

氏 名	園田 文乃
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第701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26年 3月10日
学位論文題目	Genetic lineages of undifferentiated-type gastric carcinomas analysed by unsupervised clustering of genomic DNA microarray data (DNA マイクロアレイデータのクラスタリングによる未分化型胃癌の系譜 解析)
審査委員	主査 教授 村田 喜代史 副査 教授 寺田 智祐 副査 教授 扇田 久和

論文内容要旨

※整理番号	707	氏名	そのだ ちの 園田 文乃
学位論文題目	Genetic lineages of undifferentiated-type gastric carcinomas analysed by unsupervised clustering of genomic DNA microarray data (DNA マイクロアレイデータのクラスタリングによる未分化型胃癌の系譜解析)		
【研究の目的】			
<p>我が国において胃癌は、分化型と未分化型に分類されてきた。しかし高分化型腺癌は低分化腺癌に脱分化することが明らかになっている。組織の一部に腺管成分を含む混合型未分化型胃癌はこのような脱分化腺癌に相当すると考えられ、その予後は（印環細胞癌を含む）他の組織型よりも不良であることが知られている。つまり腺管形成の程度と腫瘍の生物学的悪性度とは必ずしも関連しない。</p> <p>我々は CGH 法を用いて染色体コピー数変化による未分化型胃癌の系譜解析を行い、未分化型胃癌には早期印環細胞癌から進展してきた diffuse type と、分化型腺癌から脱分化した mixed type の二つの系譜があり、各々の形態的系譜マーカーとして印環細胞癌由来には層構造 (LS) が、分化型腺癌由来には腺管成分 (TC) があることを明らかにしてきた。層構造は未分化型胃癌の粘膜内にみられる特徴的な組織像で、層構造内では正常腺管と同じような細胞増殖のパターンと分化の極性が保たれるため、癌細胞は深部浸潤しないと考えられてきた。</p> <p>一方で我々はアレイ CGH 法を用いた DNA コピー数変化に基づき、分化型胃癌の系譜解析を行い、分化型には粘膜内癌の多くにみられる MYC loss かつ TP53 gain の Dormant パターンと、浸潤癌でみられる MYC gain もしくは TP53 loss の Aggressive パターンがあり、Dormant パターンを示す早期分化型胃癌は、必ずしも浸潤癌へ進展しない可能性を示してきた。</p> <p>今回、階層的クラスタ解析を用いて DNA コピー数変化のプロファイルの類似性から未分化型胃癌を分類し組織学的分類と比較検証した。また系譜解析に有用な変化を示す代表的な遺伝子を抽出した。また分化型胃癌でみられたように未分化型にも Dormant パターンと Aggressive パターンがあるのかを検討した。</p>			
【方法】			
<p>未分化型胃癌の手術標本 29 例の FFPE 切片から、Laser microdissection system で採取抽出した DNA 全 63 サンプル (LS あり粘膜内癌: 9 例 11 サンプル、浸潤癌: 20 例 52 サンプル (LS あり 11 例 26 サンプル、LS なし TC あり 9 例 26 サンプル))。各々層構造、腺管成分、これら以外の粘膜内病変、浸潤部を区別して採取した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

採取した腫瘍と正常細胞の DNA を全ゲノム増幅後、蛍光色素で標識し 60K-CGH マイクロアレイ上に配置されたプローブに競合的にハイブリゲイズさせ、腫瘍と正常 DNA の蛍光強度の比を測定（アレイ CGH 法）し、全遺伝子での腫瘍 DNA のコピー数増減を網羅的に計測した。

これらの DNA コピー数変化のデータを階層的クラスタ解析し（Clustering software: Cluster3.0、Visualization Tool: Java TreeView software program）、コピー数変化のプロファイルの類似性により腫瘍サンプルを分類した。各々のクラスタ間で有意に平均値の差のある癌関連遺伝子を抽出した。

【結果】

DNA コピー数変化のプロファイル全体の類似性に基づいたグループ化を行うため、階層的クラスタ解析には、同一遺伝子上に 3 個以上のプローブを割り当てられた遺伝子のみ全 5019 遺伝子を用いた。解析の結果、全サンプルはクラスタ A と B に二分され、クラスタ A には層構造をもつサンプルが、クラスタ B に層構造を持たず腺管成分をもつサンプルが有意に多く含まれた。層構造を持つ粘膜内癌は全てクラスタ A に含まれた。

次に任意に抽出した 979 個の癌関連遺伝子から、クラスタ A、B 間で DNA コピー数に有意に差のある 40 遺伝子を抽出した（Bonferroni 補正後の Welch's *t* test）。クラスタ間で有意に差がある遺伝子の DNA コピー変化は、クラスタ A に比較してクラスタ B では均一かつコピー数変化の幅が大きい傾向を示した。

未分化型胃癌では層構造の有無に関わらず Aggressive パターンが多く、分化型胃癌でみられた Dormant パターンは一例もなかった。

【考察】

分化型と異なり未分化型早期胃癌では、層構造でも Dormant パターンではなく、進行癌と共通の Aggressive パターンであった。

組織所見としての層構造と腺管成分の有無は、DNA コピー数変化のプロファイルの違いに基づくクラスタ分類とよく相関し、これらは形態的系譜マーカーとして妥当と考えられる。

層構造を示す印環細胞癌を多く含む Cluster A よりも、層構造がなく腺管成分がある未分化型腺癌で構成される Cluster B でコピー数が大きく変化していた腫瘍関連遺伝子を 40 個抽出した。これらの遺伝子のコピー数変化が Cluster B の腫瘍の発生・進展に重要と考えられた。一方、Cluster A では遺伝子のコピー数が変化しないエピジェネティックな変化が、より重要である可能性が示唆された。

【結論】

未分化型早期胃癌は、層構造を示す段階では浸潤性は高くないが、いずれ clonal evolution を起こし進行癌に進展すると考えられる。

未分化型胃癌に印環細胞癌由来と分化型由来の二つの系譜があることが、DNA コピー数変化のプロファイルの違いからも裏付けられた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	707	氏名	園田文乃
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>未分化型胃癌は、CGH法による染色体コピー数解析の結果、層構造を呈する印環細胞癌由来と腺管成分由来の系譜に分類され、層構造を保持する限り、早期印環細胞癌は深部浸潤しない可能性が示唆されている。一方、アレイCGH法によるMYCとTP53解析の結果、分化型胃癌には進行癌に進展するものとしなないものの二つの系譜があることが示されている。そこで、未分化胃癌にも進行癌に進展しないサブタイプがあるか、またCGH法で得られた形態的マーカーによる系譜分類が妥当かについて、アレイCGH法による網羅的DNAコピー数変化のクラスタ解析を用いて検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) DNAコピー数変化のプロファイルから層構造をもつ粘膜内癌と浸潤癌を分類することは困難であり、未分化型早期胃癌に dormant variant はなく、いずれ進行癌に進展する。 2) 粘膜内の層構造と腺管成分の有無による形態的分類と、DNAコピー数変化のプロファイルの違いによるクラスタ分類とはよく相関し、これらは形態的系譜マーカーとして妥当である。 3) 遺伝子レベルの系譜マーカーとして有用な40癌関連遺伝子を抽出できた。 4) 未分化型胃癌には、遺伝子レベルのゲノムコピー数変化が大きい分化型由来と変化の小さい印環細胞癌由来との二つの系譜がある。 <p>本論文は、未分化型胃癌の系譜についての新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 599 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成26年 1月 29日)</p>			