

氏 名（本籍）	井 上 寛 子 <small>いの うえ ひろ こと</small>
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 7 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 26 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 外 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	膵管内乳頭腫瘍における18番染色体長腕の LOH 検索と SMAD4 遺伝子の検討

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教 授 松 野 正 紀	教 授 堀 井 明
	教 授 野 田 哲 生	教 授 田 村 眞 理

論文内容要旨

研究目的

膵管内乳頭腫瘍 (intraductal papillary-mucinous tumor of the pancreas 以下 IPMT) は膵管上皮を発生母地とし、緩徐に過形成、異形成そして癌へと進展する特徴を有している。このため、IPMT の染色体・遺伝子変異を検索することは通常型膵管癌の発生メカニズムを理解するの観点になると考えられる。既に我々は *SMAD4* を含む 18q の欠失が IPMT において膵癌と同程度の高い頻度で見られること、この現象が IPMT のなかで比較的異型度の軽い病変から見られること、を明らかにしており、18q の欠失が膵管上皮の異形成変化に関与し、その変化が発癌につながるのではないかと考えている。しかし、仮に 18q の異常が膵癌の発生過程における初期変化であったとしても、その標的遺伝子が *SMAD4* であるか否かは不明である。そこで膵癌の発生初期における *SMAD4* の役割を明らかにするために IPMT における 18q の検索と *SMAD4* の変異の検討を行った。

研究方法

症例は東北大学第一外科とその関連病院で 1988 年 1 月から 1993 年 8 月までに経験した IPMT 切除症例のうち、浸潤を伴わない異形成病変である mild dysplasia (前癌病変に相当) 4 例, severe dysplasia/carcinoma *in situ* (上皮内癌に相当) 14 例の合計 18 例を用いた。ホルマリン固定されたパラフィンブロックから LCM (laser capture microdissection) により腫瘍細胞と正常細胞を採取、DNA を抽出後、18q にマップされている 3 種類のマイクロサテライトマーカー (D18S462, D18S474, D18S451) を用いて LOH 解析を行い、更に PCR-SSCP による *SMAD4* の遺伝子異常を検討した。

研究結果

LOH の頻度は D18S451 で 31% (4/13), D18S474 で 50% (7/14), D18S462 で 31% (3/10) で D18S474 で最も頻度の高い欠失が見られた。*SMAD4* は最も高頻度の欠失が見られた D18S474 から 2.33cR セントロメア側に位置している。従って、膵の発がん過程における膵管上皮の異形成変化に *SMAD4* の異常が関与する可能性が示唆された。そこで、LOH 解析に用いた IPMT 症例 16 例を含んだ 18 例で PCR-SSCP を行ったところ、症例 5 のエクソン 8 (コドン 337) に変異がみられた。これは GAG が GAA となる変化であったが、コードするアミノ酸はいずれもグルタミン酸であった。多型の可能性も考え、この症例の正常の塩基配列を調べたが、

GAGであった。このことから症例5のコドン337で見られた変化は体細胞変異であるが、コードするアミノ酸は変わらず、遺伝子に機能的な異常をもたらすような変化ではないと考えられた。病変組織に*SMAD4*のホモ欠質がないことを確認するため、この実験に用いた症例の免疫染色を行ったところ、全例の病変部でSMAD4抗体の染色を確認した。この事は病変部にSMAD4タンパクがホモ欠質していないというひとつの根拠と考えられた。

結 論

IPMT症例を用いた18qのLOH解析ではSMAD4近傍で高頻度の欠失が見られ、その異常と膵管上皮の異形成変化との関連が疑われた。しかし詳細な解析を行ったところSMAD4遺伝子の機能異常をもたらすような変化は認められなかった。これらのことからSMAD4の異常は膵癌の多段階発癌過程において、初期の段階で関与する可能性は低く、高頻度の欠質を示したSMAD4近傍の18q領域には膵癌の初期発生に関与する未知の遺伝子が存在する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

膵管内乳頭腫瘍 (intraductal papillary-mucinous tumor of the pancreas 以下 IPMT) は膵管上皮を発生母地とし、緩徐に過形成、異形成そして癌へと進展する特徴を有している。このため、IPMT の染色体・遺伝子変異を検索することは通常型膵管癌の発生メカニズムを理解するてがかりになると考えられた。既に *SMAD4* を含む 18q の欠失が IPMT において膵癌と同程度の高い頻度で見られること、この現象が IPMT のなかで比較的異型度の軽い病変から見られることから、18q の欠失が膵管上皮の異形成変化に関与し、その変化が発癌につながるのではないかと考えた。しかし、18q の異常が膵癌の発生過程における初期変化であったとしても、その標的遺伝子が *SMAD4* であるか否かは不明であったため、膵癌の初期の病態における *SMAD4* の役割を明らかにする目的で IPMT における 18q の検索と *SMAD4* の変異の検討を行った。

対象症例は、IPMT 切除症例のうち、浸潤を伴わない異形成病変である mild dysplasia (前癌病変に相当) 4 例, severe dysplasia/carcinoma *in situ* (上皮内癌に相当) 14 例の合計 18 例を用い、LCM (laser capture microdissection) で腫瘍細胞と正常細胞を採取した。DNA を抽出後、18q にマップされている 3 種類のマイクロサテライトマーカー (D18S462, D18S474, D18S451) を用いて LOH 解析を行い、更に PCR-SSCP による *SMAD4* の遺伝子異常を検討した。

LOH の頻度は D18S451 で 31% (4/13), D18S474 で 50% (7/14), D18S462 で 31% (3/10) で D18S474 で最も頻度の高い欠失が見られた。*SMAD4* は最も高頻度の欠失が見られた D18S474 から 2.33cR セントロメア側に位置していることから、膵の発がん過程における膵管上皮の異形成変化に *SMAD4* の異常が関与する可能性が示唆された。そこで、LOH 解析に用いた IPMT 症例 16 例を含む 18 例の PCR-SSCP を行ったところ、症例 5 のエクソン 8 (コドン 337) に異常がみられた。これは GAG が GAA となる変化であったが、コードするアミノ酸はいずれもグルタミン酸であった。この症例の正常細胞の塩基配列は、GAG であったことから症例 5 のコドン 337 で見られた変化は体細胞変異であるが、コードするアミノ酸は変わらず、遺伝子に機能的な異常をもたらすような変化ではないと考えられた。病変組織に *SMAD4* のホモ欠質がないことを確認するため、この実験に用いた症例の免疫染色を行ったところ、全例の病変部で *SMAD4* 抗体の染色を確認した。

IPMT 症例を用いた 18q の LOH 解析では *SMAD4* 近傍で高頻度の欠失が見られ、*SMAD4* の異常と膵管上皮の異形成変化との関連が疑われた。しかし *SMAD4* 遺伝子の機能異常をもたらすような変化は認められず、免疫染色で病変組織に正常組織と同様の染色がみられたことから、*SMAD4* の異常は膵癌の多段階発癌過程において、初期の段階で関与する可能性は低く、高頻度の欠質を示した *SMAD4* 近傍の 18q 領域には膵癌の初期発生に関与する未知の遺伝子が存在する可能性が示唆された。

この様に、膵癌の初期病変を意識して行われた IPMT を用いた 18q の異常の検索は今までなされておらず、更に、そこに新しい癌抑制遺伝子の存在する可能性を示唆した点で本研究は独創的であり、学位に値するものである。