

氏名(国籍)	ウパマ リエンスワンウオン (タイ)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第1980号		
学位授与年月日	平成15年12月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Infrequent microsatellite instability in liver fluke infection-associated intrahepatic cholangiocarcinomas from Thailand (タイ王国の肝吸虫感染関連肝内胆管がんにおける低頻度のマイクロサテライト変異)		
主査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学教授	医学博士	大河内信弘
副査	筑波大学助教授	博士(医学)	森下由紀雄
副査	筑波大学講師	博士(医学)	大根田絹子

論文の内容の要旨

(目的)

肝内胆管癌, Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) の発症には地理的依存性がある。タイ国民にとって ICC は、主な死因のひとつになっている。特に北東部では ICC を起こす肝吸虫, *Opisthorchis viverrini* (OV) の感染が世界で最も蔓延しており、住民の7割に感染が認められる。ICC の病因は多元的であると考えられるが、OV 感染は最も重要な原因になっている。

近年、腫瘍形成の初期過程で DNA ミスマッチ修復 (MMR) の欠損が生じる事が報告されている。主に hMSH2, hMLH1 などの MMR 遺伝子の欠失は、短い繰り返し配列であるマイクロサテライト (MS) のゲノム不安定を引き起こす。細胞核 DNA (nDNA) での MS の変化は、MS 長が変化する MS 不安定性 (MSI) やヘテロ接合の一方のアリルの喪失 (LOH) によって特徴付けられる。

これまでのところ、ICC の発症につながる初期過程や分子レベルのメカニズムの知見は少ない。特に、肝吸虫感染を伴う症例では ICC の発生における MS 異変に DNA MMR システムの役割は分かっていない。そこで、タイ王国の胆管癌症例におけるゲノム不安定性の解析を通じて DNA MMR 活性が胆管癌の発症に関与しているか検討した。

(対象と方法)

症例。ICC と対応する正常部分を含む新鮮標本 24 症例、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 13 例はタイ国立癌研究所の許可の元に入手し、また本研究は筑波大学の倫理審査委員会の許可の下に行った。

DNA 抽出。新鮮なサンプルについては、DNA は通常フェノール/クロロホルム抽出方法によって調整した。パラフィン包埋組織からの DNA 抽出は 10 μ m 厚切片 2 枚を、10mM Tris-HCl, pH8.3, 1mMEDTA, 0.5% Tween-20, 1mg proteinase K を含む 200 μ l の digestion buffer 中で 5.5 $^{\circ}$ C で 2-3 日間 incubate し、その後 94 $^{\circ}$ C で 10 分加熱し、12,000 xg で 15 分間遠心して上清を回収した。

MS の検出。nDNA と mtDNA のゲノム不安定性を蛍光 PCR とレーザー検出装置によって解析した。

nDNAのMSマーカーとして5つの「Bethesdaマーカー」に多型頻度の多い7つのマーカーを加えた、BAT-25, BAT-26, D2S119, D2S123, D3S1277, D3S1298, D3S1561, D3S1611, D5S346, D11S904, D17S250, TP53の12アレルを用いて評価した。また、ミトコンドリアのDループの非コード領域にある(C)_n繰り返し配列, NADH脱水素酵素サブユニット(ND)1およびND5遺伝子のコード領域にある(C)_n, (C)_n/(A)_n繰り返し配列によりさらに評価した。新鮮標本についてはD3S1277, D11S904, D-loopを単一プライマーセットでPCRを行い, 他はマルチプレックスPCRを行った。パラフィン包埋組織については「NDI, ND5」をマルチプレックスPCRで行った以外は全て単一プライマーセットでPCRを行った。増幅産物は, 自動DNAシーケンサー(ABI PRISM377, Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて, 2.5時間電気泳動を行った。結果はGeneScanとGenotyper(Applied Biosystems)により解析した。

(結果)

解析した12のMSマーカーの中で, MSIはBAT-25で1/37症例(2.7%), D2S123で6/36症例(16.7%), D3S1611で1/35症例(2.9%), D11S904で1/35症例(2.9%), D17S250で2/32症例(6.3%)であった。LOHはD3S1298で4/22症例(18.2%), D3S1561で2/11症例(18.2%), D5S346で6/18症例(33.3%), TP53で3/24症例(12.5%)であった。他の症例ではMSの異常は検出されなかった。また, BAT-26とD2S119, D3S1277の3つのマーカーでは全症例でMSの異常は検出されなかった。3種のミトコンドリアマーカーについてはふたつのコード領域マーカーでは全症例でピークの変化は検出されなかったが, 1症例でDループのCリピートに変化が認められた。

(考察)

ICCにおけるゲノムの不安定性をnDNAにおける5つのBethesdaマーカーを含む12のMSマーカーを用いて評価したところ, 9症例で少なくとも1つのマーカーでのMSIが検出された。その内2症例では2か所のマーカーでMSIを認めた。Bethesda基準によれば, 12箇所のマーカーのうち1箇所(8%)又は2箇所(16.7%)の症例は, 低頻度MSI(MSI-L)として分類される。さらに3箇所のミトコンドリアマーカーを用いてMSI-Lであるか検証したところ, 変異を起こしやすいmtDNAのDループの非コード領域でさえMSIの頻度は37症例中1症例であり, nDNAよりも低頻度であった。

日本のICC症例ではMSIが報告されており, それらの研究で用いられた8箇所のMSマーカーのうち6箇所が本研究と同じゲノム上の位置である。日本の症例でもMSIの頻度は低かった, ただタイ症例で検出されなかったD5S346において高頻度(22.7%)にMSIが検出された(フィッシャー検定=0.0053)。現在の所, 日本とタイの症例間での矛盾の原因は分からないが, 日本の症例では見られないOV感染によるリスクも一因かもしれない。さらに最近報告されたOV感染が関係したICC症例の解析は3か所のマーカーしか用いていないが本研究と同様の結果を示している。ただし, D2S119で彼等は高頻度(20%)のMSIを認めているが(フィッシャー検定=0.0029)今回の症例では検出されなかった。BAT-25やBAT-26のような一塩基繰り返し配列マーカーについては, 一般にMSI-Lの腫瘍では変化がほとんど見られないとされており, 本研究の結果と一致している。さらにAPCおよびp53(TP53)遺伝子の変異は, MS安定(MSS)な大腸がんで頻繁に見つかるが, 本研究では, MSI-LまたはMSSであるICCの9症例でAPC(D5S346)あるいはp53遺伝子のMSマーカーのいずれかでLOHが検出された。

(結論)

DNA MMRシステムの関与は, 我々の解析したICC症例の一部でしか見つからなかった。タイ王国の肝吸虫感染が関与したICC症例はMSI-LあるいはMSSであり, DNA MMRシステムはこの発がんにおいて重要な役割を果たしていないという結論に至った。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、タイ王国で主な死因のひとつとなっている肝吸虫症に合併する肝内胆管癌の発症機序を解析することを目的とし、肝内胆管癌症例の新鮮標本または、ホルマリン固定パラフィン包埋標本からDNAを抽出し、ゲノム安定性を検討し、国際基準に照らし合わせて、低頻度 MSI または MS 安定と分類されることを明らかにした。また、対象とした 37 例中 9 例 (24.3%) で APC または p53 遺伝子領域のいずれかに LOH が検出されることも示している。

肝吸虫症に合併する肝内胆管癌の発症機序をゲノム安定性の観点から解析した研究として評価される。今後、ゲノム安定性以外の観点からの発症機序の解析が期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。