

| | | | |
|---------|--|----|---------|
| 氏名・(本籍) | 内 藤 弘 之 (熊本県) | | |
| 学位の種類 | 博士 (医学) | | |
| 学位記番号 | 博士第202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7年6月27日 | | |
| 学位論文題目 | Overexpression and Localization of Cyclin D1 mRNA and Antigen in Esophageal Cancer (食道癌における Cyclin D1 mRNA および蛋白の過剰発現および局在) | | |
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 大久保 岩 男 |
| | 副査 | 教授 | 服 部 隆 則 |
| | 副査 | 教授 | 小 玉 正 智 |

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

癌の病態を考えるうえで、癌細胞の無秩序な増殖が重要である。近年、癌細胞において数多くの遺伝子異常が報告されているが、そのなかで11q13領域に存在する int-2、hst-1 は食道癌において増幅しており、増幅例の予後が不良であると報告されている。しかし、mRNA や蛋白の過剰発現が認められないことから、その近傍により重要な遺伝子の存在が示唆されていた。

Cyclin D1 は細胞周期を制御している蛋白で、それをコードしている遺伝子は int-2、hst-1 同様11q13に位置しており、ノーザンブロット法を用いた検索で mRNA レベルの過剰発現が認められるため、癌の進展により重要な意味を持つと考えられる。今回申請者は食道癌における cyclin D1 mRNA、蛋白の局在、およびその臨床的意義を検討した。

[方 法]

食道癌17例の、4%パラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋切片を用いて、免疫組織化学的に cyclin D1 蛋白の発現を、in situ hybridization を用いて cyclin D1 mRNA の発現を検討した。12例においては凍結組織より DNA を抽出し、サザンブロット法により cyclin D1 遺伝子の増幅を検討した。免疫染色はポリクローナル体 (UBI社) を使用した。プローブは RT-PCR により合成した cyclin D1 cDNA (434bp) を ECL system でラベルしたものをサザンブロット法に、pCR-Script SK+に挿入し、T7 RNA polymerase で合成した RNA プローブを in situ hybridization に用いた。さらに、55例のホルマリン固定パラフィン包埋切片に免疫染色を施行し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

[結 果]

cyclin D1 蛋白は17例中12例 (71%) の癌細胞の核に陽性所見が認められた。癌包巣中心部に比較して、辺縁部に陽性細胞が多かった。Cyclin D1 mRNA は17例中7例 (41%) の癌細胞の細胞質に発現していた。cyclin D1 遺伝子の増幅は12例中5例 (41%) に認められた。増幅を認めた5例において cyclin D1 蛋白は全例強く発現しており (++)、mRNA も4例では強く (++)、1例では弱く発現 (+) していた。増幅を認めなかった7例中、mRNA は1例のみ弱く発現 (+) しており、6例は陰性 (-) であった。一方、蛋白では陰性 (-) 2例で、5例では弱く発現 (+) していた。食道癌55例を cyclin D1 強陽性群 (++) と、弱陽性もしくは陰性群 (+、-) とで比較すると、前者の5年生存率は7%、後者では59%と有意に cyclin D1 強陽性群の予後は不良であった。

[考 察]

食道癌は消化器癌のなかでも最も悪い癌のひとつである。その予後を改善するためには、

早期発見に努めることや、外科手術を含めた適切な治療を行うことが重要であると同時に、術前あるいは術後に各症例の生物学的悪性度を正確に把握することが重要である。そういう意味で、遺伝子異常を含めた多くのパラメーターについて報告され、そのなかで特に、11q13に存在する *int-2*、*hst-1* の増幅は食道癌の予後を規定する因子として重要であるとされてきた。しかし、その過剰発現が証明されないことから、*int-2*、*hst-1* の近傍により重要な意味を持つ遺伝子の存在が考えられ、そこで注目されたのが、やはり11q13に存在する *cyclin D1* 遺伝子である。食道癌における *cyclin D1* の報告としては、Jiang らは *hst-1* との *coamplification* は25%に認められたとし、cell line における mRNA レベルでの過剰発現を報告している。Tsuruta らは31.3%に *cyclin D1* 遺伝子の増幅を認め、mRNA の過剰発現も認めるとしている。しかし、*in situ hybridization* による mRNA の局在、*cyclin D1* 蛋白の発現と臨床病理学的因子との関連を検討した報告は申請者がはじめてである。

Cyclin D1 遺伝子の増幅に伴い、*cyclin D1* mRNA の過剰発現が癌細胞の細胞質にみられ、さらに *cyclin D1* 蛋白の過剰発現を癌細胞の核に証明することができた。細胞増殖制御する *cyclin D1* が癌細胞に強く発現することから、*cyclin D1* は食道癌の進展に大きく関与していることが示唆される。臨床的意義を検討する目的で、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた retrospective な検討を行ったところ、*cyclin D1* 陽性率の高い症例の予後が悪いことより、*cyclin D1* は食道癌の予後を規定する重要な因子であると結論づけられる。そして、*cyclin D1* の検索が免疫組織化学的に可能であることが証明できたことにより、各症例の生物学的悪性度が簡単に把握でき、手術方法の選択や、化学療法を含めた術後の follow up に有用であると考えられる。

【結 論】

Cyclin D1 遺伝子の増幅に伴い、*cyclin D1* mRNA の過剰発現が癌細胞の細胞質に、*cyclin D1* 蛋白の過剰発現を癌細胞の核に証明することができた。*cyclin D1* は食道癌の進展に大きく関与していることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

近年、癌細胞において数多くの遺伝子異常が報告されているが、そのなかで11q13領域に存在する *int-2*、*hst-1* は食道癌において増幅しており、増幅例の予後が不良であると報告されている。しかし、mRNA やタンパクの過剰発現が認められないことから、その近傍により重要な遺伝子の存在が示唆されていた。*Cyclin D1* は細胞周期を制御しているタンパクで、それをコードしている遺伝子は *int-2*、*hst-1* と同様11q13に位置している。著者らは食道癌における *cyclin D1* の関与を検討するために *cyclin D1* 遺伝子の増幅、mRNA、タンパクの局在、およびその臨床的意義を検討した。DNAの増幅はサザンブロット法により、タンパクの発現は免疫組織化学染色で、*cyclin D1* mRNA の発現は *in situ hybridization* で調べた。

その結果、*cyclin D1* 遺伝子の増幅に伴い、*cyclin D1* mRNA の過剰発現が癌細胞の細胞質にみられ、さらに *cyclin D1* タンパクの過剰発現は、癌細胞の核に証明された。細胞増殖を制御する *cyclin D1* が癌細胞に強く発現することから、*cyclin D1* は食道癌の進展に大きく関与していることが示唆された。Retrospective な検討では、*cyclin D1* 陽性率の高い症例の予後が悪いことにより、*cyclin D1* は食道癌の予後を規定する重要な因子であると結論づけられた。さらに、*cyclin D1* の検索が免疫組織化学的に可能であることが証明できたことにより、各症例の生物学的悪性度が簡単に把握でき、手術方法の選択や、化学療法を含めた術後の追跡に有用であると考えられた。以上のことから、本研究は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと評価される。