

がんにおける細胞周期調節因子の異常と 分子病理診断へのアプローチ

安井 弥

広島大学医学部第一病理：広島市南区霞1-2-3 (〒734-8551)

Key Words

細胞周期調節因子 分子病理診断 消化管癌

はじめに

消化管の病変に対する内視鏡を用いた診断・治療の普及と進歩によって、そこから採取された組織検体を病理医が組織診断する機会が著しく増加している。広島県腫瘍登録委員会では、病理医が診断した腫瘍を良性・悪性を問わず病理診断報告書と組織プレパラートと共に登録する事業を行っているが、登録される症例数はこの20年で、胃癌は3倍、大腸癌は6倍、胃腺腫は20倍、大腸腺腫ではなんと64倍に増えているのである。これは、以前ならば手術によってのみ採取されていたものが、今では多くが内視鏡的に生検あるいは粘膜切除されていることを意味している。最近第一線の病院や検査センターでは、消化管の組織が日常の病理診断の過半数を占めているといっても過言ではない。

病理診断は、病変の確定診断や治療指針に極めて重要であるが、組織形態のみに依存した診断にはある程度の限界があるのも事実である。良性と悪性の境界領域病変としか言えない形態を示す病変は稀ではなく、また、病理医間で診断基準に若干のズレも存在する。さらに、形態のみでは悪性度や予後に関する情報に限界のあること、癌の存在診断に不向きであることも弱点である。

最近の15年間の分子病理学的研究の積み重ねにより、消化管癌の発生・進展の過程におけるジェネティ

ックあるいはエピジェネティックな異常の詳細が明らかになってきた。癌の最も大きな特性のひとつである過剰増殖に関しても、増殖因子・レセプター、細胞周期調節因子、アポトーシスなどの面から様々な研究成果が得られている。特に、細胞周期の調節については、種々の正と負の調節因子や下流に存在する遺伝子制御機構などが明らかになり、これらの消化管癌における異常とその意義も大略がわかってきた。これを組織検体において解析し、形態像を併せて診断に応用することが可能である。

本稿では、細胞周期調節因子の異常を病理診断の最大のターゲットである消化管癌について概説し、その遺伝子診断へのアプローチとして、我々が行っている消化管の分子病理診断を紹介し、今後の展望を述べてみたい。

細胞周期調節因子の異常

G1期からS期、G2期からM期へと細胞周期が進行していく過程には、それぞれのチェックポイントにおいて、正の調節因子であるサイクリン及びサイクリン依存性キナーゼ(cyclin-dependent kinase: CDK)と、負の調節因子であるCDKインヒビターが監視機構として働いている(図1)。サイクリン/CDK複合体の上流では、ChkキナーゼやCDC25フォスファターゼがその制御を行っており、下流には、Rb蛋白及び転写因子E2Fが存

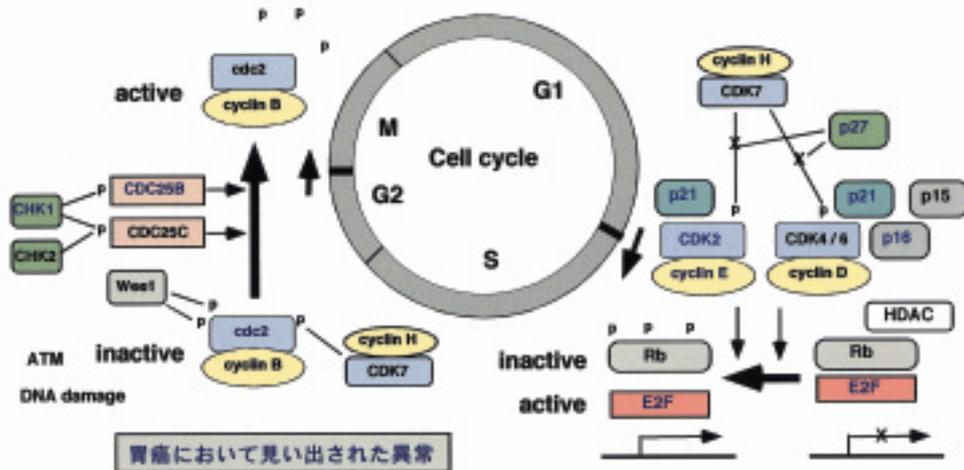


図 1. 細胞周期の進行の制御機構と胃癌における異常（青色文字）

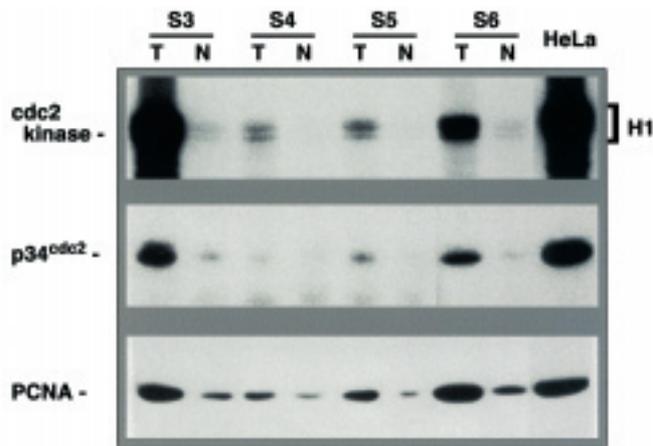


図 2. 胃癌における cdc2(CDK1)の発現及びキナーゼ活性と PCNA の発現
T : 胃癌組織, N : 非癌部胃粘膜組織

在する。このような多種の細胞周期に関わる正と負の調節因子の遺伝子異常・発現異常によるバランスの乱れが、細胞の過剰増殖を介して癌の発生・進展に関与しているのである。

1. サイクリンと CDK

サイクリンはそのパートナーである CDK と複合体を形成し、Rb をはじめとする標的分子をリン酸化することにより、細胞周期を正に調節している。サイクリン D1 遺伝子は、染色体 11q13 に、癌遺伝子 *hst-1*、*int-2* と隣接して存在し、この領域の遺伝子増幅は、食道癌原発巣では 40~50%、転移巣では殆どで認められる²⁾。サイクリン D1 の遺伝子増幅・過剰発現を有する症例は、術後再発率が高く有意に予後不良である。胃癌、大腸癌には、サイクリン D1 の遺伝子増幅はないが、発

現亢進を示す症例は大腸癌に多い傾向にある。一方、サイクリン E の遺伝子増幅は、胃癌、大腸癌でそれぞれ 15~20%、10% に認められ、食道癌にはない^{3,4)}。胃におけるサイクリン E の過剰発現は、腺腫では 8%、腺癌では 27% と癌で有意に高頻度であり、さらに深部への浸潤、ステージの進行、転移などの悪性度と有意な相関を示す。大腸でも、サイクリン E の過剰発現は、腺腫では 5%、癌では 20% と癌に有意に高く、粘膜下へ浸潤する癌に頻度が高い⁵⁾。大腸癌では、サイクリン E 遺伝子の増幅を示すものの多くにおいて、CDK2 遺伝子の同時増幅が認められる⁴⁾。

一方、G2 / M チェックポイントに主に働く CDK1 (cdc 2) の発現及びキナーゼ活性は、正常粘膜組織と比較して、大部分の胃癌、大腸癌において著しく亢進している(図 2)³⁾。そのレベルは、PCNA を指標とした増

殖能とよく相関しており, さらに, p53 遺伝子に変異のある症例に特に活性が高い傾向にある。

2. CDK インヒビター

細胞周期の負の調節因子である CDK インヒビター p21^{WAF1/CIP1} は, CDK2 / サイクリン E 複合体と結合し, G1 / S 期の進行を抑制的に制御する。胃癌では, 遺伝子の欠失や変異はないが, 40 ~ 50 % の症例で mRNA 及び蛋白レベルでの発現低下が認められており, CpG のメチル化を含めた転写抑制による可能性が考えられる⁷⁾。p21 の発現に関わる転写因子のひとつに p53 があり, 野生型 p53 を有する胃癌細胞株 MKN-45, MKN-74 や大腸癌細胞株 LoVo では, p21 の発現は保たれており, p53 変異株での p21 の発現レベルは低い。大腸癌においても, p21 遺伝子に異常は認められないが, 発現減弱は癌の悪性度と相関しており, ステージ 3 / 4 の症例, 深達度が固有筋層以上の症例及びリンパ節転移を有する症例では, 全例で p21 の発現は減弱している⁸⁾。p53 遺伝子と相同性を有する新しい癌抑制遺伝子 p73 も p53 と同様に転写因子として働き, p21 の発現を亢進させる⁹⁾。胃癌では高分化腺癌を主体に p73 遺伝子の欠失が見い出されている⁹⁾。

CDK インヒビター p27^{KIP1} の発現減弱も, 胃癌, 大腸癌の進行度, 悪性度と相関する(表 1)^{10,11)}。胃粘膜内癌では p27 の発現は概ねよく保たれているが, 進行癌や深部浸潤癌では発現は減弱し, リンパ節転移とも有意な相関を示す。リンパ節転移を有する症例で原発巣と転移巣における p27 の発現を比較すると, 原発巣では p27 の発現が不均一で, 転移巣では発現が殆ど見られないことが多く, p27 の発現が減弱した癌細胞が選択的に転移をきたす可能性が示唆されている。さらに, p27 の発現低下を示す症例は予後不良である。一方, 胃腺腫においても約 10 % で p27 の発現が減弱しており, それらの多くは癌へと進行する。大腸腺腫では p27 の発現は比較的良好に保たれており, 大腸癌における p27 の発現の減弱あるいは消失は, 深部への浸潤やリンパ節転移と正の相関を示す。よって, p27 の発現減弱は, 胃癌, 大腸癌の発生と進展のどちらにも関わっている可能性がある。尚, p27 の場合も遺伝子自体には異常はなく, 発現減弱は翻訳後の蛋白分解の亢進によってもたらされる。

表 1. 大腸腫瘍における CDK インヒビター p27 の発現

症例数	109	p27 の発現 ^{*1}			P 値 ^{*2}
		保持	減弱	消失	
症例数	109	67 (61 %)	28 (26 %)	14 (13 %)	
ステージ ^{*3}					
0	39	30 (77 %)	6 (15 %)	3 (8 %)	0.1706
1	27	19 (70 %)	6 (22 %)	2 (7 %)	
2	19	9 (47 %)	9 (47 %)	1 (5 %)	
3	18	7 (39 %)	6 (33 %)	5 (28 %)	
4	6	2 (33 %)	1 (17 %)	3 (50 %)	
深達度 ^{*3}					
m	39	30 (77 %)	6 (15 %)	3 (8 %)	0.0443
sm, mp	29	19 (66 %)	6 (21 %)	4 (14 %)	
mp 以上	41	18 (44 %)	16 (39 %)	7 (17 %)	
リンパ節転移					
無し	87	59 (68 %)	21 (24 %)	7 (8 %)	0.0042
有り	22	8 (36 %)	7 (32 %)	7 (32 %)	

*1 p27 の発現 : “消失”, 5 % 以下の腫瘍細胞のみが弱陽性 ; “減弱”, 5 ~ 30 % の腫瘍細胞が陽性 ; “保持”, 30 % 以上の腫瘍細胞が強陽性。

*2 P 値が 0.05 の場合に有意である (Fisher's exact test)。

*3 大腸癌取扱い規約による。

CDK4 / 6 を主な標的とする p16^{MTS1 / INK4A} 及び p15^{MTS2 / INK4B} は, 食道癌を含む様々な癌細胞株において遺伝子の完全欠失が認められ, 原発性食道癌でも欠失及び変異が報告されている¹²⁾。食道癌細胞株では, p16 / p15 遺伝子欠失株においてサイクリン D1 及び CDK4 の過剰発現が認められる¹³⁾。胃癌では, p16 遺伝子の欠失や変異は殆どないが, 約 20 % においてプロモーターのメチル化による p16 蛋白の発現減弱が認められる。

3. CDC25 と Chk ファミリー

サイクリン / CDK 複合体は, CDK の 14 位のスレオニンと 15 位のチロシンがリン酸化されて不活化状態にあり, CDC25 によって脱リン酸化されることにより, 最終的に活性化型となる。CDC25 には, A, B, C の 3 種類が存在し, CDC25A は G1 / S 期で, CDC25B 及び CDC25C は G2 / M 期で機能するものと考えられている。胃癌では, CDC25A 及び CDC25B の過剰発現が, それぞれ 40 %, 70 % に認められ, とりわけ, CDC25B の過剰発現は, ステージの進行, 深達度, リンパ節転移

と有意に相関する¹⁴⁾。

Chk1は、CDC25の上流に存在し、CDC25をリン酸化することにより、その脱リン酸化酵素活性を抑制する¹⁵⁾。Chk1のmRNAの発現は、大部分の胃癌において明らかに低下しており、Chk1の不活化が細胞周期の負の制御を解除し、癌化に關与している可能性が考えられる。Chk2は、CDC25Cの216番目のセリンをリン酸化することによって不活化する¹⁶⁾。これは、様々なDNA損傷によってATM(ataxia telangiectasia mutated)を介して活性化され、細胞周期をG2/M期に停止させる役割を担っている。Li-Fraumeni症候群に類似した多発がん家系の一部において、Chk2の生殖細胞変異が見い出されており、大腸癌、胃癌の発生が報告されている¹⁷⁾。通常の消化管癌におけるChk2遺伝子の体細胞変異の關与について、今後検討する必要がある。

4. 転写因子E2F

G1/Sチェックポイントにおいて活性化したCDKは、Rb蛋白を高リン酸化型に変え、細胞周期の抑制を解除する¹⁾。転写因子E2FはこのRbの標的であり、サイクリンE、DNAポリメラーゼ、dihydrofolate reductaseなどDNA合成や細胞周期に關連する遺伝子の発現を制御している。E2Fは、E2F-1からE2F-6の少なくとも6種類が知られているが、それぞれは癌の種類あるいは臓器によって役割は異なっているようである。例えば、E2F-4はトランスフォーミング活性を有するが、E2F-1ではノックアウトマウスにおいて癌の発生が抑制される臓器と促進される臓器とが確認されている。胃癌では、E2F-1の遺伝子増幅は4%の症例に見られるに過ぎないが、mRNAレベルでの過剰発現は40%に存在する¹⁸⁾。逆に、E2F-3の発現は、70%の胃癌症例において減弱している。大腸癌では、25%の症例においてE2F-1遺伝子の増幅があり、60%ではE2F-1 mRNAの過剰発現が認められるが、ステージの進行、深達度や転移能との相関性はない¹⁸⁾。E2F-1の過剰発現が、thymidylate synthaseの発現/活性を介してそれを標的とする5-FUに対する抵抗性を増加させる、という報告があり、消化管癌におけるE2F-1の発現レベルと薬剤感受性との関係が注目される¹⁹⁾。E2F-4遺伝子には、セリンをコードするAGCの繰り返し配列が13個連続して存在する。遺伝子不安定性を示す胃癌、大

腸癌では、この部位の複製エラーがそれぞれ30%、40%に認められる²⁰⁾。

なお、RbによるE2Fの転写活性の抑制には、低リン酸化型RbとE2Fが複合体を形成してE2FのパートナーDPがDNAに結合するのを阻害することと共に、ヒストン脱アセチル化酵素活性を介してヌクレオソーム構造を強固にすることが關与している。さらに、E2F自体が脱アセチル化されるとDNA結合能が抑制されること、E2F-1がRbとともにDNAメチル化酵素(DNMT1)と結合して転写調節領域をメチル化すること、などが明らかになっている^{21,22)}。

分子病理診断へのアプローチ

これまでに述べた細胞周期調節因子の異常に加えて、消化管癌の発生・進展に關与する様々な遺伝子/分子の異常が明らかになっており、分子病理診断の遺伝子マーカーとして用いることができる。まずここでは、各々の遺伝子/分子の異常と診断のマーカーとしての意義について概説することから始めたい。

1. 遺伝子/分子異常の診断マーカーとしての意義

消化管癌は、多段階的にジェネティックあるいはエピジェネティックな異常が蓄積し、多くは前癌性病変を経て発生し進展していく²³⁾。遺伝子/分子の異常には、食道癌、胃癌、大腸癌のいずれにも共通するものと特異的なものが存在し、同じ異常でもそれぞれで意義の異なることもあるので、診断に用いるには個々における役割を十分に把握しなければならない。

テロメラーゼの活性化によるテロメアDNA(TTAGGGの繰り返し配列)の保持は、染色体の安定性を介して細胞の不死化を惹起し、癌化の早期に關与するものと考えられる^{24,25)}。食道癌、胃癌、大腸癌では共通して組織型や進行度に関係なく強いテロメラーゼ活性が認められる。さらに、前癌性病変とされる食道の異形成、胃の腸上皮化生や腺腫、大腸腺腫においても、低いレベルではあるが30~50%の頻度でテロメラーゼ活性は見い出される²⁶⁾。その触媒サブユニットTERTも大部分の消化管癌で過剰発現するが、前癌性病変では、テロメラーゼ活性に先行して発現が認められ、『真の前癌性病変』を抽出する有用なマーカーとなる。

遺伝子不安定性は、遺伝子異常の蓄積の原因となり癌化の初期に関わる異常である。5領域のマイクロサテライトの内 2領域以上が複製エラーを示すものを強い不安定性 (high-frequency of microsatellite instability: MSI-H) 1領域のものを弱い不安定性 (low-frequency of MSI: MSI-L) と定義すると、MSI-Hは通常の胃癌の3%程度にしか検出されない。しかし、MSI-Lは、胃癌や大腸癌では30~60%に認められ、腸上皮化生や腺腫においても遺伝子不安定性を有するものがあるが、それは『真の前癌性病変』と見なすべきである^{27, 28)}。MSI-Hは、*hMSH2*、*hMLH1*などのミスマッチ修復系遺伝子の生殖細胞変異が原因となっておこる遺伝性非ポリポーシス性大腸癌 (hereditary non-polyposis colorectal cancer: HNPCC) の指標となる²⁹⁾。尚、*hMLH1* 遺伝子の発現低下は、特異抗体を用いた免疫染色でスクリーニングすることができるが、遺伝性でない場合の発現低下は、転写調節領域のメチル化によることが多い³⁰⁾。また、MSIの頻度は単発癌が約10%であるのに対し多発癌では約90%と明らかに多発癌に多いことから、癌の多発性の推定に有用である³¹⁾。

がん抑制遺伝子 *p53* の欠失や変異は、食道癌、胃癌、大腸癌のいずれにおいても50~60%の頻度で見られ、異形成や腺腫では異型度とともに不活化の頻度は増加する²³⁾。*APC* 遺伝子の欠失/変異は、大腸、胃ともに、腺腫の時点から高頻度に認められる。

消化管癌における細胞周期調節因子の異常の詳細については既に述べた。*CDK* インヒビター *p21^{WAF1/CIP1}* の発現低下は大腸癌の、*p27^{KIP1}* の発現低下は胃癌及び大腸癌の悪性度のマーカーとなる^{8,10,11)}。また、*p27^{KIP1}* の発現減弱は、胃では腺腫から癌への進行の指標となる。一方、サイクリンEの遺伝子増幅/過剰発現は胃癌と大腸癌の、サイクリンD1の遺伝子増幅/過剰発現は食道癌の悪性度診断のよい遺伝子マーカーである^{2,3,5)}。

増殖因子レセプター型癌遺伝子 *c-erbB2* 及び *K-sam* 遺伝子の増幅は、それぞれ胃の高分化腺癌、スキルス癌に選択的に認められ、*c-met* 遺伝子の増幅は、ほぼ特異的に胃癌に認められる²³⁾。これらの遺伝子増幅及び過剰発現は、いずれも悪性度とよく相関する。*EGFR* 遺伝子の増幅/過剰発現も、食道癌、胃癌の悪性度のよい指標である。さらに、様々な増殖因子やサイトカインの過剰発現が高悪性度の癌において認められる²³⁾。

VEGF や *IL-8* などの血管新生因子は、転移との関連が報告されている^{32,33)}。

2. 消化管病理検体に対する遺伝子診断(分子病理診断)

前述した分子病理学的知見を基礎として、我々は広島市医師会臨床検査センターと共同で消化管の病理組織検体に対する遺伝子診断システムを開発し実際に診断を行っている^{23,34)}。良悪の鑑別診断及び真の前癌性病変の抽出、癌の悪性度診断、多発癌の推定及びHNPCCの同定を目的としたものである。

1) 分子病理診断の手順と方法

図3には、病理検査室での検体受付から最終診断までの過程を示した。検体は、病理組織診断の目的で提出される生検あるいは切除組織(内視鏡的粘膜切除、外科的切除)のホルマリン固定材料であり、遺伝子診断のために採取したものではない。通常のパラフィン切片を作成、組織染色し、病理組織診断を行う。病理医が顕微鏡で観察する段階で、遺伝子解析をするべき症例(癌、異型腺腫、異形成、境界領域病変)と検索する切片を指示する。検査室では、これに基づいてパラフィンブロックを薄切し、後述する多種の分子/遺伝子マーカーの免疫染色を行うとともに、HE染色未封入切片5枚を遺伝子解析用として準備する。病理医は、免疫染色の結果と組織像を総合し、この時点で新たな情報が得られた場合には分子病理学的所見とその意義についての解説を加えた分子病理診断報告書を作成し主治医に報告する。

遺伝子解析では、確実に組織学的に問題となる部位のみを検索するため、準備したHE染色未封入切片に病理医が顕微鏡下で検索すべき部位をフェルトペンでマークする。検査室では、そこから組織を針先でエッペンドルフチューブに回収し、常法によってDNAを抽出する。これに対して、非ラジオアイソトープ系の polymerase chain reaction (PCR) - SSCP (single-strand conformational polymorphism) 及び PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) で *p53* 遺伝子と *APC* 遺伝子の変異、欠失を検索する。さらに、マイクロサテライト法による複製エラーの検出では、マイクロサテライト領域を蛍光色素標識プライマーを用いてPCRで増幅し、ABI社のオートシーケンサーPRISM310で解析す

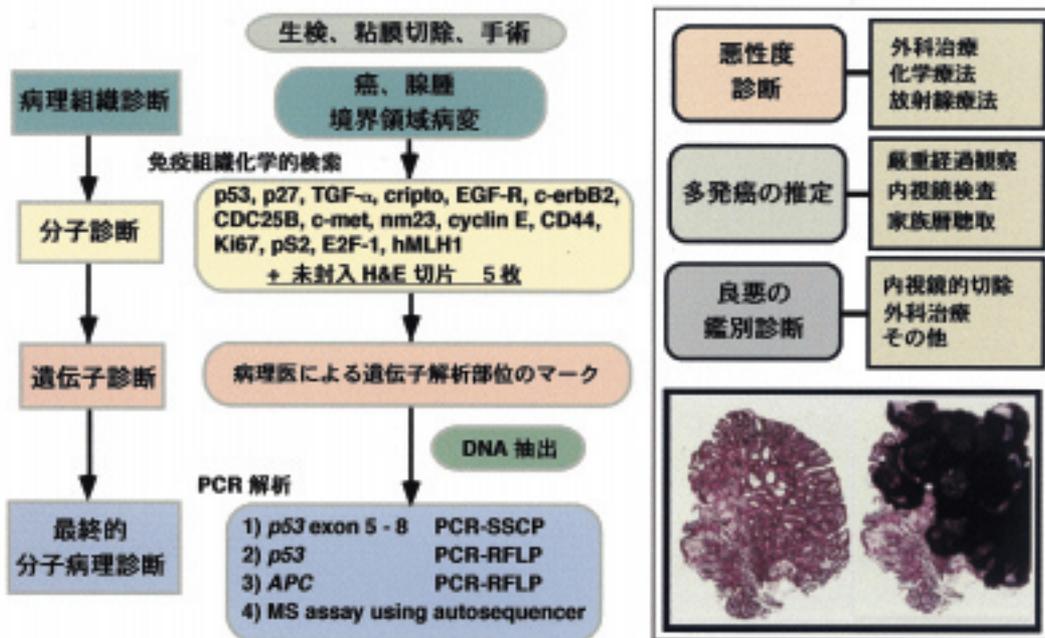


図 3. 胃の病理組織検体に対する遺伝子診断の手順

る。蛍光色素の組み合わせにより、同時に多ローカスを検索できるのが利点である。ここまで得られた遺伝子解析の結果と免疫染色、病理組織像とを総合して、最終的分子病理診断（遺伝子診断）を行う。

これらの検索の内、免疫染色、DNAの抽出、PCR-SSCP、PCR-RFLPは、検査センターの病理・細胞診検査科において検査技師が行い、マイクロサテライト解析は大学の研究室で行っている。解析に必要な経費は徴集しておらず、大部分は広島市医師会の篤志と教室の研究費によって賄っており、遺伝子診断を行う分子病理医は全くのボランティアとして関わっている。

2) 検索項目

食道癌、胃癌、大腸癌の遺伝子/分子の異常には共通性と特異性が存在するために、それに対応した遺伝子マーカーのセットを、臓器別に設定している（表 2）。胃癌では、鑑別診断として、*p53*、*APC*、*CD44*などを、悪性度のマーカーには、*EGFR*、*c-met*、*c-erbB2*、サイクリンE、*p27*、*CDC25B*などを用いている。さらに、悪性度マーカーとして、食道癌ではサイクリンD1を、大腸癌では*p21*及び*SLX*を加えている。また、遺伝子不安定性のスクリーニングとして、*hMLH1*の発現異常を免疫染色によって検索している。PCR-SSCP及びPCR-RFLPでは、*APC*遺伝子、*p53*遺伝子の欠失/変異を検索する。

マイクロサテライト法では、CAリピートであるD1S191とD17S855（*BRCA 1*領域）及びポリアデニン配列であるBATRII（*TGF II*型レセプター）とBAT40の4領域を検索し、2領域以上に異常を検出した場合にMSI-Hと判断する。MSI-Hの場合には、*hMLH1*と*hMSH2*の変異の有無をPCR-SSCP法で検索する。検索項目は定期的に見直し、新しいマーカーについては必ずretrospective studyを行って診断における意義を確認した後に実践導入している。

表 2. 消化管癌の分子病理診断マーカーと悪性度診断の成績

	マーカー	目的	高悪性度癌
食道癌	p53	鑑別診断	66 / 214
	EGF, TGF, EGFR, Ki-67	悪性度診断	(31%)
	cyclin D1	転移能予測	
胃癌	p53, APC	鑑別診断	357 / 2969
	TGF, EGFR, cripto, c-met, c-erbB2, cyclin E, p27, CDC25B, E2F-1, Ki-67	悪性度診断	(12%)
	nm23, CD44	転移能予測	
	複製エラー, MLH1, MSH2	多発癌推定	
大腸癌	p53, APC, CD44	鑑別診断	148 / 2011
	EGF, TGF, cripto, EGFR	悪性度診断	(7%)
	cyclin E, p27, p21, Ki-67		
	nm23, SLX	転移能予測	
	複製エラー, MLH1, MSH2	HNPCC推定	

3) 成果と問題点

1993年に免疫染色のみで分子病理診断を開始し、1995年にはPCR-SSCPとPCR-RFLPを、1996年にはマイクロサテライト法を導入してきたが、これまでに既に10,000病変以上の消化管の病理組織を解析した。その成績は、悪性度診断については、食道癌、胃癌、大腸癌でそれぞれ31%、12%、7%を高悪性度癌と診断した。これらは経過観察において確かに予後不良の傾向を示している。良悪の鑑別診断に関しては、胃の境界領域病変の20%以上が癌と確定でき、胃腺腫では、p53, p27, cyclin Eなどの異常から、10%が癌化の可能性の高い腺腫(真の前癌性病変)と判定した。MSI-Hを示した胃癌は約3%であるが、その半数において臨床的に同時性あるいは異時性の多発癌が確認されている。

我々の診断システムの問題点のひとつは、遺伝子解析を行う切片上の部位(DNA抽出部位)を簡便な方法としてフェルトペンで指示し、そこから可及的正確に検体組織を回収するところにある。よって、胃の印環細胞癌のように正常腺管の間質に少数の癌細胞が混在している場合や、スキルス癌のように間質結合組織の間を瀰漫性に浸潤・増生するようなタイプの癌では、正確な試料の採取が困難で遺伝子検索は行えない。これに対処するため、レーザーマイクロダイセクションを導入し、ルーチン化に向けての検討を行っているが、これを用いると正確に腫瘍部とコントロールとしての正常粘膜上皮が分離して回収できる(図4)。

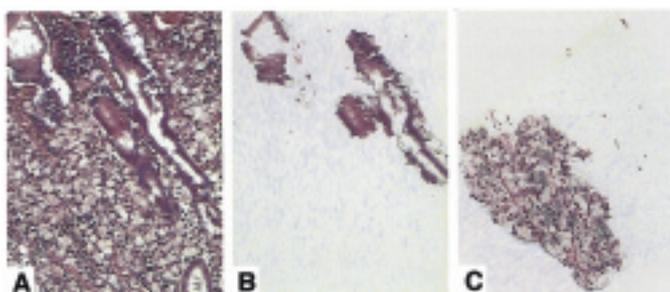


図4. レーザーマイクロダイセクションを用いたサンプル採取

間質に印環細胞癌の浸潤が認められ(A)、赤外線レーザーを目的とする部位に照射することにより、正常腺管(B)と癌(C)が混入なく確実に採取できる。

3. 今後の病理分野における遺伝子診断の展望

本年6月26日、米国のクリントン大統領と英国のブレア首相は、ヒトゲノムの全塩基配列がほぼ明らかにされたことを発表した。これは、科学の今世紀における最大の功績であり、さらに、この情報は全人類が共有すべきものであることを付け加えた。これで、約10万個の遺伝子が同定されたことになる。ポストシーケンズ時代の幕開けである。また、DNAチップ、DNAマイクロアレイ技術が確立され、膨大な種類の遺伝子の変異あるいは発現を迅速に検索し、ファイリングかつ分析できるようになってきた。病理分野における遺伝子診断も、時代に相応しいものへと進化する時である。これまでに蓄積された消化管癌の発生・増殖・進展の分子機構に関する知見と今後体系的・網羅的に明らかにされる知見を融合し、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子解析が消化管組織の診断においても主流となるに違いない。ルーチンシステムの構築には、まず意義が既に知られている多種の遺伝子異常を検出するためのチップをそれぞれの臓器癌について作成し、解析結果を集積していく必要がある。癌において同定される実に多くの遺伝子異常あるいはエピジェネティックな異常の中で、本質的異常と続発した変化とが明確にできれば、百から数百程度の遺伝子検索で十分と推定される。重要なことは、ひとつひとつの癌の個性、即ちそれぞれの発生・進展機序の共通性と特異性が明らかになり、遺伝子治療あるいは分子標的治療に直結した診断を病理診断として行えるようになることである。

また、1塩基置換による遺伝子多型(SNP: single nucleotide polymorphism)と薬剤感受性や発癌感受性との関係が注目されている^{16,17)}。SNPプロジェクトの推進によって、詳細な病態や感受性と様々なSNPとの対応が明らかになり、遠くない将来には、病理組織検体から薬物療法や疾患の予防に関する情報を得ることが可能である。

一方、病理組織に対する遺伝子解析・遺伝子診断は、形態像と遺伝子/分子の異常を対比することが最大の特徴であり、病理形態の理解を深め、病理診断の精度の向上に還元できるものである。「病理学」は長い歴史の中で、病理解剖を含む形態学的観察から得られた知識の蓄積により、本当に微細な形の異常さえも

見出し, 実に詳細に病態を分類してきた。病理分野における遺伝子診断のもうひとつの重要な使命は, 遺伝子・分子・機能の異常が如何に形態像に投影されるかを明らかにすることであり, 病理学の成書に記載されたすべての疾病の形態異常を遺伝子あるいは分子の異常と対応させることが究極の目標であろう。

おわりに

消化管癌における細胞周期調節因子の意義とそれをはじめとする遺伝子・分子の異常の検索による分子病理診断について述べた。病理検体から, 組織学的な良悪や分化度についての診断のみでなく, 予後や遺伝性に関しても重要な示唆が得られる。特に, 消化管癌については, 内視鏡的に組織採取が容易であり, 組織診断用のホルマリン固定材料に加えて遺伝子解析用に新鮮材料を採取することによって, 今後の展望で述べたようにより多くの情報が得られることは間違いない。

文 献

- 1) Sherr CJ: Cancer cell cycle, *Science*, 274: 1672 ~ 1677, 1996.
- 2) Yoshida K, et al.: Multiple genetic alterations and abnormal growth factor network in human esophageal carcinomas. In *Molecular Pathology of Gastroenterological Cancer* (Tahara, E. ed), pp. 55 ~ 70, Springer, Tokyo, 1997.
- 3) Akama Y, et al.: Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas, *Jpn J Cancer Res*, 86: 617 ~ 621, 1995.
- 4) Kitahara K, et al.: Concurrent amplification of cyclin E and cdk 2 genes in colorectal carcinomas, *Int J Cancer*, 62: 25 ~ 28, 1995.
- 5) Yasui W, et al.: Expression of cyclin E in colorectal adenomas and adenocarcinomas: Correlation with expression of Ki-67 and p53 protein, *Virchows Archiv*, 429: 13 ~ 19, 1996.
- 6) Yasui W, et al.: Increased expression of p34^{cdc-2} and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas, *Int J Cancer*, 53: 36 ~ 41, 1993.
- 7) Yasui W, et al.: Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/CIP1} in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relation with p53 status and proliferative activity, *J Pathol*, 180: 122 ~ 128, 1996.
- 8) Yasui W, et al.: Expression of p21^{WAF1/CIP1} in colorectal adenomas and adenocarcinomas and its correlation with p53 protein expression, *Pathol Int*, 47: 470 ~ 477, 1997.
- 9) Yokozaki H, et al.: Alterations of p73 preferentially occur in gastric adenocarcinomas with foveolar epithelial phenotype, *Int J Cancer*, 83: 192 ~ 196, 1999.
- 10) Yasui W, et al.: Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{KIP1} is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas, *Jpn J Cancer Res*, 88: 625 ~ 629, 1997.
- 11) Yasui W, et al.: Expression of cell-cycle-regulating transcription factor E2F-1 in colorectal carcinomas, *Pathobiol*, 67: 174 ~ 179, 1999.
- 12) Nobori T, et al.: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers, *Nature*, 368: 753 ~ 756, 1994.
- 13) Kitahara K, et al.: Expression of cyclin D 1, CDK 4, and p27^{KIP1} is associated with the p16^{MTS1} gene status in human esophageal carcinoma cell lines, *J Exp Therap Oncol*, 1: 7 ~ 12, 1996.
- 14) Kudo Y, et al.: Overexpression of cyclin-dependent kinase-activating CDC25B phosphatase in human gastric carcinomas, *Jpn J Cancer Res*, 88: 947 ~ 952, 1997.
- 15) Sanchez Y, et al.: Conservation of the Chk 1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to cdk regulation through Cdc25, *Science*, 277: 1497 ~ 1501, 1997.
- 16) Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ: Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk 2 protein kinase, *Science*, 282: 1893 ~ 1897, 1998.
- 17) Bell DW, et al.: Heterozygous germ line hCHK 2 mutations in Li-Fraumeni syndrome, *Science*, 286: 2528 ~ 2531, 1999.

- 18) Suzuki T, et al.: Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas, *Int J Cancer*, **81**: 535 ~ 538, 1999.
- 19) Banrjee D, et al.: Role of E2F-1 in chemosensitivity, *Cancer Res*, **58**: 4292 ~ 4296, 1998.
- 20) Souza RF, et al.: Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors, *Cancer Res*, **57**: 2350 ~ 2353, 1997.
- 21) Marzio G, et al.: E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation, *J Biol Chem*, **275**: 10887 ~ 10892, 2000.
- 22) Robertson KD, et al.: DNMT 1 forms a complex with Rb, E2F 1 and HDAC 1 and represses transcription from E2F-responsive promoters, *Nature Genet*, **25**: 338 ~ 342, 2000.
- 23) Yasui W, Yokozaki H, Tahara E: Molecular diagnosis of gastrointestinal cancer. In *Molecular Pathology of Gastroenterological Cancer* (Tahara, E. ed) pp.187 ~ 207, Springer, Tokyo, 1997.
- 24) Yasui W, et al.: Expression of telomerase catalytic component, telomerase reverse transcriptase, in human gastric carcinomas, *Jpn J Cancer Res*, **89**: 1099 ~ 1103, 1998.
- 25) Tahara H, et al.: Immuno-histochemical detection of human telomerase catalytic component, hTERT, in human colorectal tumor and no-tumor tissue sections, *Oncogene*, **18**: 1561 ~ 1568, 1999.
- 26) Yasui W, et al.: Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach, *Jpn J Cancer Res*, **90**: 589 ~ 595, 1999.
- 27) Semba S, et al.: Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach, *Cancer*, **77 / 8 S**: 1620 ~ 1627, 1996.
- 28) Hamamoto T, et al.: Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers, *J Clin Pathol*, **50**: 841 ~ 846, 1997.
- 29) Nakahara M, et al.: Identification of concurrent germline mutations in hMSH2 and / or hMLH1 genes in Japanese hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **6**: 1057 ~ 1064, 1997.
- 30) Fleisher AS, et al.: Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability, *Cancer Res*, **59**: 1090 ~ 1095, 1999.
- 31) Yokozaki H, et al.: Microsatellite instabilities in gastric cancer patients with multiple primary cancers, *Int J Oncol*, **14**: 151 ~ 155, 1999.
- 32) Yamamoto S, et al.: Expression of vascular endothelial growth factor in human gastric carcinomas, *Pathol Int*, **48**: 499 ~ 506, 1998.
- 33) Kitadai Y, et al.: Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas, *Am J Pathol*, **152**: 93 ~ 100, 1998.
- 34) Yasui W, et al.: Molecular-pathological diagnosis of gastrointestinal tissues and its contribution to cancer histopathology, *Pathol Int*, **49**: 763 ~ 774, 1999.
- 35) Garcia E, et al.: MUC 6 gene polymorphism in healthy individuals and in gastric cancer patients from northern Portugal, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **6**: 1071 ~ 1074, 1997.
- 36) Hengstler JG, et al.: Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility, *Recent Results Cancer Res*, **154**: 47 ~ 85, 1998.

Abnormalities in Cell Cycle Regulators And Its Application to Molecular Diagnosis

Wataru YASUI

First Department of Pathology, Hiroshima University School of Medicine
1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551

Key Words

Cell Cycle Regulator, Molecular-Pathological Diagnosis, Gastrointestinal Cancer