

氏名(本籍)	神谷純広(京都府)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士第386号		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位授与年月日	平成13年12月12日		
学位論文題目	Intratumoral Regional Variations in Copy Number of Chromosomal Part Revealed by Microdissection and Combined Ploidy and Comparative Genomic Hybridization Analyses in Esophageal Squamous Cell Carcinoma (食道扁平上皮癌を用いたDNAコピー数異常の腫瘍内多様性の解析)		
	審査委員	主査 教授	木村 博
		副査 教授	小笠原 一誠
		副査 教授	岡部 英俊

## 論文内容の要旨

### 【目的】

食道癌の発生と進展に関する染色体部分のコピー数変化をCGHをもちいて明らかにする。

CGHは全染色体の増減をスクリーニングする方法であるが、多くの結果のうちどれが早期に起こった変化かをこれだけで推測することは不可能である。症例内で多数箇所をサンプリングしてCGHを行うことにより共通性などにより結果を分類し起こった時期を推定する。このためにはより均一なサンプルが必要となる。DOPPCR法でprobeを作成し微少な部分でのCGHを可能とすることにより均一となる少量のサンプリングを行う。CGHの結果にploidyを加えてコピー数を推定することを考え、shift sizeについても検討する。

### 【方法】

材料は外膜浸潤のある2型腫瘍と表層拡大型の2症例の食道癌手術標本である。食道癌外科手術切除標本を4%パラホルムアルデヒドで1晩固定した後パラフィン抱埋してブロックを作成した。5 $\mu$ mの薄切切片よりAは3カ所、Bは4カ所のneedle microdissectionを行った。PK処理して抽出したDNA溶液をDOPPCRにて全DNA量を増幅しlabelingしてCGHを施行した。

また同じブロックより50 $\mu$ mの切片を切り出し同様に裸核浮遊液を作成し核DNA量を顕微測光にて測定した。対照リンパ球を2Cとしてploidyを決定した。1.5C~2.4Cをdiploid、2.5C~3.4Cをtriploid、3.5C~4.4Cをtetraploidと分類した。

CGHの結果は0.8<をloss、1.2>をgainとした。また0.65<と1.35>はlarge-shiftとし、変化をlarge-shiftとsmall-shiftに分類した。

### 【結果】

caseAはsm、pm、adの進達度より、caseBはm、sm、m、mより採取された。CaseAは1つがdiploidとtetraploidのmulti modeで残りの2つはtriploidであった。CaseBは2つがdiploidで1つがdiploidとtriploidのmulti modeで、1つがtriploidであった。

CGHの結果：それぞれのサンプルは、症例内に共通の変化とサンプルごとに固有の変化を持っていた。CaseAに共通なものはgain (1q、2q、3q、6q、7p、8q、12q、13q、18q、20p) とloss (4p、9q、16q) でcaseBに共通なものはgain (2q、3q、5p、8q、Xq) とloss (17q、21q) であった。Large-shiftに分類される変化は多くは共通な変化に含まれた。またこのlarge-shiftで共通な変化はbreakpointも一致していた。

### 【考察】

CGHでスクリーニングされる変化の時期を解析しようとする為に多数箇所のサンプリングするときにはできるだけ均一で微少な細胞集団よりDNAを採取する必要がある。このためDOPPCRを

用いてDNAを増幅しプローブを作製しCGHを行う方法を確立した。この方法を用いて腫瘍内の多数カ所のサンプルより共通性について解析した。その結果、全てのサンプルには症例内に共通の変化とそれぞれに特有の変化が認められた。症例内に共通である変化にはこの症例において初期に起こる変化が含まれていると考えられた。

核DNA量とCGHのprofileにより染色体部分のコピー数が推定できる。今回分類したlargeとsmallはコピー数の変化から考えるとそれぞれ2コピー以上の変化と1コピーの変化を表していると考えられた。Aneuploid (near triploid以上)の細胞はdiploidのものが倍数化した後のものと考えられる。Diploidの時の1コピーの変化は倍数化した後は2コピーの変化になる。Aneuploidのサンプルでの2コピーの変化はdiploidの時期に起こった変化であり、large-shiftの変化はこのdiploidの時期に起こった変化を表すと推定できる。Large-shiftの変化の多くは症例に共通な変化に多く含まれていたことより、この共通でlarge-shiftの変化がこの症例において一番基本になる変化を表していると考えられた。これをstemlineとして他の変化を進展したsidelineとして樹形図上にプロットすることができたが、中にはプロットできず染色体の不安定性を反映していると考えられる変化も見られた。

#### 【結 論】

CGHの結果に核DNA量の測定結果を加えてコピー数を考慮することによりdiploidの時に起こる変化を推定できた。腫瘍内多数箇所のサンプリングによる共通性に加えて結果を分類することにより細かく推定できるようになる。今後多数の症例で施行することにより癌の発生初期に関連する遺伝子異常を見つけることができると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

CGHは癌の全染色体の増減をスクリーニングする方法である。食道癌に関しても多くの染色体変化が見つかったが、この変化の重要性や起こった時期を推定することはできなかった。

今回、症例内の複数箇所でサンプリングし、染色体変化の中で共通にあるものが早期の変化と考え、結果を検討している。このため、できるだけ微少な細胞集団より抽出した全DNAを増幅してCGHを行う方法を改良した。また、染色体の増減を定量的に評価することによっても個々のサンプルで早期に起こる変化を推定できた。この2つの方法から得られた早期の変化は互いに多くが一致していた。この一致した変化は染色体上の変化の位置も共通しており、これが一番初期の基本になる変化を表していると考えられた。全てのサンプルはこの基本になる変化にそれぞれに固有の変化が加わっていた。

本研究は、染色体の増減を症例内の複数箇所で調べることにより、染色体異常の起こった時期を個々の症例で推定することが出来ることを示したもので、博士(医学)授与に値するものと認める。