

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

腫瘍グレードに基づいた分化型早期胃癌の分子病理学的解析

織笠 俊輔^{1),2)}, 菅井 有¹⁾, 松井 雄介^{1),3)}, 杉本 亮¹⁾,
遠藤 昌樹²⁾, 千葉 俊美²⁾

¹⁾岩手医科大学医学部, 病理学講座: 分子病理学分野

²⁾岩手医科大学医学部, 内科学講座: 消化器・肝臓内科分野

³⁾岩手医科大学医学部, 外科学講座

running title : 分化型早期胃癌の分子病理学的解析

織笠俊輔, 他

要旨

分化型胃癌は核異型度の違いにより臨床病理学的および分子病理学的特徴に差異があることが指摘されている。我々は分化型早期胃癌を核異型度ではなく腫瘍グレード別に分類し、分化型早期胃癌の臨床病理学的、分子病理学的特徴を検討した。内視鏡的胃粘膜下層剥離術により得られた分化型早期胃癌106例を対象に各種免疫組織化学染色、Loss of heterozygosity (LOH) 解析およびDNAメチル化解析による分子解析を行った。低グレード癌、中等度グレード癌で高分化型癌の頻度が高く、高グレード癌で中分化型癌の頻度が高かった。高グレード癌では粘膜下層への浸潤例が多かった。低グレード癌、中等度グレード癌と比較して高グレード癌でLOH率およびp53の過剰発現の頻度が高かった。メチル化率は中等度グレード癌、高グレード癌で差異はみられなかったが、低グレード癌で頻度が高かった。腫瘍グレードは分化型粘膜内癌の臨床病理学的及び分子レベルの悪性度を示しているものと思われた。

Key words : gastric cancer, tumor grade, methylation, LOH

I. 緒言

分化型胃癌は低異型度から高異型度まで、種々の程度の核異型度を示す癌で構成され、核異型度の違いにより臨床病理学的および分子病理学的特徴に差異があることが指摘されている¹⁾。我々²⁾はこれまで核異型に基づいた分類を用いて低異型度癌の分子異常解析を報告してきたが、日常診療上は必ずしも核異型度のみで癌の診断が行われている訳ではなく、核異型度だけに基づく分類では癌の臨床病理学的特徴を十分に反映しているとは言い難いと思われる。実際の病理診断においても核異型が軽度でありながら粘膜下層に浸潤する癌を経験することもあり、核異型のみで癌をグレード化することには限界があるものと思われる。癌の異型度は核異型（細胞異型）と構造異型で規定されているので、胃癌の粘膜内癌の場合も構造異型も含めた新しい腫瘍グレードを規定する必要があるものと思われる。

上記のことから、我々は核異型（細胞異型）と構造異型の観点から粘膜内癌の組織学的腫瘍グレードを独自に定義し、それぞれ低グレード、中等度グレードおよび高グレードと分類し臨床病理学的検討を行ってきた³⁾。その結果では、腺腫と粘膜内癌

の各グレード腫瘍群との比較において、腺腫と低グレード癌では臨床病理学的に共通点が多いことが明らかになった。一方粘膜下層への浸潤に関しては、低グレード癌では浸潤する可能性が低いものの、中等度グレード以上の癌では粘膜下層に浸潤する可能性がある。このことは低グレード癌と中等度、高度グレード癌の生物学的差異を示している可能性があり、粘膜内癌のグレード化の臨床病理学的正当性を表しているものと思われる。上記のことから、胃粘膜内癌を構成する各癌細胞のグレード分類の臨床病理学的、分子病理学的意義を明らかにすることは、胃粘膜内癌の診断・治療にも有用な知見を提供することになるものと思われる。

本稿では、内視鏡的胃粘膜下層剥離術(endoscopic submucosal dissection; ESD)によって得られた分化型早期胃癌を腫瘍グレード別に分類し、これに基づいた分化型胃癌の臨床病理学的および分子病理学的特徴を明らかにすることを目的にした。

II. 研究対象および方法

1. 患者の臨床病理学的所見

2008年から2010年の間に岩手医科大学消化器肝臓内科でESDにより得られた分化型早期胃癌106例を対象とした。表1にその内訳を示す。肉眼型、組織型、深達度の分類については「胃癌取り扱い規約」に従った⁴⁾。

2. 腫瘍グレードの診断基準

低グレード癌の組織学的特徴を菅井らの基準²⁾を基に表2に、高グレード癌の組織学的特徴を表3に示した。本研究の低グレード癌、高グレード癌の診断はこれらの基準に従って診断を行った。中等度グレードは低グレード癌、高グレード癌以外の中間的組織像を示した例について診断した。低グレード癌、中等度グレード癌、高グレード癌の代表的な組織像を図1に示す。

3. 解析過程

ESDにより得られた材料は、癌の部分を生検鉗子で新鮮材料より採取した。残りの材料は伸展したのち10%緩衝ホルマリンで固定し、「胃癌取り扱い規約」に従って標本を全製作製した⁴⁾。新鮮材料を採取した近傍の組織切片を用いて、免疫染色を行った。免疫染色は、自動免疫染色装置(Dako Autostainer)を用いた。抗体の内訳は、p53(clone, D07, DAKO, Carpinteria,

USA) , MUC2 (Ccp58, Novocastra Laboratories) , CD10 (56C6, Novocastra Laboratories) , MUC5AC (CLH2 , Novocastra Laboratories) , MUC6 (CLH5, Novocastra Laboratories) である。

4. 染色性の判定方法

染色態度については、p53 過剰発現の判定は、核内に明瞭に染色され、かつ全体の 30%以上染色されるものを過剰発現有り、と判定した¹⁾。弱い染色性を示したものは、びまん性であっても陰性とした¹⁾。

5. 粘液形質の判定

粘液形質の判定は、Yao ら⁵⁾の基準に従って腫瘍組織のみの染色性で判定した。この基準に従い、組織像を胃型、腸型、混合型、分類不能型の 4 型に分類した。

6. 正常組織および癌の DNA 抽出

癌および正常粘膜の DNA を抽出した。分子解析に用いた新鮮組織の組織学的所見については、採取された新鮮材料の近傍の組織標本の所見を代用した。

7. 分子解析

本研究の分子異常解析は、1) allelic imbalance [本研究で用いた染色体のアレルは癌抑制遺伝子のある領域であるので、以後 LOH (loss of heterozygosity) と表現することにする] , 2) MSI (microsatellite instability) , 3) DNA メチル化異常、の3点について検討を行った。LOH の解析は PCR-LOH 法を用いて行い、LOH の判定は Habano ら⁶⁾の算出式に基づいて行った (q value が 0.7 以下を LOH ありとした)。

解析対象とした染色体は 1p, 3p, 4p, 5q, 8q, 13q, 17p, 18q, 22q を用いた。各マイクロサテライトマーカーは以下のものを用いた (D1S228, D1S548, D3S2402, D3S1234, D4S2639, D4S1601, D5S107, D5S346, D5S299, D5S82, D8S201, D8S513, D8S532, D13S162, TP53, D18S487, D18S34, D22S274, D22S1140, D22S1168) 。 2) については、BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 および D17S250 の各マーカーを用いて 1) と同様の PCR-LOH 法で行った。MSI の判定は Boland⁷⁾ らの基準に従った。1) については Bisulfite-pyrosequencing 法で行った。本研究では *MLH-1*, *RUNX3*, *p16*, *RASSF2A*, *SFRP1*, *SFRP2*, *DKK-2*, *DKK-3*, *IGFBP7* および *miR34b/c* の各遺伝子のプロモーター領域についてメチル化を検索した。

8. LOH status と methylation status

LOH status は 1 つの腫瘍に際して解析した LOH の合計が 50% 以上みられたものを LOH-High, それ未満を LOH-low とした. Methylation status については, 10 個のマーカーのうち, 5 個以上メチル化がみられたものを methylation-high, それ未満のものを methylation-low と分類した. LOH status および methylation status はそれぞれ LOH およびメチル化の蓄積程度を表している.

9. 統計解析

各々 2 群間の統計解析は χ^2 検定で行った. $p < 0.05$ を有意差ありと判定した.

III. 結果

1. 臨床病理学的検討

腫瘍グレード別臨床病理学的内訳を表 4 に示す. 組織型では高分化型の頻度が低グレード癌群, 中等度グレード癌群で高グレード癌群と比較して高く, 中分化型の頻度が高グレード癌群のほうで低グレード癌群, 中等度グレード癌群と比較して高か

った（それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$ ）．深達度では粘膜内癌の頻度が低グレード癌群，中等度グレード癌群で高グレード癌群と比較して高く，sm2 までの浸潤癌の頻度が高グレード癌群のほうで低グレード癌群，中等度グレード癌群と比較して高かった（それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$ ）．

2. 腫瘍グレードに基づいた各粘液形質, p53 過剰発現の解析（図 2, 図 3）

粘液形質別では低グレード癌群では腸型胃癌の頻度が高く、中等度グレード癌群では混合型胃癌の頻度が高かった ($p < 0.05$)．低グレード癌群，中等度グレード癌群と比較して高グレード癌群で p53 の過剰発現例が有意に多かった ($p < 0.01$)．一方，中等度グレード癌群は低グレード癌群と高グレード癌群の中間的な分布傾向であった．

3. 腫瘍グレードに基づいた各染色体アレルにおける LOH の頻度（図 4）

5q の LOH の頻度は各グレードに共通して高かった．18q の LOH の頻度は高グレード癌群で低グレード癌群もしくは中等度グレード癌群と比較して有意に高かった（それぞれ $p < 0.05$ ）．

9pLOH, 17pLOH, 22qLOH は高グレード癌群で低グレード癌群と比較して LOH 率が有意に高かった（それぞれ $p < 0.05$ ）が、中等度グレード癌群と高グレード癌群間に有意な差はみられなかった。

4. 腫瘍グレードに基づいた各遺伝子のメチル化解析（図 5）

SFRP1, *SFRP2*, *DKK2* および *mir34b/c* 遺伝子において DNA メチル化の頻度が各グレード群に共通して高かったが、低グレード癌群で *SFRP1*, *DKK2* および *mir34b/c* のメチル化の頻度が中等度グレード癌群, 高グレード癌群と比較して高かった（それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ ）。一方, *DKK-3*, *MLH-1*, *p16*, *RASSF2A*, *IGFBP7* のメチル化頻度は各グレード群でいずれも低かった。*RUNX3* のメチル化頻度は各グレード間で中間的な頻度であった。

5. 腫瘍グレードに基づいた LOH status と methylation status および MSI 解析（図 6）

高グレード癌群では低グレード癌群 ($p < 0.05$) , 中等度グレード癌群 ($p < 0.01$) と比較して有意に高 LOH status が高かった。一方, methylation status は低グレード癌群において中等度グレー

ド癌群, 高グレード癌群と比較して methylation-high の頻度が高かった (それぞれ $p < 0.05$) . MSI は 3 群間に有意な差はみられなかった.

IV. 考察

膀胱癌, 腎癌, 大腸腺腫, 子宮内膜癌, 前立腺癌など, 腫瘍細胞のグレード化はその腫瘍の悪性度や予後を推測する上で重要な因子と考えられてきた⁸⁾⁻¹²⁾. しかし, 胃癌特に粘膜内癌における腫瘍細胞のグレード化はこれまで行われてこなかった. 粘膜内癌の治療の主流がESDに変わってきた現在, 腫瘍のグレードは治療選択の上からも重要性が増していると思われる. 我々は, 胃粘膜内癌のグレードについて検討を行ってきたが, 核異型のみに基づいたものであった²⁾. しかしながら, 腫瘍の悪性度は, 核異型のみではなく, 構造異型も反映していることが知られており, 核異型のみでのグレード化では十分に腫瘍の悪性度を反映していない可能性がある. 本研究では分化型早期胃癌の解析を腫瘍グレードに基づいて臨床病理学的及び分子病理学的観点から行った.

本研究では腫瘍グレード別の組織型の頻度は低グレード癌では全例高分化型腺癌であり，高グレード癌においては対照的に中分化型腺癌が多くみられた．中等度グレード癌ではその中間的な頻度であった．中分化腺癌は粘膜下層以深の浸潤例、特に進行癌で多くみられることが知られており，高グレード癌において中分化腺癌が多いということは組織型の上からも高グレード癌の悪性度の高さを表しているものと思われた．

これまで低グレード癌は臨床病理学的に腺腫と共通の所見が多いという報告がされており³⁾，低グレード癌は中等度グレード癌および高グレード癌とは臨床病理学的にも異なる腫瘍群にある可能性が示唆されていた．粘膜下層浸潤の有無の検討においても低グレード癌では粘膜下層浸潤例はみられず，一方，中等度グレード及び高グレード癌とグレードが上がるにつれ粘膜下層以深への浸潤が有意に多くみられた．このことは低グレード癌が粘膜下層へ浸潤しない可能性を示唆し，組織型で述べた低グレード癌が中等度グレード癌および高グレード癌とは異なる腫瘍群であるという考えの正当性を示していると思われる．

本研究において，低グレード癌および中等度グレード癌では

p53 過剰発現は稀で、高グレード癌では p53 の過剰発現が各群間と比較して有意に高かった。過去の報告で胃癌の p53 過剰発現は癌の核異型度に相関していることが指摘されているが¹³⁾¹⁴⁾、構造異型を含めた腫瘍グレードも同様に相関関係がみられた。

p53 過剰発現もしくは p53 変異が分化型胃癌の腫瘍発生に主要な役割を担っているという報告があるが¹⁾、それらが分化型胃癌の腫瘍発生に関連するのは高グレード癌のみである。このことは、p53 過剰発現が腫瘍細胞の高グレード化に関与している可能性を示唆しているものと思われた。また腺腫と癌の鑑別診断に p53 過剰発現の有無を利用することもあるが、p53 過剰発現は腺腫と癌の鑑別診断には有用性は低いものと思われた。

癌関連遺伝子、特に癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化は、癌の発生に密接に関与していることがわかってきた¹⁵⁾。実際多くの癌でメチル化異常が報告され、癌の発生と遺伝子のメチル化との関連について多くの知見が集積されている¹⁶⁾。本研究では各遺伝子のメチル化頻度は、いずれのグレード群でも比較的高率にみられた。*SFRP1*, *SFRP2*, *DKK2*, *mir34b/c* はいずれも高頻度に見られることから、胃癌において共通の分子異

常と考えられるが、特に *SFRP1*, *DKK2*, *mir34b/c* は低グレード癌において特に高いメチル化を示した。このことは *SFRP2* のみが各グレードに共通の分子異常であり、*SFRP1*, *DKK2*, *mir34b/c* は低グレード癌の発生を特徴づけている可能性を示唆している。また、低グレード癌において methylation-high の頻度が高かったという結果もこのことを裏付けていると思われる。

LOH は、癌の共通の分子異常として従来より広く受け入れられてきた¹¹⁾。本研究は腫瘍グレードによって各染色体の LOH の頻度が異なっていることを明らかにした。5q LOH は各グレードに共通しており、5q LOH は分化型胃癌の初期の腫瘍発生に関連していることを示している。低グレード癌では全体に各染色体の LOH 率は低く、このことは低グレード癌にはゲノムレベルの変化がほとんどみられないことを示している。17p, 18q および 22q の LOH は、高グレード癌群で他の各群間と比較して有意な差がみられた。これらの染色体領域の LOH は高グレード癌の発生に密接に関与している可能性がある。LOH の蓄積は低グレード癌で有意に低く、このことは低グレード癌でゲノムレベルの変化がほとんどみられないことを示唆していると思われる。

本研究では腫瘍グレード間には臨床病理学的に明確な差異があることが示された。胃癌の発生にはメチル化の蓄積が重要な役割を担っているが、高グレード癌の発生は p53 の過剰発現やゲノムレベルの異常が重要であることが示された。低グレード癌は分子異常の観点からは中等度グレード癌、高グレード癌とは異なる腫瘍群であることが示唆された。

稿を終えるにあたり，本研究の遂行に際してご協力頂きました
本学内科学講座消化器肝臓内科分野の諸先生方，解析室の菅原
江利佳女史，葛西俊之氏，そして中央臨床検査部の検査技師の
皆様に深く感謝いたします。

文献

- 1) Sugai T, Inomata M, Uesugi N, et al. : Analysis of mucin, p53 protein and Ki-67 expressions in gastric differentiated-type intramucosal neoplastic lesions obtained from endoscopic mucosal resection samples : a proposal for a new classification of intramucosal neoplastic lesions based on unclear atypia. *Pathol Int* 54, 425-435, 2004.
- 2) 菅井有, 幅野渉, 小西康弘, 他 : 核異型度に基づいた腸型分化型胃粘膜内癌の分子病理学的検討-特に腸型低異型度癌における分子解析. *胃と腸* 45, 1212-1225, 2010.
- 3) 菅井有, 幅野渉, 上杉憲幸, 他 : 胃腺腫と腫瘍グレードに基づいた分化型粘膜内胃癌の臨床病理学のおよび分子病理学的解析. *胃と腸* 47, 203-216, 2012.
- 4) 日本胃癌学会 (編) : 胃癌取扱い規約, 14 版. 金原出版, pp. 26-57, 2010.
- 5) Yao T, Tsutsumi S, Akaiwa Y, et al. : Phenotypic expression of colorectal adenocarcinomas with reference to tumor development and biological behavior. *Jpn J Cancer Res.* 92, 755-761, 2001.

- 6) Habano W, Sugai T, Nakamura S, et al. : A novel method for gene analysis of colorectal carcinomas using a crypt isolation technique. *Lab Invest* 74, 933-940, 1996.
- 7) Boland CR, Tribodeau SN, Hamilton SR, et al. : A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition : development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancers Res* 58, 5248-5257, 1998.
- 8) Bircan S, Candir O and Serel TA. : Comparison of WHO 1973, WHO/ISUP 1998, WHO 1999 grade and combined scoring systems in evaluation of bladder carcinoma. *Urologia* 73, 201-208, 2004.
- 9) 辻本裕一, 小森和彦, 佐藤元孝, 他 : 腎盂尿管腫瘍の臨床的検討. *日泌尿會誌* 97, 642-648, 2006.
- 10) Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, et al. : WHO classification of tumours of the digestive system, 4th edition, international agency for research on cancer, Lyon, 2010.
- 11) Yoshiko K, Nobuyuki S, Kouji B, et al. : Clinical

- characteristics of prognostic factors in poorly differentiated
(G3)endometrioid adenocarcinoma in Japan. *Jpn J Clin Oncol*
35, 23-27, 2005.
- 12) Bostwick, DG, Grignon, DJ, Hammond, ME, et al. :
Prognostic factors in prostate cancer. College of American
Pathologists Consensus tatement 1999. *Arch Pathol Lab Med*
124, 995-1000, 2000.
- 13) Sugai T, Nakamura S, Uesugi N, et al. : Role of DNA
aneuploidy, overexpression of p53 genes product, and cellular
proliferation in the progression of gastric cancer. *Cytometry* 38,
111-117, 1999.
- 14) 菅井有, 幅野渉, 遠藤昌樹, 他 : 病理の立場からみたハイ
リスクグループ-分子生物学的立場からみた胃癌発生: 粘液形
質に基づいた胃分化型粘膜内癌の分子病理学的解析. *胃と
腸* 44, 1432-1440, 2009.
- 15) Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. : CpG island
methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci
USA* 96, 8681-8686, 1999.

- 16) Sugai T, Habano W, Nakamura S, et al. : Genetic alterations in DNA diploid, aneuploidy and multiploid colorectal carcinomas identified by the crypt isolation technique. *Int J Cancer* 88, 614-619, 2000.

Molecular Alterations of Early Gastric Differentiated-type Cancer

Based on Tumor grade

Shunsuke Orikasa¹⁾²⁾, Yusuke Matsui¹⁾³⁾, Ryo Sugimoto¹⁾,

Masaki Endo²⁾, Toshimi Chiba²⁾

¹⁾Division of Molecular Diagnostic Pathology, Department of Pathology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

²⁾Department of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

³⁾Department Surgery, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

Abstract

Differentiated gastric cancers of various grades have been recognized as having different clinicopathological and molecular pathological characteristics. We classified differentiated early gastric cancers by tumor grade and evaluated the clinicopathological and molecular pathological characteristics of these cancers. We conducted molecular analyses by employing immunohistochemical stainings, loss of heterozygosity (LOH) analysis, and methylation analysis in 106 surgical specimens of differentiated early gastric cancers obtained by endoscopic submucosal dissection. The incidence of well-differentiated cancers was high among low-grade and intermediate-grade cancers, while that of intermediately-differentiated cancers was high among high-grade cancers. There was a high incidence of infiltration into the submucosal layer in high-grade cancers. As compared with low-grade and intermediate-grade cancers, the LOH rate and the frequency of p53 overexpression were high in high-grade cancers. No difference was observed in the methylation rate between

intermediate-grade and high-grade cancers; in contrast, the rate was higher in low-grade cancers than in intermediate-grade cancers and high-grade cancers. Our results suggest that tumor grade have different underlying molecular mechanisms.

付図説明

図 1. 低グレード癌, 中等度グレード癌, 高グレード癌の組織像.

a: 低グレード癌の弱拡大像 (×40)

b: 低グレード癌の強拡大像 (×200)

c: 中等度グレード癌の弱拡大像 (×40)

d: 中等度グレード癌の強拡大像 (×200)

e: 高グレード癌の弱拡大像 (×40)

f: 高グレード癌の強拡大像 (×200)

図 2. 腫瘍グレードに基づいた各粘液形質の比較

図 3. 腫瘍グレードに基づいた各染色体アレルの LOH の比較

図 4. 腫瘍細胞グレードに基づいた各癌関連遺伝子のメチル化の比較

図 5. 腫瘍グレードに基づいた LOH 状態の比較











