



Title	Expression and Mutation of SMAD4 in Poorly Differentiated Carcinoma and Signet-ring Cell Carcinoma of the Colorectum
Author(s)	瀬下, 巖
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48871">https://hdl.handle.net/11094/48871</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	瀬下 嶽
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第21463号
学位授与年月日	平成19年4月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Expression and Mutation of SMAD4 in Poorly Differentiated Carcinoma and Signet-ring Cell Carcinoma of the Colorectum (大腸低分化癌、印環細胞癌におけるSMAD4発現と遺伝子変異)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人
	(副査) 教授 青笹 克之 教授 野口眞三郎

## 論文内容の要旨

大腸癌の中で低分化癌や印環細胞癌は悪性度が高く予後不良であることが知られているが、極めて稀な組織型であるためその分子生物学的な背景についてはほとんど知られていない。TGF-beta シグナル伝達系は細胞膜受容体（I型、II型）と核内にシグナルを伝達する SMAD family (SMAD1-4) から構成され、上皮細胞の増殖制御に重要な役割を果たす。TGF-beta II型受容体 (TGF beta RII) はマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability : MSI) を示す大腸癌・胃癌細胞などで変異がみつかっており、また SMAD4 は家族性若年性ポリポーラスの原因となる癌抑制遺伝子として知られている。本研究では、TGF-beta シグナル伝達系の上流で働く TGF-beta RII と、下流で働く SMAD4 の異常を探査し、低分化癌・印環細胞癌における TGF-beta シグナル伝達異常の関与について検討した。

## (対象と方法)

1981年から1999年までに手術を受けた大腸癌症例のうち、低分化癌 38例、印環細胞癌 5例と、高・中分化腺癌 32例を対象とした。

1. 免疫染色：4 μm厚のパラフィン切片を作成し、ABC (avidin-biotin complex) 法により抗ヒト DPC4 (SMAD4) モノクローナル抗体 (clone B-8, Santa Cruz) を用いて SMAD4 染色を行った。陰性コントロールとして一次抗体の代わりに非免疫 IgG を用いた。
2. SMAD4 遺伝子変異：倒立顕微鏡下に、正常部と腫瘍部とを micro-dissection により切り出し SMAD4 遺伝子の mutation cluster region である exons 8-11 を PCR-SSCP 法により検索した。検出された異常バンドは direct sequence を行い変異の有無を調べた。
3. MSI 解析：6箇所の microsatellite loci (BAT-26, BAT-40, D2S123, D2S136, D3S1067, and D13S175) を検索し、2箇所以上に異常が認められた腫瘍を MSI 陽性とした。
4. TGF-beta RII 遺伝子変異：MSI の標的遺伝子である TGF-beta RII の異常を検索した。TGF-beta RII 遺伝子内の 10 adenine repeats (nucleotides 709 to 718) に対する PCR を行い、正常部 DNA と比べて腫瘍部 DNA での異常バンドを検出した。

### (成績)

1. 臨床病理学的背景：低分化・印環細胞癌は高・中分化腺癌に比べて有意に腫瘍径が大きく、右側結腸の割合が多かったが、それ以外の臨床病理事項（年齢、性差、臨床病期、など）に有意差を認めなかった。
2. SMAD4 免疫染色：正常大腸粘膜では検索した全ての例（N=75）で細胞核に強い SMAD4 蛋白発現が検出された。大部分の高・中分化腺癌（32 例中 29 例 : 91%）ではびまん性に中～強度の SMAD4 発現がみられた。一方、38 例中 12 例の低分化癌（32%）と 5 例中 4 例の印環細胞癌（80%）では腫瘍部の SMAD4 発現が消失していた。SMAD4 発現消失の割合は高・中分化腺癌に比べて低分化癌および印環細胞癌で有意に高頻度であった。
3. SMAD4 遺伝子変異：低分化癌の 26 例中 2 例のみに変異を認めた。1 例は exon 11 codon 531 に missense mutation (Arg : Trp) を、もう 1 例は exon 11 の上流のイントロンに 1 塩基欠失を認めた。高・中分化腺癌、印環細胞癌では変異を認めなかった。
4. MSI：38 例中 15 例の低分化癌（40%）と 5 例中 1 例の印環細胞癌（20%）で MSI 陽性であった。高・中分化腺癌では MSI は認められなかった。
5. TGF-beta RII 遺伝子変異：38 例中 10 例の低分化癌（28.6%）に frameshift を引き起こす 10 adenine repeats 中の 1 塩基欠失を認めた。印環細胞癌では異常を認めなかった。

### (結論)

低分化癌の 32% に TGF-beta シグナル伝達系の上流に位置する TGF-beta RII のフレームシフト変異を、28% に下流に位置する SMAD4 発現の消失を認めた。また印環細胞癌の 80% で SMAD4 発現異常を認めた。一方、高・中分化腺癌では、SMAD4 の発現消失は 9% にすぎず、MSI は認めなかった。

本研究の結果、約 50% の低分化癌、80% の印環細胞癌に上流・下流少なくともひとつの異常が起きており、これらの組織型癌の発生に TGF-beta シグナル伝達系異常の関与が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

大腸癌の中で低分化癌や印環細胞癌は悪性度が高く予後不良であることが知られているが、極めて稀な組織型であるためその分子生物学的な背景についてはほとんど知られていない。本研究ではこれらの組織型の大腸癌における TGF-beta シグナル伝達異常の関与について検討した。低分化癌 38 例、印環細胞癌 5 例と、高・中分化腺癌 32 例を対象とした。低分化腺癌の 32% に TGF-beta シグナル伝達系の上流に位置する TGF-beta RII の変異を、28% に下流に位置する SMAD4 発現の消失を認めた。また印環細胞癌の 80% で SMAD4 発現異常を認めた。一方、高・中分化腺癌では、SMAD4 の発現消失は 9% にすぎず、MSI は認めなかった。本研究の結果、約 50% の低分化癌、80% の印環細胞癌に上流・下流少なくともひとつの異常が起きており、これらの癌の発生に TGF-beta シグナル伝達系異常が関与する可能性がはじめて明らかとなった。これらの所見は、腫瘍学の分野で特に組織型（細胞分化）に関する知見の進歩に寄与するものであり学位に値すると認める。