

## 消化器がんの発がん原因探求

## 《研究の概要》

消化器がんのうち胃がん、大腸がん、膵臓がんについて、その発生あるいは初期進展に係わる因子を、形態および遺伝子の立場より探求した。

胃がんについては、萎縮性胃炎とくに腸上皮化生においてすでに微小な p53 蛋白陽性巢の出現があり、そのあるものには p53 遺伝子変異 (LOH) を伴っていることがわかった。胃の萎縮に関連して発生するとされる胃の高分化腺がんの起源として化生腺管よりも、化生粘膜内に残る非化生腺管の方が重要であると思われた。胃における H. pylori 感染は、萎縮性胃炎とくに腸上皮化生の成立と共に消失する。胃がん発生に対して H. pylori が関与しているとすれば、非化生粘膜で関与している可能性が高い。上の結果は、これを考えると興味深い。高分化腺癌における染色体欠失として新たに 1p の欠失が確実となり、その欠失領域を 13cM まで狭めた。これががん発生・進展のどの段階に関与しているかは未明である。

早期大腸がんから進行大腸がんへのメインルートを知ることは大腸がんの効果的予防を行うに当たって重要である。K-ras 遺伝子変異を用いたわれわれの調査では、隆起型由来 (変異高率) と表面型由来 (変異低率) がほぼ 1:1 であった。しかし、K-ras 遺伝子変異は大腸腫瘍発生の初期のみならず、がんの進展の末期にも起こる可能性があり、K-ras の変異のみからがんの由来を推測することに問題がある可能性が出てきた。進行大腸がんのメインルートを歩む主役として陥凹型がんを重視する派があるが、2cm 以下の小型進行がん (頻度は進行大腸がん全体の 1%) の解析では少なくとも 1/3 は隆起型由来であり、それよりも大きな進行がんには隆起型由来のもの頻度が高くなると思われるので、陥凹型がんが進行大腸がん形成に寄与する部分は極めて小さいと考える。最近、鋸歯状腺腫が注目されているが、従来からの adenoma-carcinoma sequence の概念の中に入れられるものとして、本腺腫よりがんに進展するルートのあることが明らかとなった。

大腸炎の長期経過例とくに 10 年以上の経過例は、癌発生の高危険状態であるが、実際にはそのスクリーニングは難しい。潰瘍性大腸炎では、がんを発生している例はそうでないものよりも高頻度に異形成 (dysplasia) を合併し、その検出に p53 免疫染色が役立つことを示した。ヒト家族性大腸腺腫症 (FAC) の原因遺伝子である APC 遺伝子に選択的に傷害を与えたいわゆる 1309APC ノックアウトマウスが、共同研究者である野田らによって創出された。本マウスは胃腸に多数の腫瘍を発生するが、その好発部位はほとんどが 12 指腸、空腸であり、大腸における発生率は極めて低い。しかし、最近創出の Cre-loxP set 導入マウスのコンディショナルターゲティング法では、成熟期の任意の時期や部位に腫瘍を発生できるようになり、よりヒトに近い状態が再現できるようになった。今後は、このマウスを用いた大腸発癌の研究が進展する可能性がある。なお、腫瘍の組織像は、ヒトの基準で行けば異型が強いが、浸潤や転移はほとんど見られなかった。1309APC マウスに対してはカルシウムあるいはアスピリンの経口投与による化学予防効果をみた。

膵がんには K-ras 遺伝子変異が高頻度起きていることが知られており、本変異が膵がん発生の初期にかかわっていることは明らかであり、実際に、組織学的にほとんど異型のない粘液細胞過形成にも高頻度に起きている。従って粘液細胞過形成の前癌性はきわめて低いと言わざるをえないが、この粘液細胞過形成にみられる K-ras 遺伝子変異の内容が膵がんにみられるそれと類似している点は確実に前癌性変化としての意味を示すものとして興味深い。一方、p53 遺伝子変異 (LOH) は異型度とともに頻度が高まる傾向があった。進行膵がんの染色体欠失あるいは増幅領域は、前者は 1p、6q、9p、12q、17p、18q の 6 領域に、後者は 8q、20q の 2 領域にみられた。12q における共通欠失領域の追求は 1cM まで狭めた。マイクロサテライトマーカーの立場からみる遺伝子不安定性 (MI) の表現型が、膵がんと胃がん・大腸がん・子宮内膜がんとは異なっており、膵がん発生・進展のメカニズムが後者 3 がんと異なっていることがわかった。すなわち、膵がんには MI 陽性例においても、TGF $\beta$ R II 遺伝子、IGF II R 遺伝子、BAX 遺伝子の異常は全く認められなかった。

## 研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
加藤 洋	(財) 癌研究会癌研究所 部長	組織診断および研究総括
柳澤 昭夫	(財) 癌研究会癌研究所 主任研究員 副部長	組織診断・検体採取
堀井 明	(財) 癌研究会癌研究所 研究員(H6.9より東北 大学医学部 教授)	DNA 分析
野田 哲生 (平成 6 年 10 月～平成 7 年 9 月)	(財) 癌研究会癌研究所 部長	変異マウス作成
柴田 浩行 (平成 7 年 10 月～平成 8 年 9 月)	(財) 癌研究会癌研究所 研究員	変異マウス作成
岡田 斉 (平成 8 年 10 月～平成 9 年 9 月)	(財) 癌研究会癌研究所 研究員	変異マウス作成

## 研究報告

### I 研究目的

消化器がんは、日本のがん死因の大きい部分を占める重要な疾病である。本研究では胃がん、大腸がん、膵がんを扱い、これら消化器がんの発生あるいは初期進展に係わる因子を、形態および遺伝子の立場より探求する。胃がんについては、できるだけ微小な病変の

遺伝子解析を通じて胃がん発生の危険状態を探り（研究 1）、最近注目されている *Helicobacter pylori* (H.p.) との関係についても検討する（研究 2）。また高分化腺がんにおいて高頻度に見られる染色体 1p 上の Loss of heterozygosity (LOH) の欠失地図を作成する（研究 3）。大腸がんについては、がんの発生・進展様式が隆起型と表面型とで異なることが明らかとなっているが、本研究ではどの型がどの位の割合で通常の進行がん形成に係わっているかを明らかにする（研究 4）。また、潰瘍性大腸炎など炎症性大腸疾患 (IBD) の長期経過例の発がん危険性が問題となっているが、どのような状況が問題であるかを探る（研究 5）。ヒト家族性大腸腺腫症 (FAC) および APC 変異マウスの消化管腫瘍を病理学的に比較し（研究 6）、APC 変異マウスの消化管腫瘍発生に対する化学予防の可能性を検討する（研究 7）。膵がんについては、初期病変の遺伝子解析（研究 8）、進行がんにおける遺伝子増幅領域・欠失領域の調査（研究 9）を行う。さらに、胃がん、大腸がん、膵がん、子宮内膜がんにおいてみられる遺伝子不安定性（マイクロサテライトマーカーの立場からみた）の表現型の差異について調査する（研究 10）。

## II 研究計画及び材料と方法

**研究 1:** 術後直ちに冷ホルマリンにて固定した切除胃の非がん粘膜に p53 染色を施し、P53 陽性巣を探し、連続切片からそれに対応する箇所を microdissection 法により切り出し、さらにその切片より DNA を抽出し、p53 遺伝子の変異（17p13.1 の LOH）を検索した。

**研究 2:** a) 無作為に 179 例、671 個の胃生検標本について HE 染色上で H.p. の観察を行い、20 例 72 個については p53 免疫染色および Ki67 免疫染色を行った。b) 胃がん患者 55 例、胃がんの前がん状態（扁平腺腫、高度腸上皮化生など）を持つ患者 57 例、対照例（検診で非がん、非前がん状態、非潰瘍が確認された例）75 例について H.p. に対する血清 IgG 抗体の有無および生検組織中の H.p. の有無を調査した。

**研究 3:** 胃がん（高分化腺がん）の 26 例を用いて、また 3 個の制限断片長多型 (RFLP) マーカーおよび 9 個のマイクロサテライトマーカーを用いて、染色体 1 番短腕 (1p) 上の LOH 地図の作成を試みた。

**研究 4:** a) 大腸 sm がん (sm2 以深) 35 例の浸潤がん巣における K-ras 遺伝子変異を dot blot hybridization 法を用いて検索し、その頻度を以前 m がん 50 例（隆起型 35 例、表面型 15 例）および進行がん 20 例について行った結果と比較した。b) 進行大腸がん 22 例の多数箇所（平均 4 箇所）についての K-ras 遺伝子変異頻度を検索した。さらに、前記検索例の内 3 例については各 40 箇所以上について同変異の検索を行った。c) 表層拡大型腫瘍 10 数例について同変異の検索を行った。以上の検索サンプルは、すべてパラフィンブロックから採取されたものである。d) Is 型（無茎隆起性）sm 大腸がん 10 例についてその起源（成り立ち）を光学顕微鏡レベルで考察した。e) 最大径 2cm 以下の小型進行大腸がん 35 例の観察からその起源（成り立ち）を光学顕微鏡レベルで考察した。f) 鋸歯状腺腫 (S.A.) からのがん化の可能性について検討した。

**研究 5:** 7 年以上の経過を有する 17 症例（がん合併例 12、がん非合併例 5 例）について p53 免疫染色を行い、さらに連続のパラフィン切片から、正常上皮、異型上皮およびがんのサンプルを採取、K-ras 遺伝子変異および DCC 遺伝子多型を検討した。

**研究 6:** 家族性大腸腺腫症 (FAC) の原因遺伝子である APC の、Exon 15 (codon1309) に

変異（ヘテロ接合体）を持つ APC ノックアウトマウスあるいは FAC モデルマウスが癌研で創出され、このマウスには比較的早期より胃腸腫瘍が発生することが分かったが、この腫瘍の発生状況、病理像をヒト FAC 患者のそれと比較した。

**研究 7 :** a) 上記 FAC モデルマウスに、生後 2 週より種々の濃度のカルシウム食（低濃度 0%、基準食 0.4%、高濃度 1.0%）を与え、12 週と 24 週に屠殺、大きさ 2mm 以上の胃腸管腫瘍数を検討した。b) 同様に生後 2 週より種々の濃度のアスピリン含有食餌（200ppm, 50ppm, 0ppm）を与え、生後 18 週に屠殺、胃腸腫瘍数を検討した。

**研究 8 :** a) 4 例の非腫瘍膵（切除例）の多数箇所（各 39、23、12、30 箇所）より粘液細胞過形成を含む膵管上皮サンプルを採取し、K-ras codon12 遺伝子変異の有無を検索した。b) 通常型膵管がんの初期病変をみるためのサンプルとして、3 例の粘液産生腫瘍（膵管内乳頭腫 1 例、膵管拡張型粘液性嚢胞 1 例、巨房型粘液性嚢胞 1 例）を選び、それぞれの多数箇所（各 38、34、54 箇所）よりサンプルを採取し、K-ras 遺伝子変異（codon12 の点突然変異）および p53 遺伝子変異（D17S570、D17S1176 の LOH）を検索した。

**研究 9 :** a) 進行膵がんに関しては、comparative genomic hybridization (CGH) 法、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法、マイクロサテライトマーカーを用いた PCR 法により染色体領域のコピー数の異常を指標にがん遺伝子・がん抑制遺伝子の局在の候補領域を検索した。b) その結果、6 箇所の高頻度の欠失領域（1p、6q、9p、12q、17p、18q）と 2 箇所の増幅領域（8q、20q）を検出し、そのうち、6q、12q、20q においては、さらに詳細に検討を加え、12q では 1cM 以内の共通欠失領域を同定した。

**研究 10 :** 胃がん、大腸がん、膵臓がんおよび子宮内膜がんの多数例を用いて、5 個以上のマイクロサテライトマーカーによりこれらがんの遺伝子不安定性 (MI) を調べ、MI+ の例について transforming growth factor  $\beta$  receptor type II (TGF  $\beta$  R II) 遺伝子および Insulin-like growth factor II receptor (IGF II R) 遺伝子内のヌクオレチド繰り返し配列の異常を検討した。

### III 研究成果と IV 考察

#### 研究 1 : 萎縮性胃炎における p53 陽性巣

p53 蛋白陽性巣は、大きさ 100~1000  $\mu$ m (平均 400  $\mu$ m) であり、いずれも微小であった。検出頻度は胃全体の腸上皮化生の程度と共に高くなった。10 例中 7 例 27 箇所に検出され、27 箇所の形質は胃型が 12、腸型が 15 であり、また、異型を伴うものは胃型であった。p53 蛋白陽性巣における 17p13.1 の LOH は検索の可能 (informative) な 22 箇所のうち 4 箇所に認められ、その 4 箇所はすべて異型を有する胃型陽性巣であった。すなわち、分化型がんの始まりは胃型の異型腺管であり、分化型がんの特徴である腸型形質は、異型腺管の発育進展に伴って発現されていく可能性があった。

一見正常にみえる粘膜とくに腸上皮化生粘膜における遺伝子異常については、すでに田原 (1992) が p53 遺伝子と K-ras 遺伝子の変異をそれぞれ 10 例中 1 例にみている。落合ら (1994) の観察よれば、微小 p53 陽性巣は不完全型化生を呈し、陽性巣からのサンプル 10 例中 4 例に p53 遺伝子変異が検出できたとしている。分化型がんの起源として、落合らは不完全型化生を、われわれは腸上皮化生粘膜内に存在する非化生胃型腺管を重視したが、この差異は観察している病巣のサイズの違いによる可能性がある。いずれにしても、以上

の推察は p53 遺伝子異常の立場のみから行ったものであり、今後は種々の遺伝子異常を含めての総合的解析が必要である。p53 陽性巣は高度の腸上皮化生を伴う胃に高頻度に存在するとしたが、ほとんどの化生は異型や p53 蛋白過剰発現と無関係であり、このような p53 蛋白陽性巣が化生とどのような関係をもって発生してくるのか、H. pylori の感染との関係はどうなっているのか、なども今後の検討課題である。

### 研究 2 : a) Helicobacter pylori (H. p.) 感染と胃がん (生検材料の観察)

H. p. の感染は、55% (334/610) にみられ、感染はほとんどが非化生粘膜にみられた。病変の周囲粘膜における感染率は、ATP に最も低く、がんでは陽性と陰性がほぼ同率であった。胃がんの組織型別には、分化型がんに低く未分化型がんに高かった。また、100 個の H. p. 陽性の生検について、p53 染色を行った結果、1 個の p53 陽性腺管が確認され、この腺管は非化生腺管であった。

H. p. の感染は、日本人成人 (40 歳以上) の 70~80% にみられ、これが日本人胃における萎縮性胃炎 (腸上皮化生を含む)、ひいては分化型がんの発生に関係するとされる (直接ではなく、間接的に)。しかし、H. p. は実際には、完成した腸上皮化生粘膜には存在せず、すなわち萎縮が著しく進行した胃では、生検標本における H. p. の検出率は下がると予測される。上記の結果はこの予測に合う。がんの組織型との関係では、多くの報告が H. p. は分化型がんを持つ胃に多いといわれるが、われわれの結果はむしろ逆であり、上の予測から考察すると、われわれの結果の方が reasonable である。また、p53 陽性腺管が胃型腺管であった点は、研究 1 の結果と一致しており、慢性の H. p. 感染状態が p53 遺伝子異常を引き起こす可能性があり興味深い。

### b) Helicobacter pylori (H. p.) 感染と胃がん (抗 H. p. 血清抗体価からみて)

胃がん患者 (55 例)、前がん患者 (57 例)、対照者 (75 例) の血清における抗 H. p. 抗体陽性率は、前二者が対照に比して有意に高かった (82%、89%、60%)。一方、生検組織中の H. p. 陽性率は三者間では大差はなかった (56%、45%、52%)。

このデータからは、胃の H. p. 感染状態は胃がんや胃前がん状態に大きく係わる因子であるといえたが、対照が非がん、非潰瘍、非前がん状態である検診例であるところに多少問題がある。有症状の胃がん例と検診例の胃がん例の比較を行う必要がある。また、生検によって差異が認められなかったのは、採取部位による H. p. 検出率の差が強く影響していると考えられる。

### 研究 3 : 胃の高分化腺がんにおける染色体 1p 上 LOH 地図の作成

全ての腫瘍が、少なくとも 1 個のマーカーで LOH 検索可能であった。全ての腫瘍に共通して見られた欠失部位は、D1S201 と D1s197 の 2 つのマーカーの間にあり、これら間隔は 13cM であった。さらに、この 2 つのマーカーの間には、D1S57 (pYNZ2) と D1S62 (PTHI54) の 2 つのマーカーが含まれ、これらはそれぞれ、fluorescence in situ hybridization (FISH) により、1p35 と 1p34.3 に相当した。この 13cM の間に胃がん、とくに高分化腺がんに係わる新たながん抑制遺伝子の存在が示唆された。染色体 1p 上の LOH は、大腸がん、肝がんなどでも報告されているが、実際に、われわれが観察した胃の高分化腺癌における共通欠失領域は、他臓器がんにおけるそれらと重なるところがあり、染色体 1p 上には、多くの臓器がんにも共通して異常が起こりやすい、未知のがん抑制遺伝子を含む箇所があるこ

とを示唆している。また、胃がんにおける染色体 1p 上の LOH は、Sano ら (1991) によれば、高分化腺癌よりも低分化腺癌に頻度が高かったとしているが、われわれの結果との差異は、検索マーカーの数や部位が関与している可能性がある。

#### 研究 4 : a) , b) 大腸がんメインルート of 解明

sm がんにおける K-ras 遺伝子変異は、24% (9/38) であり、以前調べた隆起型 m がんの頻度 29% (10/35) と、表面型 m がんの頻度 13% (2/15) の中間の値を示した。さらに、進行がんにおける頻度 20% (4/20) よりも若干高かった。このことから、進行がんを構成する隆起型由来がん と 表面型由来がん の比率は 1 : 1 であり、sm がんまでは表面型由来がんの比率がやや高いのではないかと思われた。しかし、進行がん 22 例の多数箇所を検索では、同一腫瘍内に Ki-ras 遺伝子変異の不均一性 (heterogeneity) が高頻度に存在することが分かり、K-ras の変異のみからがんの由来を推測することに問題がある可能性が出てきた。

#### c) 表層拡大型腫瘍における K-ras 遺伝子変異

表層拡大型腫瘍 16 例 (腺腫が主) について K-ras 遺伝子変異を検討した結果、8 例に変異をみとめ、本型は通常隆起型腺腫に比しきわめて高頻度の変異を有することがわかった。本型は slow growing tumor であることが知られているが、K-ras 遺伝子変異がこの様なタイプに高くでることはこれまでのわれわれの解析結果と矛盾しない。

#### d) Is 型 (無茎隆起性) sm 大腸がんの成り立ち

詳細な検討が可能であった 10 例の内訳は、内視鏡的摘除例 6 例 (平均 13mm)、手術例 4 例 (平均 24mm) であり、手術例に深達度の深いものがあつた。下田・池田らの polypoid growth (PG)・non-polypoid growth (NPG) に関しては、10 例中 9 例が PG であつた。腺腫成分は 5 例に見られすべてが内視鏡的摘除例であり、陰性の 5 例のうち 4 例が手術例であつた。手術例は大きく、腺腫成分は腫瘍の増大に伴って消失するものと思われた。

Is 型 sm 大腸癌は進行大腸癌の直前先行病変として注目されているが、その多くが PG 由来・腺腫由来であり、NPG がん・de novo がんが進行がん形成に寄与する頻度は極めて低いと推察される。

#### e) 最大径 2cm 以下の小型道行大腸がんの起源

小型進行大腸がん例は全部で 43 例あり全切除大腸がん 3950 例の 1.23% に相当した。このうち単発の 35 例を対象とした。年齢分布、男女比、発生部位、肉眼型、組織型は、すべて通常進行がんと同じであつたが、深達度は mp が 20 例 (57%) と通常進行がんよりも多かつた。リンパ節転移率は、小型・通常進行がんの間で大きな差はなかつた。すなわち、腫瘍量にしたがって転移率が増加するとすれば、小型進行がんはより悪性度の高いがんであると言えた。また、腫瘍の発育パターン、PG・NPG に関しては、PG が 12 例、NPG が 18 例、その他が 5 例であり、少なくとも 1/3 は PG 由来であつた。肉眼型との関係では、進行がん型 1 型に PG が多く (6/9)、2 型に NPG (13/24) が多かつた。5 型の 2 例はいずれも NPG であつた。さらにサイズ 10mm までの 2 例 (1 例は 4mm) は NPG であつた。サイズ 16mm 以上の 26 例中 4 例に腺腫成分が併存していた。

2cm 以下の進行がんは、ほとんどが NPG 由来であり腺腫由来が少ないとする意見が多いが、本研究の結果はそれには合致しない。この不一致には PG・NPG の判定基準が絡んでいるも

のと思われる。

#### f) 鋸歯状腺腫 (S. A.) からのがん化

S. A. は、化生性ポリープに類似した腺腫とされ、最近増加傾向にあり、診断が問題となる病変である。S. A. 成分を含む腫瘍 29 例のうち、本成分が主体の病変は 18 例であった。このうち 13 例には化生性ポリープ成分がみられた。一方、他の adenoma の成分が 7 例にみられ、このうちの 3 例は villotubular (villous) structure を示すものであった。また、他の 1 例には癌の合併がみられた。以上から、化生性ポリープ→鋸歯状腺腫→癌の sequence が存在することが示唆された。また、villous tumor (adenoma) には S. A. 由来のものと考えられた。

また、日本人とスウェーデン人の大腸腫瘍の比較の一環として、スウェーデン人の S. A. とその関連病変を含む 64 病変 (58 例) の観察を行ったが、われわれの診断基準にしたがって、MIB-1 (増殖細胞をみる) の染色性 (病変の全層が陽性となる) および p53 蛋白の染色性 (一部にでも瀰漫性に陽性となる腺管が出現する) をみると、化生性ポリープでは 2%、4% ; S. A. では 60%、40% ; 他の腺腫では 100%、33% であり、S. A. は、他の腺腫同様、腫瘍として扱われべき病変と考えられた。

#### 研究 5 : 潰瘍性大腸炎に合併する異型上皮 (異形成) およびがん

7 年以上の経過を有する 17 症例のうちがん合併例は 12 例で、がんの個数は 14 であった。それらの部位は、右側結腸 2、左側結腸 4、直腸 7、不明 1 であった。また、がん合併例および非合併例から正常、異型上皮 (異形成) およびがん部位を任意に選び、これらを厚生省難治性炎症性腸管障害研究班による潰瘍性大腸炎における異型上皮の病理組織学的分類 (案) (1994) に従って分類し、K-ras 遺伝子変、p53 免疫染色、DCC 遺伝子の多型性の検索を行った。K-ras 遺伝子変異は UC-I (normal and regenerative) および UC-II (Indefinite, IIa : probably regenerative, IIb : probably dysplastic) では 0% であったが UC-III (low grade dysplasia) および UC-IV (high grade dysplasia) ではそれぞれ 17%、25% にみられた。p53 免疫染色は、がん合併群の UC-I、II はすべて陰性であったのに対し、がん合併群では、UC-I はすべて陰性であったが、UC-II においては 47% (強陽性のものは 35%) が陽性であった。また、DCC 遺伝子コドン 201 の多型性は、がん合併の有無に拘わらず Gly が多かった。以上より、p53 免疫染色は、長年経過の IBD 症例における発癌危険状態のスクリーニングに有用と考えられる。

#### 研究 6 : ヒト大腸腺腫症 (FAP) と FAP マウスの腸管腫瘍の比較

APC1309 ノックアウトマウスでは、消化管に多数の腫瘍が発生するが、その発生部位はほとんどが小腸であり、大腸にはまれであった (0.5mm 以上の腫瘍が ~2 個/匹)。APC・p53 ダブルノックアウトマウスでは、12~14 個/匹とあきらかに上昇していた。さらに、初期病変としての単一腺管腺腫が  $\sim 100$  個/cm<sup>2</sup> 高頻度に発生していることが判った。なお、このような条件でも、腫瘍の好発部位は小腸であった。われわれは、さらに大腸により効率よく腫瘍を発生させるために conditional targeting 法で Homozygous APC 遺伝子ノックアウトを作製し、4 週間で大腸に選択的に腫瘍を発生させることに成功した。本法により、マウス成熟後の任意の時期に大腸腫瘍を発生させることが可能になり、ヒト FAP の状態 (大



腸腺腫症)により類似の状態を作ることができる。なお、組織学的には、マウスの腺腫の異型は、ひとのそれに比し異型が強くほとんどががんに見えたが、浸潤像・転移像は認められなかった。

#### 研究7: a) 食餌内カルシウム濃度の腸管腫瘍発生におよぼす影響

腫瘍数は、十二指腸では、12、24週とも、標準食群と高Ca食群の間に差はなかったが、Ca欠乏食群に標準食群の約1.7倍の発生をみた。回腸でも、Ca欠乏食群が基準食群より多い腫瘍数を示した。一方、胃では、上記とは逆に、Ca欠乏食群で腫瘍数が減じた。高Ca食による腫瘍発生率が期待されたが、小腸においてはCa欠乏食で腫瘍が増加した。これは、Ca低下にによって、胆汁酸の作用が相対的に増強したためとも考えられた。しかし、詳細なメカニズムは不明である。また、Ca欠乏で胃腫瘍が減少した理由については全く不明である。現在、Aberrant crypt foci (ACF) への影響を解析している。

#### b) 食餌内アスピリンの胃腸腫瘍発生におよぼす影響

食餌内アスピリン濃度200ppm群、50ppm群、0ppm群それぞれについて、9匹、6匹、10匹が観察可能であり、消化管の各部位に生じた腫瘍数を観察した。十二指腸と小腸近位では、アスピリン添加群で腫瘍発生数の減少はみられなかった。これに対して、小腸遠位、大腸および胃ではアスピリン添加群で腫瘍発生数が約半分に減少した ( $p < 0.05$ )。現在、Aberrant crypt foci (ACF) 形成への影響について検討している。

#### 研究8: a) 膵の粘液細胞過形成と K-ras 遺伝子変異

4例の非腫瘍膵(切除例)の多数箇所(各39、23、12、30箇所)より粘液細胞過形成を含む膵管上皮サンプルを採取し、K-ras codon12 遺伝子変異の有無を検索した。その結果、各28、13、3、15箇所に變異が検出され、これら箇所はいずれも粘液細胞過形成を示していた。正常上皮、扁平上皮化生には變異は無かった。K-ras 遺伝子變異は同一膵内に多発し、かつ多種類であった。また、變異の種類は、Gly→Asp、Gly→Aspが多く、この傾向は日本人膵がんにおける K-ras 遺伝子變異の傾向と類似していた。すなわち、膵管の粘液細胞過形成は、膵がんの前がん病変として位置づけられる。しかし、粘液細胞過形成がきわめて長い経過のいつどこで progression を起こし、形態学的に明らかな腫瘍あるいはがんになるかについては全く不明である。われわれはまた、膵液中の粘液細胞過形成における K-ras 遺伝子變異についても検討したが、正常と診断された膵管上皮6例には1例の變異も見られず、變異はすべてが粘液細胞過形成とされた上皮(12例中8例)に認められた。その内訳は、Aspが4、ValおよびArgが各2であった。すなわち、K-ras 遺伝子變異は、非膵癌患者の膵液中にも高頻度に見出される可能性がある。

#### b) 粘液産生膵腫瘍における K-ras 遺伝子變異と p53 遺伝子領域 LOH

3例の粘液産生膵腫瘍(膵管内乳頭腫瘍1例、膵管拡張型粘液性嚢胞腫瘍1例、巨房型粘液性嚢胞腫瘍1例)から microdissection 法により合計126(それぞれ38、34、58)のサンプルを採取し、上記遺伝子變異を検索した。上皮の異型度を0~3の4段階に分けると、K-ras 遺伝子變異は異型度1(軽度)より高頻度に見られ、p53 遺伝子の LOH は異型度2(中等度)、3(高度および高分化がん)となるに従ってその頻度が上昇した。また、K-ras 遺伝子變異は腫瘍の広範囲に見出され、變異は monotonous であったが、p53 遺伝子 LOH は

腫瘍のいくつかの限られた部位（異型の強い部）に検出された。また、p53 遺伝子 LOH 陽性部位は必ず K-ras 遺伝子変異を伴っていた。以上より、K-ras 遺伝子異常は膵がん発生の初期に係わっており、p53 遺伝子異常がその上に重なって起こり、上皮の異型度の上昇と関連していることが分かった。また、今回の結果は、p53 遺伝子変異が、あきらかに非浸潤がんの段階でも起きていることを示している。

#### 研究 9 : a), b) 膵がんで特異的に欠失・増幅している染色体領域

進行膵がんに関して、comparative genomic hybridization (CGH) 法、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法、マイクロサテライトマーカーを用いた PCR 法により染色体領域のコピー数の異常を指標にがん遺伝子・がん抑制遺伝子の局在の候補領域を検索した結果、6 箇所の高頻度の欠失領域 (1p, 6q, 9p, 12q, 17p, 18q) と 2 箇所の増幅領域 (8q, 20q) を検出した。b) そのうち、6q, 12q, 20q においては、さらに詳細に検討を加え、12q では 12q22-q23 の 1cM 以内の共通欠失領域を同定した。ここには、未知の癌抑制遺伝子が存在する可能性がある。

#### 研究 10 : 胃がん、大腸がん、膵がんなどにおける Microsatellite instability (MI) と TGF $\beta$ RII 遺伝子あるいは IGF IIR 遺伝子異常との関係

MI 陽性の種々の進行臓器がんについての transforming growth factor  $\beta$  receptor type II (TGF  $\beta$  R II) 遺伝子の変異は、胃がんが 89% (8/9)、大腸がんが 80% (4/5) であったのに対し、膵がん、子宮内膜がん、肺がんでは 0% であった。すなわち、胃がんや大腸がんの発生・進展には、TGF  $\beta$  R II 遺伝子変異が大きく関わっていると言える。また、TGF  $\beta$  R II 遺伝子同様、coding region に単純な繰り返し配列 (poly G) を有する Insulin-like growth factor II receptor (IGF II R) 遺伝子の変異について、胃がん、大腸がん、膵がんなど種々の臓器がんで検討した。MI 陽性の子宮内膜がんで 15% (4/26)、胃がんで 25% (3/12)、大腸がんで 6% (1/18) であったのに対し、膵がんでは 0% (0/7) であった。bcl-2 associated X protein (BAX) 遺伝子における異常に関しても、IGF II R 遺伝子変異の場合と同様の傾向があった。膵がん発生・進展のメカニズムと胃がん・大腸がん・子宮内膜がんのそれが異なっていることを示している。すなわち、MI 陽性の膵がんでは、他のがんとは異なった遺伝子が標的となっているか、或いは、別のメカニズムで MI+ の表現型を取っている可能性が示唆された。

## V 研究成果の発表

- (1) 宇都出公也、柳澤昭夫、加藤 洋：腸上皮化生の強い胃における p53 陽性腺管．胃と腸 30 : 1309-1313, 1995t
- (2) Ezaki T., Yanagisawa A., Ohta K., Aiso S., Watanabe M., Hibi T., Kato Y., Nakajima T., Ariyama T., Inazawa J., Nakamura Y., Horii A.: Deletion mapping on chromosome 1p in well-differentiated gastric cancer. British Journal of Cancer 73: 424-428, 1996
- (3) 加藤 洋、柳澤昭夫、久保起与子、堀井 明：消化管癌の形態と遺伝子異常．消化器内視鏡 8 : 13-19, 1996

- (4) 若月 滋、堀井 明：胃癌における遺伝子変異. 消化器内視鏡 8: 43-46, 1996
- (5) 加藤 洋、柳澤昭夫、宇都出公也：慢性胃炎の病理一発癌の背景としての胃炎の意義. In: 胃炎研究の論点 (編集 福地創太郎)、国際医書出版 1996
- (6) 加藤 洋、会津謙治、Barreto RZ、丸山雅一：H. pylori と腸上皮化生および胃癌の関係. In: Helicobacter pylori と胃炎・胃癌 (編集 木村 健、榊 信廣) 医学書院 208-214, 1996
- (7) Rubio C.A., Kumagai J., Kanamori T., Yanagisawa A., Nakamura K., Kato Y.: Flat adenomas and flat adenocarcinomas of the colorectal mucosa in Japanese and Swedish patients. Comparative histologic study. Dis Colon Rectum 38: 1075-1079, 1995
- (8) 柳澤昭夫、加藤 洋：膵管上皮と Ki-ras 遺伝子変異. 消化器内視鏡 8: 79-84, 1996
- (9) 加藤 洋、柳澤昭夫：慢性膵炎における遺伝子変異. とくに Ki-ras 遺伝子変異について消化器病セミナー63 (消化器癌と癌遺伝子) 63: 127-133, 1996
- (10) Katada F., Murakami K., Uzuki M., Horii A.: Double Cancer in a 74-year old woman: a case report with genetic findings. Tohoku J. Exp. Med. 178: 437-445, 1996
- (11) 伊藤正紀、三浦成人、野田哲生：家族性大腸腺腫症 (FAP) モデルマウス. 蛋白質・核酸・酵素 40: 2668-2673, 1996
- (12) 野田哲生：APC 遺伝子と家族性大腸腺腫症モデルマウス. 第 104 回日本医学会シンポジウム記録集. pp4-9, 1995
- (13) 柴田浩行、野田哲生：コンデイショナル・ジーンターゲットイング. in vitro における新しい遺伝子機能解析法 BIO Clinica 11: 78-82, 1996
- (14) Horii A., Kimura M., Abe T., Fukushige T., Furukawa T., Sunamura M., Kobari, M., and Matsuno S.: Genetic alterations in human pancreatic cancer. In: Tahara E., Sugimachi K., and Oohara T. (eds), Recent advances in gastroenterological carcinogenesis I: 231-238, Bologna, Italy: Monduzzi Editore, 1996
- (15) Kimura M., Abe T., Sunamura M., Kobari M., Matsuno S., and Horii A.: Identification of a 1-cM region of common allelic loss in chromosome bands 12q22-q23.1 in human pancreatic adenocarcinoma. In: Tahara E., Sugimachi K., and Oohara T. (eds), Recent Advances in Gastroenterological Carcinogenesis I: 733-737, Bologna, Italy: Monduzzi Editore, 1996
- (16) Kimura M., Abe T., Sunamura M., Matsuno S., and Horii A.: Detailed deletion mapping on chromosome arm 12q in human pancreatic adenocarcinoma: Identification of a 1-cM region of common allelic loss. Genes. Chrom. Cancer 17: 88-93, 1996
- (17) Abe T., Ouyang H., Migita T., Kato Y., Kimura M., Shiiba M., Sunamura M., Matsuno S., and Horii A.: The somatic mutation frequency of the transforming growth factor  $\beta$  receptor type II gene varies widely among different cancers with microsatellite instability. Eur. J. S. Oncol. 22: 1996 (inpress)
- (18) Sasaki S., Horii A., Shimada M., Han H-J, Yanagisawa A., Muto T., and Nakamura

- Y.: Somatic mutations of a human mismatch repair gene, hMLH1, in tumors from patients with multiple primary cancers. *Hum. Mutation* 7 : 275-278, 1996
- (19) Rubio C.A., Kato Y., Hirota T., and Muto T.: Flat serrated adenomas of the colorectal mucosa in Japanese patients. *In Vivo* 10 : 339-344, 1996
- (20) Rubio C.A., Kato Y., Hirota T., and Muto T.: Histologic classification of endoscopically flat colorectal polyps: a multicentric study. *Jpn. J. Cancer Res.* 87 : 849-855, 1996
- (21) Miyashiro I., Senda T., Matsunami A., Baeg G-H., Kuroda T., Shimano T., Miura S., Noda T., Kobayashi S., Monden M., Toyoshima K., and Akiyama T.: Subcellular localization of the APC protein: Immunoelectron microscopic study of the association of the APC protein with catenin. *Oncogene* 11 : 89-96, 1996
- (22) 伊藤正紀、三浦成人、野田哲生: APC 遺伝子と家族性大腸腺腫症疾患モデルマウス。蛋白質核酸 酵素 40: 2 035-2044, 1996
- (23) 柴田浩行、三浦成人、野田哲生: 家族性大腸腺腫症モデルマウス。血液・腫瘍科 31: 449-456, 1996
- (24) 柴田浩行、野田哲生: ジーンターゲットイングの新しい戦略ーコンディショナルジーンターゲットイング法ー。実験医学 13 : 73-76, 1996
- (25) 伊藤正紀、三浦成人、野田哲生: 癌抑制遺伝子のジーンターゲットイング。癌抑制遺伝子の最前線 (横田淳、秋山徹絹) 99-113, 1996
- (26) 野田哲生: APC 遺伝子と家族性大腸腺腫症モデルマウス。第 104 回日本医学会シンポジウム記録集 : 4-9, 1996
- (27) 野田哲生: Gene Targeting における現在の問題点と今後の展望。最新医学 51: 1079-1085, 1996
- (28) 伊藤正紀、柴田浩行、野田哲生: がん抑制遺伝子と発がんモデル動物。最新医学 51: 1153-1160, 1196
- (29) Ouyang H., Shiwaku H. O., Hagiwara H., Miura K., Abe T., Kato Y., Ohtani H., Shiiba K., Souza R. F., Meltzer S. J., and Horii A.: The Insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Reseach* 57 : 1851-1854, 1997
- (30) 久保起与子、加藤 洋、柳澤昭夫、Rubio C.A.、平塚秀雄: Serrated adenoma (鋸歯状腺腫) の考え方。消化器内視鏡 9 : 559-563, 1997
- (31) Barreto-Zuniga R., Maruyama M., Kato Y., Aizu K., Ohta H., Takekoshi T., and Bernal S.F.: Significance of Helicobacter pylori infection as a risk factor in gastric cancer: Serological and histological studies. *J Gastroenterol* 32 : 289-294, 1997
- (32) 加藤 洋、柳澤昭夫、坂井雄三: 脾の嚢胞腫瘍における遺伝子変化, とくに Ki-ras 遺伝子変異 消化器内視鏡 9 : 8 1-84, 1997
- (33) Rubio C.A., Ost A., Kato Y., Yanagisawa A., Rivera F., and Hirota T.: Hyperplastic foveolar gastropathies and hyperplastic foveolar gastritis. *APMIS* 105 : 7 84-792, 1997

- (34) 戸田潤子、長廻 紘、藤盛孝博、加藤 洋、林 直諒：潰瘍性大腸炎の癌合併例における遺伝子異常に関する検討。日本消化器病学会誌（印刷中）
- (35) Kato Y., Yanagisawa A., Sakai Y., and Sugano H.: Pathology and K-ras mutation in mucin producing tumor of the pancreas. Hepatogastroenterology 1997 (in print)
- (36) Fukushige S., Waldman F.M., Kimura M., Abe T., Furukawa T., Sunamura M., Kobari M., and Horii A.: Frequent Gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. Genes Chromosome. Cancer 19 : 161-169, 1997
- (37) Sakurada A., Suzuki A., Sato M., Yamakawa H., Orikasa K., Uyeno S., Ono T., Ohuchi N., Fujimura S., and Horii A.: Infrequent genetic alterations of the *PTEN/MMAC1* gene in Japanese patients with primary cancers of the breast, lung, pancreas, kidney, and ovary. Jpn. J. Cancer Res. (in press)
- (38) Ouyang H., Furukawa, T., Abe T., Kato Y., and Horii A.: The *BAX* gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endometrium. Clin. Cancer Res. (in press)
- (39) Shibata H., Toyama K., Shioya H., Ito M., Hirota M., Hasegawa S., Matsumoto H., Takano H., Akiyama T., Toyoshima K., Kanamaru R., Kanegae Y., Saito I., Nakamura Y., Shiba K., and Noda T.: Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the APC gene. Science 287 : 120-123, 1997
- (40) 伊藤正紀、野田哲生：遺伝子治療のための疾患モデル-FAP モデルマウスと HNPCC モデルマウス。肝胆膵 34 : (4) 489-494, 1997
- (41) 八尾良二、野田哲生：ノックアウトマウスを用いた APC の機能解析。実験医学 15 : 107-111, 1997
- (42) 野田哲生：マウス遺伝学とコンディショナル・ジーンターゲティング。遺伝子医学 1 : 125-126, 1997
- (43) 伊藤正紀、野田哲生：大腸癌研究の進展—APC 遺伝子と大腸癌—。実験医学 15 : 879-884, 1997