

論文内容要旨

研究目的

膵癌の発癌メカニズムはまだほとんど解明されていない。現在まで膵癌関連遺伝子として報告されているのは、*K-ras*, *P53*, *MTS1*, *APC*, *DPC4* の5つのみである。我々は膵癌の発生・進展過程を遺伝子レベルで解明するため、まず膵癌の特異的染色体欠失領域について検索し、さらに膵癌の発生、進展におけるミスマッチ修復遺伝子の異常の関与についても臨床病期、組織型による比較検討を加え考察した。

研究結果

まず44例の膵癌症例に対して、全染色体にわたり46カ所のマイクロサテライトマーカーをPCR法で増幅し、Loss of heterozygosity (LOH) を検討した。その結果、1p (6/19, 32%), 6q (10/27, 37%), 9p (13/26, 50%), 12q (7/23, 30%), 17p (17/29, 59%), 18q (9/26, 35%) の合計6カ所が高頻度の染色体欠失を検出した。FAL (mean fractional allelic loss) は、0.18であった。

今回、このうち第12番染色体に焦点を合わせて詳細に検討を加えた。この領域は、胃癌、精巣腫瘍でも特異的染色体欠失が認められている。対象は膵癌66例(乳頭腺癌5例、高分化型管状腺癌17例、中分化型管状腺癌34例、低分化型管状腺癌5例、腺扁平上皮癌2例、他3例)で、第12番染色体長腕上の11個のマイクロサテライトマーカーを用いて検討したところ、12q22-q23.1に1cMの共通欠失領域が同定された。この11個のマイクロサテライトマーカーに少なくとも1箇所の欠失が確認された症例は66例中45例(68%)であった。高頻度のLOHはD12S360で検出された(18/36, 50%)。第12番染色体長腕で少なくとも1箇所のLOHが認められた症例の中の23例による解析結果より共通欠失領域はlinkage map上では12q22-23.1の間、マーカーではD12S360とD12S78の間の1cMの領域であることが示された。

一方、膵癌の染色体欠失を検索すると同時にmicrosatellite instability (MI) についても解析を進めた。それぞれの腫瘍において、平均33個のマーカーでMIを評価した。我々はMIを以下のごとく定義した。(1)MI(+), 2箇所以上でMIが認められる;(2)MI(+/-), 1箇所でのみMIが認められる;(3)MI(-), MIがみられない。今回の検索によりMI(+)は61%(27 of 44), MI(-)は34%(15 of 44)であった。臨床・病理学所見との相関関係はみられなかった。さらにMI(+)症例では、Transforming growth factor β receptor II (*RII*) gene 中の poly (A) tract と GT repeats の領域における変異を調べるためにPCR法で検索した。しかし *RII*

geneの変異は全く認められなかった。

膵癌におけるこれまでの genetic, cytogenetic data では、いずれも検討された腫瘍数が数例～十数例と多くなかった。今回、われわれは66の症例を用いて、まず膵癌の allelotype を解析し、6箇所の癌抑制遺伝子の候補領域：1p, 6q, 9p, 12q, 17p, 18q を同定した。さらに胃癌と精巣腫瘍において、高頻度の染色体欠失が同定されている染色体12番の長腕に焦点をあわせて更なる検討を加えた。ここにはいくつかの腫瘍の発癌に関与する癌抑制遺伝子が存在する可能性が示唆されているが膵癌では詳細な検討がなされてはいなかった。われわれは膵癌において12q21-24.2の領域を詳細に検討し、約1cMの領域に共通欠失領域があることを示した。

審査結果の要旨

近年の分子生物学の進歩により、癌は遺伝子異常の蓄積によって発生し、増悪していくことが明らかになってきた。これまでに種々の癌において多段階発癌モデルが提唱され、特に大腸癌では、発癌過程における変化の多くが分子生物学的に明らかにされてきている。一方、膵癌においては、その発癌過程はこれまでほとんど明らかにされておらず、また近年の優れた診断法および治療法にもかかわらず、膵癌はいまだにもっとも難治性の癌の一つである。膵癌に対する効果的な新しい診断・治療の方法を開発するためには、まずその発癌メカニズムを解明し、発癌の根源に関わる遺伝子異常に対してアプローチすることが必要である。

本論文は、膵臓における発癌メカニズムを解明する第一歩として、初めに癌抑制遺伝子の局在領域を推定するため、44例の膵癌症例に由来する癌部と健常部のDNAを用いて特異的染色体欠失領域を検索した。その結果、30%以上の高頻度の染色体欠失を1p (32%), 6q (37%), 9p (50%), 12q (30%), 17p (59%), 18q (35%)の合計6か所で検出した。次いで、これらの領域のうち、胃癌や精巣腫瘍でも特異的染色体欠失が認められている第12番染色体長腕に焦点を当て、66例の膵癌サンプルを用いて詳細な欠失地図を作成し、12q22-q23.1に1cMの共通欠失領域を同定した。さらに、マイクロサテライト領域の不安定性(MI)についても検討したが、44例の膵癌のうち5例(11.4%)において検索したマーカーのうちの30%以上でMI(+)の大腸癌や胃癌ではtransforming growth factor β (TGF β) receptor II型(RII)遺伝子における高頻度の異常が報告されているが、膵癌ではRII遺伝子に変異は全く検出されなかった。この事実から、TGF β を介する増殖抑制系の役割が膵臓においては胃や大腸とは異なっていることを示唆した。

膵臓は、数ある癌腫のなかでも特に浸潤傾向が強く、そのため、癌組織の中に間質が混入する程度が極めて高い。癌組織から癌細胞のみを採取してDNAを抽出するのはかなり困難で、それを克服するために多大なる努力と忍耐を要したであろうことは想像に難くない。実際、膵癌における同様の報告をみても、これまでは20例弱の症例数での検討しかなく、本研究のように96例からのDNA抽出、さらに66例に絞り込んだ詳細な検討には研究者の気迫と執念が感じられる。また、本研究において、これまで不明であった膵癌の遺伝子異常について分子生物学的にアプローチし、第12番染色体長腕において1cMという極めて狭い共通欠失領域を同定したが、このことは、今後の癌抑制遺伝子単離へ向けての研究に多大な貢献をするであろう。本研究成果は、科学的に非常に価値のあるものであり、学位論文として申し分ないものと判断する。