

DNA multiploidy を示す大腸癌における 左側大腸優位性と癌の家族歴について

長崎大学医学部第1外科, 同医療技術短期大学部*

澤井 照光 辻 孝 七島 篤志
地引 政晃 山口 広之 安武 亨
中越 享 綾部 公懿 田川 泰*

DNA multiploidy を示す大腸癌の特徴を明らかにする目的で、1990年から1996年までの間に当科において切除された大腸癌430例のうち flow cytometry によって核 DNA 量が測定された245例について検討した。症例を核 DNA 量によって、Dd 群：DNA diploidy を示した78例 (31.8%)、Dm 群：DNA multiploidy を示した36例 (14.7%)、および Da 群：DNA multiploidy を除く DNA aneuploidy 131例 (53.5%) の3群に分類した。Dm 群の特徴は、①Dd 群と比較して左側結腸癌が多く、②Da 群と比較して転移を伴わない症例が多く、③第1度近親者に癌の家族歴が有する症例が多いことの3点であった。無作為に抽出した Dd 群：26例、Dm 群：14例、Da 群：31例についてはさらに p17H8を用いた fluorescence in situ hybridization を行った。その結果、Dm 群における第17番染色体数的異常は Dd 群と同程度であり、Da 群と比較して低率であった。

Key words : DNA multiploidy of colorectal cancer, Chromosomal instability of colorectal cancer, numerical aberration of chromosome 17 of colorectal cancer, family history of extracolonic malignancy

はじめに

大腸腫瘍に関する核 DNA 量についての研究はすでに数多くなされており、大腸癌における DNA aneuploidy (以下、Da と略す) の頻度は35~82%であると報告されている^{1)~8)}。核 DNA 量が、大腸癌において独立した予後指標因子として有用であるか否かについては議論を残しているものの^{1)~6)}、腫瘍の占居部位別による差^{3)~7)}、多発癌における発癌機序の差⁹⁾、あるいは大腸腺腫の大きさ・組織型との関連や¹⁰⁾、大腸腺腫における核 DNA 量と大腸癌の家族歴との関連性¹¹⁾などを考察する上で数々の興味深い知見が得られている。

一方、大腸癌腫瘍組織内において複数の stemline が認められる DNA heterogeneity の存在は、核 DNA 量を判定する上での問題点を提起したのみならず¹²⁾、癌が発育・進展していく過程における genetic instability や clonal evolution を考察する上でも重要な所見である^{13)~14)}。しかしながら、採取された1つの検体内

に同時に複数の stemline が認められる DNA multiploidy (以下、Dm と略す) に関しては、その臨床病理学的意義についていまだ十分に解明されていない。そこで今回われわれは、過去6年間に経験した大腸癌のうち Dm を示した症例について、臨床病理学的因子、ならびに第17番染色体数的異常を、同時期における DNA diploidy (以下、Dd と略す) や、異常な stemline が1個のみである Da 症例と比較検討したので報告する。

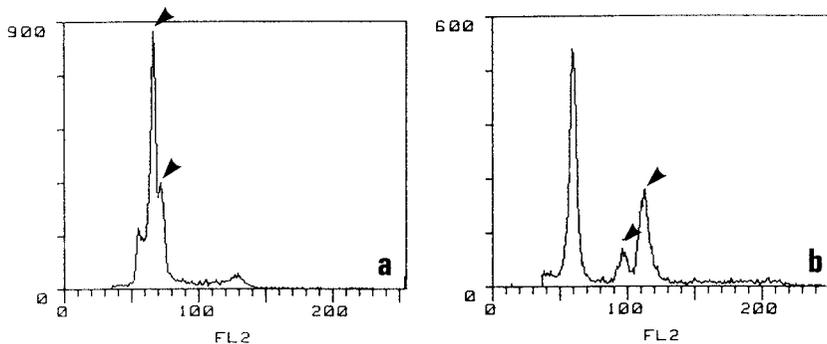
1. 対象および方法

1990年5月から1996年4月までの過去6年間に長崎大学医学部第1外科において外科的切除が行われた大腸癌430例のうち、flow cytometry によって核 DNA 量が測定された245例を対象とした。なお、家族性大腸ポリポーシスや、Amsterdam minimal criteria¹⁵⁾を満たす遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (以下、HNPCC と略す) は対象より除外した。

核 DNA 量の測定法は、過去の報告^{16)~17)}に従った。すなわち、新鮮切除標本の腫瘍先進部より採取された組織を細切して0.2% Triton X-100/PBS (-) で裸核浮遊液を作成し、50µg/ml の propidium iodide (Sigma,

Fig. 1 DNA histograms of DNA multiploidy. Arrowheads indicate abnormal stem-lines.

(a ; DI=1.19 and 1.29, b ; DI=1.65 and 1.93)



St. Louis, USA) / 0.1 µg/ml RNase で核染色して FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) により DNA histogram を作成した。

核 DNA 量は内部標準を基準に判定し, DI=1.00 の場合 DNA diploidy, 2 個以上の abnormal peak が認められる場合を DNA multiploidy, 1 個のみ abnormal peak が認められる場合を DNA aneuploidy と判定した。各群における臨床病理学的諸因子や, 大腸多発癌・他臓器重複癌・第 1 度近親者における癌の家族歴の有無, ならびに HNPCC の Japanese criteria¹⁸⁾ を満たす症例であるか否かについて比較検討した。

さらに, 無作為に抽出した 71 例 (Dd 群: 26 例, Dm 群: 14 例, Da 群: 31 例) について第 17 番染色体の数的異常を検出する目的で p17H8 (Oncor, Gaithersburg, USA) を用いた fluorescence in situ hybridization (以下, FISH と略す) を行い, 数的異常の頻度を各群間で比較検討した。FISH はすでに過去に報告した方法^{16) 17)} によって行った。すなわち, 新鮮切除組織より作製した捺印標本を 0.01% pepsin/0.2N HCl で 15 分間インキュベートし, さらに 70% formamide 溶液で 70℃, 2 分間熱変性させた。一方, p17H8 は hybridization mixture に溶解した後 70℃ で 10 分間熱変性させ, 標的 DNA とともに 37℃ で一晩インキュベートした。非特異的結合を 60% formamide 溶液で洗浄し, fluorescein isothiocyanate で蛍光標識した後 propidium iodide で核染色して蛍光顕微鏡により観察した。

統計学的処理は各群間における平均値の比較に t test を, 分布の差の検定に χ^2 test を用い, $p < 0.05$ をもって有意と判定した。

II. 結果

対象とした大腸癌 245 例を核 DNA 量によって 3 群に分類すると, Dd 群: 78 例 (31.8%), Dm 群: 36 例 (14.7%), Da 群: 131 例 (53.5%) であった。代表的な Dm 群の DNA histogram を Fig. 1 に示し, 各群における臨床病理学的因子の一覧を Table 1 にまとめた。平均発症年齢は, Dd 群: 66.4 歳, Dm 群: 63.2 歳, Da 群: 65.3 歳で各群間に有意差はみられなかった。男女比は, Dd 群: 1.44 : 1, Dm 群: 1.12 : 1, Da 群: 1.47 : 1 で, Dm 群では性差が僅かであったが, 統計学的には各群間に有意差はみられなかった。

癌の占居部位をみると, 右側結腸癌の占める割合は Dm 群: 13.9% であり, Dd 群の 47.4%, Da 群の 29.0% と比較して低率であったが, 統計学的には Dd 群との間にのみ有意差が認められた ($p = 0.0006$)。同様に, 左側結腸癌の割合は Dd 群の 17.9% に比べ Dm 群では 41.7% と高率であったが ($p = 0.0069$), 直腸癌が占める割合については各群間で有意差は認められなかった。組織型をみると, 高分化腺癌の占める割合は Dd 群, Dm 群, Da 群の順に低率となり, 一方, 中分化腺癌については逆に Dd 群, Dm 群, Da 群の順に高率となっていた。この関係は Dd 群と Da 群との間でのみ有意であった ($p = 0.0006$)。

病期をみると, Dukes A, B の転移を有さない症例は, Dd 群: 57.6%, Dm 群: 69.4%, Da 群: 45.0% を占めており, Dm 群と Dd 群の間では有意差がみられなかったものの, Dm 群は Da 群と比較して転移のない症例が多かった ($p = 0.0095$)。

大腸多発癌を有する症例は Dd 群, Dm 群, Da 群の順で 14.1%, 8.3%, 4.6% と減少していた。その頻度を

Table 1 Clinicopathological characteristics

	Diploidy	Multiploidy	Aneuploidy
total	78 cases	36 cases	131 cases
mean age(y.o.)	66.4	63.2	65.3
male : female ratio	1.44 : 1	1.12 : 1	1.47 : 1
location			
right colon	37(47.4%)	5(13.9%)	38(29.0%)
left colon	14(17.9%)	15(41.7%)	43(32.8%)
rectum	27(34.6%)	16(44.4%)	50(38.2%)
histology			
well	21(26.9%)	8(22.2%)	14(10.7%)
moderately	46(59.0%)	27(75.0%)	111(84.7%)
poorly	9(11.5%)	1(2.8%)	4(3.1%)
mucinous	2(2.6%)	0	2(1.5%)
Dukes stage			
A	14(17.9%)	7(19.4%)	10(7.6%)
B	31(39.7%)	18(50.0%)	49(37.4%)
C	21(26.9%)	6(16.7%)	52(39.7%)
D	12(15.4%)	5(13.9%)	20(15.3%)
multiple cancer			
absent	67(85.9%)	33(91.7%)	125(95.4%)
present	11(14.1%)	3(8.3%)	6(4.6%)
extracolonic malignancy			
absent	71(91.0%)	33(91.7%)	119(90.8%)
present	7(9.0%)	3(8.3%)	12(9.2%)
HNPCC			
deficient	73(93.6%)	34(94.4%)	125(95.4%)
satisfied	5(6.4%)	2(5.6%)	6(4.6%)
family history			
negative	53(67.9%)	17(47.2%)	86(65.6%)
positive	25(32.1%)	19(52.8%)	45(34.4%)

比較すると ,Dd 群と Da 群との間でのみ有意差がみられた ($p=0.015$) .

他臓器重複癌を有する症例は , Dd 群 : 9.0% , Da 群 : 9.2% , Dm 群 : 8.3% で同等であり , HNPCC の Japanese criteria を満たす症例数の割合も Dd 群 : 6.4% , Da 群 : 4.6% , Dm 群 : 5.6% で 3 群間に有意差はみられなかった .

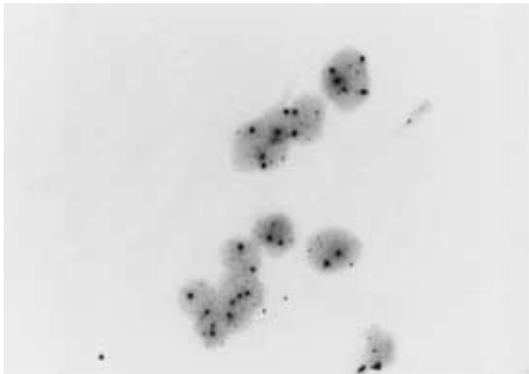
第 1 度近親者における大腸癌を含む悪性腫瘍の家族歴は , Dm 群では 52.8% で陽性であり , Dd 群の 32.1% , Da 群の 34.4% と比較して高率であった (それぞれ $p=0.013$, $p=0.044$) .

FISH により判定された第 17 番染色体数的異常の結果を Fig. 2 と Table 2 に示した . Dm 群における染色体数的異常の頻度は 36% で Da 群の 77% と比較して有意に低率であり ($p=0.0068$) , Dd 群の 50% との間では統計学的に有意差は認められなかった .

III . 考 察

大腸癌における DNA heterogeneity (以下 , Dh と略す) の頻度は 30% 前後と報告されており¹⁹⁾ , 臨床病理学的因子との関連性についても報告されている⁸⁾¹²⁾ . しかしながら , その範疇には Dd と Da との混在例が含まれており , 1 つの検体内に複数の異常な stemline が認められる Dm と同義語ではない . 実際 , Dh 陽性例において , 腫瘍のある特定の部位から得られた検体は必ずしも Dm を示す訳ではない . 腫瘍組織を細分して DNA mapping を行った結果 , multiple stemline を有する例においてもある 1 つの組織が Dm を呈していることは少ない¹³⁾ . このことについて菅井ら²⁰⁾ は , ある領域内で同時に多数の clone が共存することは困難であろうと推測している . 今回われわれは , このような特異な DNA 量を示す症例が , 臨床病理学的にいかなる特徴を有しているかを明らかにするための検討を行った .

Fig. 2 Fluorescence microscopic findings of fluorescence in situ hybridization with p17H8 to colonic adenocarcinoma cell nuclei ($\times 100$)



今回明らかにされた Dm の特徴の 1 つは、Dd に比べ左側結腸癌が多かったことである。散発型大腸癌の占居部位と核 DNA 量との関係を検討した報告では、右側結腸癌においては Dd が多いという結果が明らかにされており^{3,5,7)}、近位側大腸が癌の好発部である HNPCC においても Dd を示す例が多いと報告されている^{21,22)}。ところで、右側結腸癌や HNPCC では microsatellite instability(以下、MIN と略す)を示す頻度が高いことが知られている^{23,24)}。Lengauer ら²⁵⁾は大腸癌の発生に関わる genetic instability には 2 つの経路があり、1 つは MIN、もう 1 つは chromosomal instability(以下、CIN と略す)であると推察している。左側結腸癌において MIN が低率であることと今回の我々の結果から考えると、左側結腸癌の発生には CIN がより強く関与しており、その 1 つの表現型として Dm が高率にみられるのであろう。このことと関連して、CIN のもう 1 つの表現型であると考えられる Dh について、大腸癌においては p53 遺伝子の変異がその出現に関する key event であることが指摘されているが¹⁹⁾、この p53 の異常も右側結腸癌においては低率であることが報告されている^{26,27)}。

以上のことから考えると、Dm 群では第 17 番染色体の数的異常も高率であることが予想されるが、実際には Da 群に比較して有意に佐率という結果であり、Dd 群と同様の頻度にしか過ぎなかった。FISH の判定は 100~200 個の核についてシグナルを計数し、正常リンパ球における結果を基に、monosomy は 20%、trisomy は 15%、tetrasomy は 7% 以上の核で異常が認められた場合を有意であると判定している¹⁷⁾。一方、flow cy-

Table 2 Numerical aberration of chromosome 17

	Monosomy	Disomy	Gain	Total
multiploidy	1(7%)	9(64%)	4(29%)	14 cases
diploidy	5(19%)	13(50%)	8(31%)	26 cases
aneuploidy	1(3%)	7(23%)	23(74%)	31 cases
total	7(10%)	29(41%)	35(49%)	71 cases

tometry では 10,000 個以上の核を対象としており、abnormal peak の coefficient of variation 値が十分小さければ FISH と比較してより minor な population であっても検出可能である。Dm ではいまだ優勢な clone が決定していないとすれば決して矛盾しない結果と思われるが、第 17 番染色体以外の染色体に異常が認められる可能性もあり、今後検討していく必要がある。

さて、Dm の 2 つ目の特徴は、Da と比較してリンパ節転移や遠隔転移のない Dukes A、B 症例が多かったことである。その原因は不明であって以下は推測に過ぎないが、ある限られた領域内に複数の clone が混在する Dm はいまだ優勢な clone が選択されていない不安定な状態を示しており、Da のようにある特定の clone が一定の領域で過度の増殖を遂げている安定な状況と比較すると癌の病期としての進行が遅くなるのかも知れない。あるいはまた Dm と Da とでは発癌過程そのものが異なっていて、その差が転移能の差となって現れているのかも知れない。

最後に、Dm においては Dd、Da と比較して有意に第 1 度近親者における癌の家族歴陽性率が高かったが、Dm と癌の家系内集積性との関連についても現時点ではいまだ不明である。大腸腫瘍一般については、大腸腺腫がその大きさを増し、さらに癌となるにつれ癌の家族歴陽性率が増加するという報告がある²⁸⁾。また、遺伝性の大腸癌としては最も頻度が高い HNPCC について、核 DNA 量は Dd が多いと報告されている^{21,22)}。では、Dd で家族歴陽性率が高いかということ、今回の結果では Da と同じ陽性率でしかなかった。このことは HNPCC で高率に認められる MIN に注目した検討において、MIN の有無が癌の家族歴の指標にならなかったという報告²⁹⁾と同様である。肺癌については第 9 番染色体短腕の異常が癌の家系内集積と関連していたという報告があり³⁰⁾、ある特定の核型異常が癌の家族歴に関与している可能性は高い。このことを実証するためには、現在われわれが行っている comparative genomic hybridization を含めて今後も検討を続けていく必要がある。

文 献

- 1) Lanza G, Gafa R, Santini A et al : Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma. *Cancer* 82 : 49 59, 1998
- 2) Zarbo RJ, Nakhleh RE, Brown RD et al : Prognostic significance of DNA ploidy and proliferation in 309 colorectal carcinomas as determined by two-color multiparametric DNA flow cytometry. *Cancer* 79 : 2073 2086, 1997
- 3) Tang R, Ho Y-S, You YT et al : Prognostic evaluation of DNA flow cytometric and histopathologic parameters of colorectal Cancer. *Cancer* 76 : 1724 1730, 1995
- 4) Dean PA, Vernava AM : Flow cytometric analysis of DNA content in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 35 : 95 102, 1992
- 5) Offerhaus GJA, Feyter EPD, Cornelisse CJ et al : The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 102 : 1612 1619, 1992
- 6) Giaretti W, Danova M, Geido E et al : Flow cytometric DNA index in the prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 67 : 1921 1927, 1991
- 7) Changchien CR, Wang JY, Tang R : Pathogenetic implications of DNA nondiploidy in colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 40 : 1244 1247, 1997
- 8) Hiddemann W, Bassewitz DB, Kleinemeier H-J et al : DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 58 : 258 263, 1986
- 9) 石川 啓, 中越 享, 清水輝久ほか : 核 DNA 量からみた同時性大腸多発癌の臨床的特徴とその発生源について. *日消外会誌* 24 : 2169 2175, 1991
- 10) Ingh HF, Griffioen G, Cornelisse CJ : Flow cytometric detection of aneuploidy in colorectal adenomas. *Cancer Res* 45 : 3392 3397, 1985
- 11) Sciallero S, Bruno S, Vinci AD et al : Flow cytometric DNA ploidy in colorectal adenomas and family history of colorectal cancer. *Cancer* 61 : 114 120, 1988
- 12) Wersto RP, Liblit RL, Deitch D et al : Variability in DNA measurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. *Cancer* 67 : 106 115, 1991
- 13) Fischbach W, Zidianakis Z, Luke G et al : DNA mapping of colorectal neoplasms : A flow cytometric study of DNA abnormalities and proliferation. *Gastroenterology* 105 : 1126 1133, 1993
- 14) Tollenaar RAEM, Bonsing BA, Dijkshoorn NJK et al : Evidence of clonal divergence in colorectal carcinoma. *Cancer* 79 : 1304 1314, 1997
- 15) Vasen HFA, Mecklin JP, Meera KP et al : The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34 : 424 425, 1991
- 16) Tagawa Y, Sawai T, Nakagoe T, et al : Numerical aberrations of chromosomes 11 and 17 in colorectal adenocarcinomas. *Surg Today* 26 : 869 874, 1996
- 17) Sawai T, Sasano O, Tsuji T et al : Chromosome instability evaluated by fluorescence in situ hybridization in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Gastroenterol* 33 : 495 499, 1998
- 18) 国友一史, 古味信彦, 古河麗月ほか : 遺伝性大腸癌 (HNPCC). *臨科学* 28 : 1277 1281, 1992
- 19) Tsuji T : Relationship between DNA heterogeneity and genetic alterations in colorectal carcinomas. *Cytometry Res* 7 : 25 33, 1997
- 20) 菅井 有, 佐々木功典, 高山和夫ほか : 大腸癌における DNA ploidy heterogeneity の検討. *Cytometry Res* 1 : 147 152, 1991
- 21) Kouri M, Laasonen A, Mecklin J et al : Diploid predominance in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma evaluated by flow cytometry. *Cancer* 65 : 1825 1829, 1990
- 22) Losi L, Fante R, Gregorio CD et al : Biologic characterization of hereditary nonpolyposis colorectal cancer : Nuclear ploidy, AgNOR count, microvessel distribution, oncogene expression, and grade-related parameters. *Am J Clin Pathol* 103 : 265 270, 1995
- 23) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D : Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260 : 816 819, 1993
- 24) Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al : Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 53 : 5853 5855, 1993
- 25) Lengaer C, Kinzler KW, Vogelstein B : Genetic instability in colortal cancers. *Nature* 386 : 623 627, 1997
- 26) Watatani M, Yoshida T, Kuroda K et al : Allelic loss of chromosome 17p, mutation of the p53 gene, and microsatellite instability in right-and left-sided colorectal cancer. *Cancer* 77 : 1688 1693, 1996
- 27) Bell SM, Scott N, Cross D et al : Prognostic value of p53 overexpression and c-ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroentology* 104 : 57 64, 1993
- 28) Boutron M-C, Faivre J, Quipourt V et al : Family

history of colorectal tumours and implications for the adenoma-carcinoma sequence : a case control study. *Gut* 37 : 830-834, 1995

29) Samowitz WS, Slattery ML, Kerber RA : Microsatellite instability in human colonic cancer is not a useful clinical indicator of familial colorectal can-

cer. *Gastroenterology* 109 : 1765-1771, 1995

30) Wu X, Dave BJ, Jiang H et al : Lung carcinoma patients with a family history of cancer and lymphocyte primary chromosome 9 aberrations. *Cancer* 79 : 1527-1532, 1997

Left-Sided Predominance and Family History of Malignancy in Colorectal Cancer with DNA Multiploidy

Terumitsu Sawai, Takashi Tsuju, Atsushi Nanashima, Masaaki Jibiki,
Hiroyuki Yamaguchi, Tohru Yasutake, Toru Nakagoe,
Hiroyoshi Ayabe and Yutaka Tagawa*

First Department of Surgery, Nagasaki University School of Medicine
*The School of Allied Medical Sciences, University of Nagasaki

The purpose of this study was to evaluate the relationship between DNA multiploidy and tumor characteristics of colorectal cancer. Flow cytometric quantification of nuclear DNA content was performed on freshly frozen tissue from 245 patients who underwent surgical resection from 1990 to 1996, at First Department of Surgery, Nagasaki University School of Medicine. The cases were classified into three groups according to DNA ploidy pattern as follows : 1) Dd group, 78 cases (31.8%) with DNA diploidy ; 2) Dm group, 36 cases (14.7%) with DNA multiploidy ; 3) Da group, 131 cases (53.5%) with DNA aneuploidy except for DNA multiploidy. The Dm group was associated with left colon (compared with Dd group, $p=0.0069$), absence of metastasis (compared with Da group, $p=0.0095$), and positive family history of extracolonic malignancy (compared with Dd and Da groups, $p=0.031$ and $p=0.044$, respectively). Of the 245 patients, 71 cases were randomly examined by fluorescence in situ hybridization for detection of numerical aberration of chromosome 17. The frequency of chromosomal aberration was lower in the Dm group than in the Da group ($p=0.0068$).

Reprint requests : Terumitsu Sawai First Department of Surgery, Nagasaki University School of Medicine
1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, 852-8501 JAPAN
