTHrP 発現と骨転移との関連が示唆され、PTHrP 産生性癌細胞の骨基質との

親和性、関連についての詳細な検討が今後の重要課題とされる。これらの NEC 陽性例、PTHrP 陽性例ではいずれも髄様・索状要素の構成率が明らかに高率であり、この髄様索状要素の構成率のみを指標とする症例群の内分泌療法後の予後が有意に異なり、組織学的に最も高頻度の中分化腺癌に限定しても、髄様・索状要素の構成率により明らかに予後が異なるとの結果は、たとえ劣勢な組織要素であっても、より多くの悪性形質の蓄積した髄様・索状組織要素の予後規定因子としての重要性を示唆する結果と考えられる。

E. 結論

前立腺臨床癌の多くは一般に多様な組織要素の混在からなる。WHO 分類に準拠した各組織要素と増殖・浸潤能に関わる組織化学的発現形質、生物学的性状には相関が認められる。前立腺癌個々例の悪性度、予後は量的に優勢な組織要素よりも劣勢な組織要素であっても、アンドロゲン非依存性、高増殖能、アポトーシス抵抗性などのより多くの悪性形質の蓄積・獲得を示す髄様・索状増殖要素の構成率により規定されている可能性が示唆された。また、これらの悪性化形質の蓄積過程には、治療に伴う生体微小組織環境の変動に対するがん細胞の適応反応も関与している可能性がある。前立腺癌の高率な骨転移には細胞接着分子異常とともに PTHrP 発現の関連性が示唆された。今後これらの知見をもとに、前立腺癌個々例の治療反応性、予後指標としての確な日常的診断基準の策定、浸潤・転移性がんの新たな制御方策に資する知見の集積を目指して研究する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Masuda M, Iki M, Noguchi S, Mikata K, Kubota

- Y, Harada M, Hosaka M : The worst histologic elements predict prognosis in moderately-differentiated prostate cancer patients with androgen-withdrawal endocrine therapy. *Eur Urol*, (1999) 36: 197-202.
2. Yoshida A, Nakamura Y, Imada T, Asaga T, Shimizu A, Harada M : Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors. *Jpn J Surg*, (1999) 29: 204-208.
3. Ochi T, Nakajima F, Shimizu A, Harada M : Induction of multinucleated cells in V79 Chinese hamster cells exposed to dimethylarsinic acid, a methylated derivative of inorganic arsenics : Mechanism associated with the formation of aberrant mitotic spindles. *Toxicol in Vitro*, (1999) 13: 11-25.
4. 原田昌興 : 前立腺癌の組織異型度—Gleason 分類と本邦取扱い規約分化度分類の比較. *泌尿器外科*, (2000) 13: 135-138.
5. 原田昌興 : 前立腺に発生する神経内分泌腫瘍. *病理と臨床*, (1999) 17: 1269-1273.
6. 原田昌興、根本良介 : Gleason 分類の本邦取扱い規約および WHO 組織分類との関連. *泌尿器外科*, (1999) 12: 1033-1036.
7. Lin Y, Uemura H, Fujinami K, Hosaka M, Iwasaki Y, Harada M and Kubota Y : Detection of telomerase activity in prostate needle-biopsy samples. *Prostate*, (1998) 36: 121-128.
8. Nemoto R, Nakamura I, Uchida K and Harada M : Numeric chromosome aberration in prostate cancer detected by in situ hybridization. *Int J Clin Oncol*, (1998) 3 : 138-142.
9. Noguchi K, Harada M, Masuda M, Takeda M, Kinoshita Y, Fukushima S, Miyai K, Fukuoka H and Hosaka M. Clinical significance of interruption of therapy with allylestrenol in patients with benign prostatic hyperplasia. *Int J Urol*, (1998) 5:466-470.
10. 原田昌興. 前立腺癌の組織学的分類—Gleason 分類の意義—. *病理と臨床* (1998) 16 : 1381-1386.
11. 原田昌興. 前立腺癌の予後規定因子—病理学的立場より. *腎と透析* (1998) 44 : 749-753.
12. Lin, Y., Uemura, H., Fujinami, K., Hosaka, M., Harada, M. and Kubota, Y.: Telomerase activity in primary prostate cancer. *J Urol*, (1997) 157:1161-1165
13. 近藤猪一郎、三浦猛、藤波潔、里見佳昭、井田時雄、石塚栄一、上村博司、野口純男、窪田吉信、穂坂正彦、原田昌興 : 前立腺癌初診時生検組織と全摘標本組織およびリンパ節転移組織の比較. *泌尿紀要*, (1997) 43:97-101
14. 吉田明、大沢やすよ、麻賀太郎、河原悟、中村圭靖、清水昭男、原田昌興 : 乳癌予後因子としての bcl-2 蛋白発現—p53 蛋白発現との比較—. *日臨外医会誌*, (1997) 58 : 507-512
2. 学会発表
1. 原田昌興、中村圭靖、根本良介、窪田吉信、内田克紀、清水昭男 : 前立腺癌組織の多様性に関する組織化学的・分子生物学的解析. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
2. 三好康秀、上村博司、藤浪潔、池田直弥、三好代志子、北村均、原田昌興、窪田吉信、穂坂正彦 : FISH法を用いた前立腺癌における c-myc, androgen receptor 遺伝子増幅及び 8 番、X 染色体数的異常の解析. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
3. 西嶋由貴子、内田克紀、赤座英之、根本良介、原田昌興 : LNCaP による骨転移像—マウスの頭頂骨骨転移モデルによる検討. 第 58 回日本癌学会総会 (1999)
4. 原田昌興、中村圭靖、清水昭男、亀田陽一、山口正直 : 進行前立腺癌の病理学的特性に関する組織化学的検討. 第 88 回日本病理学会総会 (1999)
5. 高瀬和紀、上村博司、窪田吉信、穂坂正彦、原田昌興 : 前立腺癌組織における human TR3 orphan receptor の発現と Ki-67 標識率について.

第 87 回日本泌尿器科学会総会 (1999)

6. 増田光伸、野口純夫、窪田吉信、原田昌興、穂坂正彦：中分化前立腺癌における充実性（髄様）／索状（柱状）組織構築成分の意義について。第 87 回日本泌尿器科学会総会 (1999)

7. 原田昌興：前立腺癌の悪性度分類一本邦規約分類と Gleason 分類の比較。第 64 回日本泌尿器科学会東部総会 (1999)

8. 原田昌興：前立腺癌 Gleason 分類の実際。第 4 回日本外科病理学会学術総会 (1999)

9. 吉田明、中村圭靖、清水昭男、原田昌興、永野篤、麻賀太郎：乳癌組織における parathyroid hormone-related protein (PTHrP) の発現と骨転移。第 7 回日本乳癌学会総会 (1999)

10. Harada M, Nakamura Y, Shimizu A, Liu Y, Kubota Y, Hosaka M: Histochemical expression of Ki-67, Bcl-2, AR, and telomerase activity in prostatic adenocarcinoma. 22nd International Congress of the International Academy of Pathology (1998)

11. 原田昌興、亀田陽一、山口正直、清水昭男、中村圭靖、飯田萬一：前立腺癌全摘術症例の病理学的検討。第 87 回日本病理学会総会 (1998)

12. 西嶋由貴子、根本良介、中村勇夫、内田克紀、原田昌興：血中 hydroxypyridinoline の骨転移マーカーとしての有用性—前立腺癌臨床例での検討。第 57 回日本癌学会総会 (1998)

13. 吉田明、中村圭靖、清水昭男、原田昌興、平川昭平、麻賀太郎：乳癌組織における erbB2 蛋白発現と抗エストロゲン剤。第 6 回日本乳癌学会総会 (1998)

14. 三浦猛、原田昌興、甲斐祥生、小柴健、神奈川県前立腺腫瘍研究会：80 歳以上高齢者前立腺癌患者に対する除瘤術あるいは酢酸クロルマジノン投与による治療効果。第 36 回日本癌治療学会総会 (1998)

15. 原田昌興、中村圭靖、清水昭男、亀田陽一、山口正直、飯田萬一：前立腺癌 WHO 分類組織型

の特性と予後。第 86 回日本病理学会総会 (1997)。

16. 清水昭男、中村圭靖、林幹也、亀田陽一、山口正直、飯田萬一、原田昌興、菊地慶司、安本茂：食道早期癌における Bcl-2 蛋白ならびに nerve growth factor receptor (NGFR) の発現について。第 86 回日本病理学会総会 (1997)。

17. 林 毅、上村博司、藤浪潔、窪田吉信、穂坂正彦、原田昌興：ヒト前立腺癌におけるテロメラーゼ活性。第 85 回日本泌尿器科学会総会 (1997)。

18. 根本良介、中村勇夫、西嶋由貴子、内田克紀、原田昌興：骨転移マーカーとしての血清 Pyridinoline—実験モデルと臨床成績。第 85 回日本泌尿器科学会総会 (1997)。

19. 原田昌興、根本良介、中村勇夫、内田克紀：前立腺癌に対する LH-RH アナログ 単独投与の組織学的効果。第 85 回日本泌尿器科学会総会 (1997)。

20. 原田昌興、中村圭靖、清水昭男、亀田陽一、山口正直、飯田萬一：前立腺癌の進展・転移の実態に関する病理学的検討。第 56 回日本癌学会総会 (1997)。

21. 西嶋由貴子、内田克紀、赤座英之、根本良介、原田昌興：LNCaP を用いたマウス頭頂骨骨転移モデルの作成。第 56 回日本癌学会総会 (1997)。

22. 内田克紀、島居徹、赤座英之、友部光朗、服部一紀、根本良介、原田昌興：膀胱癌における予後因子としての組織異型度、浸潤度、各種染色体の数的異常、Ki-67, AGNOR, Bcl-2 発現の比較。第 56 回日本癌学会総会 (1997)。

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）

分担研究報告書

分野2： 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究

研究テーマ がんの浸潤・転移に関する病理学的及び分子生物学的研究

分担課題 がんの進展過程における遺伝子不安定性に関する研究

分担研究者 松隈章一（神奈川県立がんセンター臨床研究所主任研究員）

研究要旨 胃がんの組織のマイクロサテライト不安定性(MSI)を 40 例の手術材料について検索し、13%の胃がんで高度の MSI を示し且つ3遺伝子（BAX、TGF β RII、hMSH3）の単純繰返し配列においてミスマッチ修復に由来するフレームシフト突然変異の発生を検出した。さらに上記遺伝子異常の発生経過の差異と胃癌組織型の差を対比した。

A. 研究目的

マイクロサテライト不安定性(MSI)によるゲノム不安定性を示すがんが一定の割合で存在する。このゲノム不安定性はミスマッチ修復遺伝子の異常に由来する。ミスマッチ修復の異常はマイクロサテライト単純配列のみならず、遺伝子蛋白コード領域中の単純繰返し配列の異常を DNA 複製中に引き起こしフレームシフト型突然変異が発生する。がん細胞においては特定の遺伝子群において、ミスマッチ修復異常に由来すると思われる変異が発生し、がん細胞に選択的に残ることが知られてきた。

われわれは、外科的に摘出された胃がん組織の一部から DNA を抽出し MSI を示す胃がんを検索し、さらに BAX、TGF β RII、hMSH3 遺伝子の単純配列を含む領域を解析し、ミスマッチ修復異常によって遺伝子変異を起こしたと見られる胃がん5例を同定した。

これらのがんに見られる変異の程度、経過を調べることにより、がんにおける遺伝子変異の多様性についての情報を得、さらに、病理組織検索の結果と対比させることにより胃がん進行過程での遺伝子変異と組織異型度との関連を調べることを目的とする。

B. 研究方法

胃がん組織材料：

進行がんを主体とする 70 例の手術摘出材料を組織学的に検索しがん細胞を充分量含むと思われる 40 例を選別して DNA 解析に用いた。同時に非がん組織より抽出した DNA を対照として用いた。

マイクロサテライト不安定性の検索：

マイクロサテライト検索用の PCR プライマーを末端ラベルし、がん部および非がん部 DNA をテンプレートとして PCR 後、6%PAGE 変性ゲル電気泳動により分離後オートラジオ

グラフィーで検出した。

遺伝子変異の検索：

遺伝子変異が想定される部分を含む断片を末端ラベルしたプライマーにより PCR 増幅後、上記と同様に検索した。1塩基以上の差異が検出された胃がん DNA は PCR 産物を plasmid にクローン化し、さらに塩基配列を決定して遺伝子の frame shift 変異を確定した。

胃がん病理標本のパラフィン切片の微小組織片から DNA を抽出し、nested PCR により増幅した後、PCR primer の Cy5 蛍光標識により PAGE 後の検出を行った。

(倫理面への配慮)

研究材料は手術後の摘出組織、及びその病理学的検索後の資料の一部であり、診療の範囲内で収集され、個人情報への保守は病院個人情報と同様の保護管理をされている。

C. 研究結果

当施設での胃がん例について DNA 検体を癌部及び非癌部組織より抽出し、染色体位置マーカーであるマイクロサテライトについて、ヒトがん DNA に発生するマイクロサテライト不安定変動の解析を実施した。また、BAX、TGF β RII 型、hMSH3 遺伝子の replication error を受けやすい単純配列領域での遺伝子異常とマイクロサテライト不安定性との関連を解析した。

胃がん(進行癌 70 例)の手術材料のうち、上皮組織を十分量含む 40 例について、胃がん由来 DNA と正常細胞由来 DNA の比較を行い胃がんでのマイクロサテライト不安定性(MSI)を示すものを検索し 15/40=38%の胃がんが異常を検出した。これらは 50-90%の座位で集積して MSI がみとめられたもの(5/40,13%)と、40-9%以下の座位でのみ MSI が認められたもの(10/40,25%)に分類

できた。

BAX 遺伝子はアポトーシスを誘導しその異常による癌化が示唆される遺伝子で(G)₈の単純配列で異常を起こす可能性が高い。また増殖抑制に関与する TGF β RII は(A)₁₀の単純配列があり同様の可能性を有する。hMSH3 は MSI の原因となるミスマッチ修復遺伝子の 1 つであり(A)₈の単純配列を有する。これらの遺伝子について変異を検索した結果、frame shift 突然変異を起こした異常が BAX、TGF β RII、hMSH3 について 40 例の胃がん中、上記の MSI 集積性の胃がん 5 例でのみ検出された。このうち 4 例では 2 遺伝子に変異が生じていた。すなわち、マイクロサテライト不安定性の程度がはなはだしい胃癌(13%)では複数の遺伝子変異が誘発されたことを意味する。

これらの 5 例の MSI 胃がんの病理標本をもとに、薄切した切片から癌組織 DNA を抽出し、胃がん部位別に精密な解析を行った。1 例では、ほぼ全域の胃がん組織で TGF β RII の異常が検出され、一部で新たな hMSH3 の異常が見られた。この遺伝子異常の差異は組織型の差(未分化型、分化型)と対応づけられた。

D. 考察

胃がんにおける高度のマイクロサテライト不安定性 MSI を伴う症例における特異的な病理変化ないし臨床経過との関連はまだ少数例であり、今後解析例を増やしていく必要がある。13%の胃がんでは高度の MSI がみられかつ 3 遺伝子(BAX、TGF β RII、HMSH3)において 1 塩基繰り返し配列での frame shift 変異が見られた。

胃がん組織の各所を子細に調べると、上記の遺伝子変異は異なった場所で独立に発生していたとの印象をうける。この結果は

組織型の違いとも対応しており、症例をさらに増やして追求する必要があると思われる。また、転移した胃がん細胞からの DNA を解析することも可能であり、転移にかかわる遺伝子異常の解析に発展させることは重要である。

高 MSI 胃がんは他の胃がんと病理所見において現在のところ区別できないが、遺伝子変異率の高まった胃がんとして認識すれば、この胃がん群は短期間でがん進展の道をたどる可能性も考えられ、予後との関連などにおいてもさらに調査を進める必要がある。

E. 結論

1. 当施設胃がん手術例において胃がん組織 DNA のマイクロサテライト不安定性 (MSI) を検索した。
2. 40 人中 15 人 (38%) において、胃がん DNA の MSI を検出した。
3. 上記 15 人中の 5 例の胃がん DNA は顕著な MSI を示した。
4. 顕著な MSI を示した上記胃がん DNA にのみ、BAX, TGF β RII, HMSH3 の 3 遺伝子での単純配列の MSI によるフレームシフト突然変異が検出された。これら 5 例中 4 例で複数の遺伝子の変異が検出された。
5. 胃がん 40 例中 5 例で甚だしい MSI が発生し、MSI によるがん関連遺伝子の変異を複数引き起こしていた事実から、約 13% の胃がんは MSI による特殊な悪性化の経過を辿るものがあると予想される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Chen, S. Yamamoto, M. Kitano, T. Murai, H. Wanibuchi, S. Matsukuma, Y. Nakatsuru, T. Ishikawa, S. Fukushima : Possible rare involvement of O⁶-methylguanine formation as a significant mutational factor in mouse urinary bladder carcinogenesis models. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 18, 101-110, 1998
 2. S. Matsukuma, M. Kondo, M. Yoshihara, M. Matsuda, T. Utakoji, S. Sutou : Mea2/ Golga3 Gene is disrupted in a line of transgenic mice with a reciprocal translocation between chromosomes 5 and 19 and is responsible for a defective spermatogenesis in homozygotes. *Mammal Genome* 10, 1-5, 1999
- ##### 2. 学会発表
1. 吉原光代、宇多小路正、長尾美奈子、松隈章一： Bigblue マウスにおける自然発生突然変異の DNA 修復遺伝子 ada トランスジーンによる差異. 第 56 回日本癌学会総会 (京都) 1997, *Jap J Cancer Res*, suppl, p68, 1997.
 2. 松隈章一、吉原光代： マイクロサテライト多型による C3H マウスの肝臓腫瘍発生の遺伝的特性の解析. 第 56 回日本癌学会総会 (京都) 1997, *Jap J Cancer Res* suppl, p267, 1997.
 3. 松隈章一、吉原光代、吉川貴己、西連寺意典： 胃がんにおける DNA のマイクロサテライト不安定性及び BAX, TGF β RII 遺伝子の frame shift 変異. 第 57 回日本癌学会総会 (横浜) 327, 1998, *Jap J Cancer Res* 89, suppl, 327, 1998.

厚生科学研究費補助金（がん克服新 10 か年戦略研究事業）

分担研究報告書

分野 2 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究
研究テーマ がんの浸潤・転移に関する病理学的及び分子生物学的研究
分担課題 細胞基質間接着による増殖制御に関する研究

分担研究者 高橋和秀（神奈川県立がんセンター臨床研究所・専門研究員）

研究要旨 軟寒天中での増殖能が亢進している乳癌細胞では、正常細胞に比較して基質接着受容体 β 4 インテグリンの顕著な発現低下および β 1 インテグリンの細胞表面への移行異常が見い出された。また癌細胞の基質接着に依存しない増殖の特徴として、非接着時特異的に IGF-I の増殖刺激が PI3-K を介して MAP キナーゼ(ERK)の活性化を誘導することがわかった。これらの結果から IGF-I 依存性の乳癌細胞に対しては PI3-K ないし ERK の阻害が転移・増殖の抑制に有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

発癌過程は複数の遺伝子変化の蓄積である事が明らかにされて来たが、転移・浸潤に関与する遺伝子群の同定はまだ不十分である。そこで転移のインビトロでの反映とされる非足場依存性増殖に注目し、培養基質への接着機構、接着信号の伝達機構、および増殖信号伝達機構との関連について、癌細胞と正常細胞の比較検討を行い、癌細胞における非足場依存性増殖機構の解明とその抑制に関する基礎的知見を得る事を目的とした。

B. 研究方法

基質接着機構の解析には基質受容体に対する機能阻害抗体を用いた接着阻害実験を基礎に接着受容体の同定を行った。接着後の伸展過程は免疫染色分子の蛍光顕微鏡による観察によった。細胞内信号伝達経路の解析には抗体を用いたウェスタン分析、および信号伝達分子の酵素活性

を阻害剤を併用して測定した。

（倫理面への配慮）

市販の培養細胞のみを用いている為、倫理面での問題は無いと判断した。

C. 研究結果

基質への接着は正常乳腺細胞が約4時間でプラトーに達するのに対し、乳癌細胞は約1時間と早いが、トリプシン抵抗性で比較した接着力は正常細胞の方が顕著に強かった。正常細胞、癌細胞とも基質への接着はインテグリン β 1、 β 4 に対する機能阻害抗体により阻害を受けたが、阻害に必要な抗体濃度は正常細胞の方が有意に高かった。

正常細胞と癌細胞におけるインテグリン発現量を比較した結果、癌細胞では β 4 の総発現量が正常細胞の 60-70% に低下していた。 β 1 の総発現量は両者で有意差が無いものの、細胞表面での発現量は正常細胞の 10% しかなかった。

(平成9—10年度)

アクチンの重合阻害は正常細胞の接着を阻害せず、むしろ接着頻度を上昇させたが、基質接着後の伸展を強く阻害した。また伸展を阻害された細胞は DNA 合成の開始が著しく阻害された。ウェスタン分析ならびに免疫染色の結果、インテグリン β 1、 α アクチニンがアクチンと共沈、共存し、インテグリン β 4はケラチンと共沈、共存することが確認された。また細胞の伸展過程を観察したところ、アクチン繊維の細胞周辺部への伸長が先行し、次にインテグリン β 1を足掛かりにアクチン繊維依存性に α アクチニンが移動する様子が見られた。DNA 合成の開始に必須な伸展の意義については確定的な実験結果は得られなかった。(平成10年度)

一方、インテグリン β 1を介した基質接着に依存しない乳癌細胞は IGF-I に応答して軟寒天中でも増殖可能であった。浮遊状態での IGF-I の信号伝達経路を接着状態の時と比較したところ、基質接着時同様 PI3-K 依存性の PKB/Akt の活性化に加え、浮遊時特有に PI3-K の活性化に依存した Raf-1, MEK (MAPKK), ERK (MAPK) の活性化が観察された。また IGF-I の有無に拘らず細胞の生存率に有意差が無いことから PI3-K から PKB/Akt への信号伝達は抗アポトーシス信号ではなく増殖信号として作用していると考えられた。(平成10—11年度)

D. 考察

正常乳腺上皮細胞の基質への接着は主にインテグリン β 1、 β 4によることが示唆された。接着自体は増殖因子、アクチン重合を必要としないが、基質への伸展にはアクチンの重合が不可欠で、アクチンに結合した α アクチニンおよび β 1インテグリンの協調により進行し、この伸展が増殖因子に応答した DNA 合成の開始に必須である事が示唆された。従って正常細胞における足場依存性増殖は基質への接着プラス伸

展に依存した増殖と言い換える事ができると考えられ、また増殖に必須な伸展を担う分子としての β 1インテグリン、 α アクチニン、アクチン遺伝子の少なくとも三者は転移に抑制的に作用していると考えられた。ただし増殖信号の伝達によって細胞伸展が具体的にどのような意義を持つのかについては今後の研究課題である。

一方、軟寒天中での増殖能が亢進している乳癌細胞は、基質への接着力が顕著に低下しており、その原因としてインテグリン β 4の発現低下、および β 1の細胞表面への移行異常が考えられた。接着受容体タンパクの翻訳後調節は新たな研究分野として注目される。また基質接着に依存しない増殖は増殖信号の細胞内 PI3-K への伝達と浮遊時特異的な Raf-1-MEK-ERK 経路の活性化を伴う事が示唆された。従って、IGF-I が乳癌細胞の増殖促進因子である事を考えると、PI3-KあるいはERKの活性化阻害が乳癌細胞の増殖抑制に有効である可能性が示唆された。

E. 結論

癌細胞の最も顕著な細胞学的特徴の一つである非足場依存性増殖能の獲得に伴う現象として、
1) 基質受容体インテグリンの発現低下あるいは細胞内移行の異常、
2) 非基質接着時特有の増殖信号伝達経路の活性化、が見い出された。

また、正常細胞の足場依存性増殖に必要な基質上での伸展には β 1インテグリン、 α アクチニン、アクチン繊維が不可欠であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsukatani Y, Suzuki K and Takahashi K: Loss of density-dependent growth inhibition and dissociation of α -catenin from E-cadherin. J Cell Physiol, 173:54-63 (1997)