

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590361  
 研究課題名（和文） 前立腺癌組織の三次元解析による腫瘍分布の検索と腫瘍発生・進展に関する研究  
 研究課題名（英文） Study on tumor location and progression of prostate cancer by three-dimensional analysis  
 研究代表者  
 石田英和 (ISHIDA EIWA)  
 奈良県立医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：1032967

## 研究成果の概要：

前立腺癌は組織内に様々の形態の腫瘍が発生したり、多発性に生ずることが多い。三次元構築ソフトウェアによって腫瘍間の連続性・非連続性を検討した上で、この差異が遺伝子的に説明しうるかを DNA マイクロアレイ法で解析したところ、候補遺伝子群が認められた。これらの遺伝子群の中に術前に得られた生検標本から多発性であるか否かを予測できるマーカー遺伝子が存在する可能性があると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：prostate cancer, three-dimensional analysis, DNA microarray, PIN, ductal spreading

## 1. 研究開始当初の背景

現在、前立腺癌の発生・進展にかかわる決定的な遺伝子は解明されていない。我々はヒトの前立腺癌組織を用いて *p16*、*O<sup>6</sup>-MGMT*、*GST-P*、*p14*、*RB1*、*p21*、*p27* といった多数の癌関連遺伝子についてのメチル化や chromosome 6q の deletion 等の変異を検索してきたが (*Am J Pathol*, 2002, *Jp J Cancer Res*, 2002, *Cancer Ssci*, 2003)、その過程で同一症例における前立腺癌の組

織学的 heterogeneity と遺伝子的 heterogeneity に着目してきた。前立腺癌は臓器内における分布の観点から単発性と多発性にわけられる。多発性はこれまで、膀胱癌や肝癌で化学発癌やウイルス発癌の観点から述べられてきたが、前立腺癌についても全摘標本の詳細な観察により、末梢領域を中心に多発することが報告されてきている。しかし、初期の報告は数 mm 間隔での 2 次元切片を利用したものであり、真に

多発性と判定するためには、より詳細な切片による腫瘍の連続性を考慮した立体的な分布の把握が重要と考えられる。画像診断学的に経直腸的超音波断層法、MRI 等でも立体画像を得ることができるが精度上の限界があり、近年ではコンピューターを用いて、個々の癌の病巣が顕微鏡下でマッピングされた2次元画像から立体画像を再構築することが可能となった。そこで、2次元切片ではおそらく単一と考えられた病巣が実際は多発病巣であったり、多発していると考えられた病巣が一部連続している箇所を選び、これらの腫瘍巣の差異が遺伝子レベルで解析できないか試みた。

## 2. 研究の目的

前立腺癌全摘症例を用いて多数の連続切片を作製し、顕微鏡による観察下で Gleason grade ごとの腫瘍を区別して精密にマッピングした後、デジタル画像をコンピューター処理し、三次元再構築ソフトウェアを用いて腫瘍の立体構築を行い、作製した精密な立体画像に基づいて、マイクロダイセクション法による組織採取を行い、遺伝子変異を再検討し、前立腺癌がクローンの異なる多発性病変からなる場合があるのか、単一の病巣内において遺伝子変異の相違があるかを検討し、臓器内における前立腺癌の発生および進展動態を究明する。

(1) Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)との関係を含めた臓器内における Gleason grade 別の前立腺癌の精密な立体分布を明らかにする。

(2) Gleason grade あるいは分化度に応じた腫瘍の精密な立体分布の形状を明らかにする。

(3) 上記の結果から推定される多発性、あるいは単発性を含む臓器内の前立腺癌の発生・進展動態を明らかにする。

(4) 多発性病変、あるいは単発性病変であるかの二次元のスライドから推定できる病理組織学的な指標を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍の三次元立体構築

9例の前立腺癌全摘症例を使用した。術前化学療法を施行されていない8症例と1例は術前ホルモン療法を施行されていた。10%ホルマリンで24時間固定後、5mmごとの全割ブロックを計5~8個作製し、病理学組織学的な診断を行なった後、各ブロックにつき厚さ4 $\mu$ m毎で連続的に薄切して

いき、得られた切片を80 $\mu$ mごとに保存、約500枚前後の未染スライドを得た。作製された未染スライド中4枚ごと(320 $\mu$ m間隔)にHE染色を施行し、顕微鏡観察下で Gleason grade ごとの腫瘍およびPINの分布を色分けして精密にマッピングした。マッピングされた標本はデジタルカメラで撮影後、臓器内において Gleason grade ごとの腫瘍、PIN、および非腫瘍部の境界が明瞭になるよう画像処理を行い、位置あわせソフトウェア Register2001を用いて、二次元画像の位置あわせを行った。立体化には三次元再構築ソフトウェア 3D-DOCTOR (Able Software Corp., Lexington, USA)を用いた。立体画像の解析には多発性病変、あるいは単発性病変であるかを考慮した臓器内の腫瘍の分布とPINの関係を解析した。

### (2) Loss of heterozygosity (LOH)の解析

Laser Capture Microdissection (LCM) Systems (Arcturus)を用いて、各症例の正常腺管および Gleason grade 別の癌を複数の場所から組織を採取し、DNAを抽出した。各病変のDNAを蛍光色素で標識した15種マイクロサテライトマーカーを用いて6qのLOHの解析を行った。

### (3) DNA マイクロアレイによる解析

三次元立体構築を行った症例のうち、HE標本上で単発の独立した腫瘍であるが、三次元解析により連続性の証明された腫瘍を含む代表的2症例をDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。

採取部位は単発部位と連続性のある腫瘍部の離れた2カ所の計3カ所を組織切片からRNeasy FFPE Kitを用いてtotal RNAを抽出した。しかし、切片からでは十分量のRNAが得られず、標本ブロックから腫瘍部をくり抜き、同様にtotal RNAを抽出した。得られたRNAはホルマリン固定による標本のため、RNA integrity number (RIN)がかなり低く(2.40~2.60)、十分なDNAマイクロアレイは期待できなかったが、biotin labeled aRNAを増幅した後、ハイブリダゼーションを行った。アレイのスキャニングにはDNA MicroArray Scanner (Agilent)を使用した。(ConPath)。

## 4. 研究成果

### (1) 腫瘍の三次元立体構築

前立腺癌の組織多様性と多発性について検討することを目的として前立腺癌の立体構築を解析した。三次元再構築ソフトウェア

を用い、前立腺癌全摘症例を解析した。Gleason grade 別の癌組織の分布を示す立体画像を9症例作製した結果、8例を解析に供した。gradeの高い病巣について、de novoに発生する箇所と、よりgradeの低い領域と連続しており gradeの低い病巣からの progression がうかがえる箇所を選別した。臓器内に多発する各病巣の立体的形状を捉えやすいように、比較的各病巣の広がりが限局している早期の症例を選択したためか、grade別に有意に特徴的な病巣の立体的形状は確認できなかった。その他、二次元・三次元下でともに多発していることが確認された病巣以外に、二次元切片では連続性と考えられた病巣が実際には単発性の多発病巣であったり、多発していると考えられた病巣が一部連続していた箇所を新たに確認した。特に二次元切片では連続性と考えられた病巣が実際は単発性の多発病巣であった領域については、多数の癌病巣間で核配列の乱れを伴った不規則に拡張するPIN様の腺管の介在が目立つ症例を認めた。

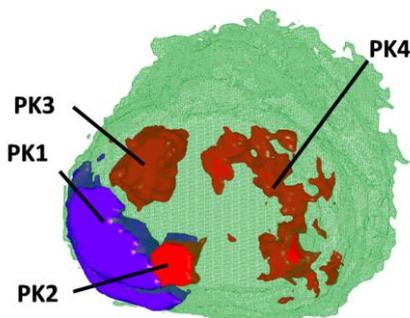
以上のように、腫瘍の増殖パターンからみると大きく2つに分類された。1つは「massive pattern」で大きな塊状のPINの介在しないタイプと「fine branched pattern」として不規則に枝分かれして、その間あるいは周辺にPINが介在するタイプである。前者はGleason grade 4に多く、後者はGleason grade 3の腫瘍にみられた。

### (2) Loss of heterozygosity (LOH) の解析

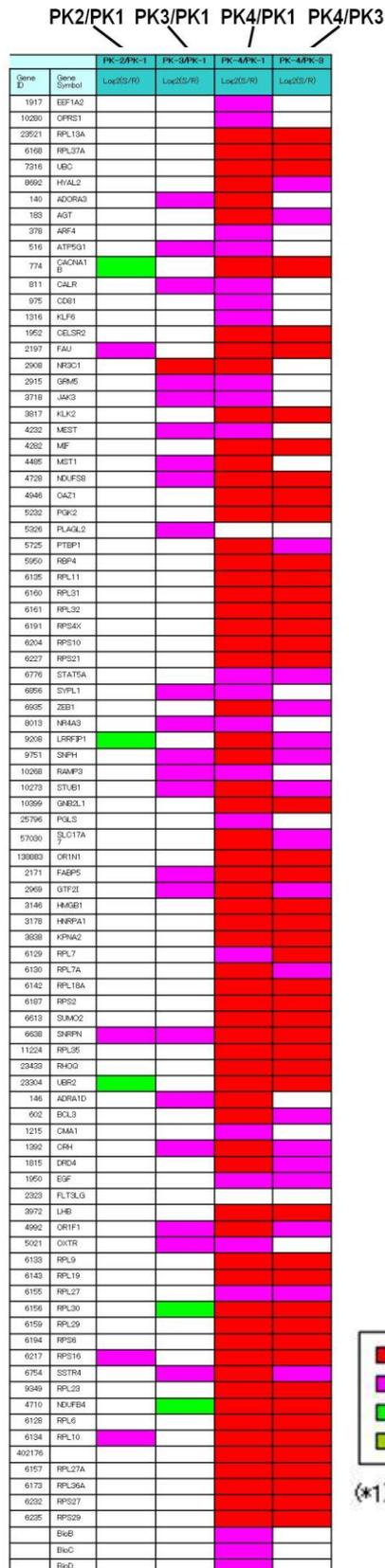
組織切片よりマイクロダイゼクションで抽出した単発性病変と連続性病変の染色体6q LOHについて、15種のマイクロサテライトマーカーを用いて検索した。少なくとも1つのマーカーにLOHを示した症例は9例中8例であったが、各症例に共通で見出されるLOHはなく、6q15-16.3 (D6S1631, D6S1056)と6q16-21 (D6S424, D6S283)の領域のLOHが比較的頻度が高かった。しかし、6qLOHにおいては、単発と連続性病変を識別しうる有意の領域は見出されなかった。

### (3) DNA マイクロアレイによる解析

代表的な2症例を用いて、標本ブロックから単発腫瘍巣の1ヶ所と連続性病変の異なる部位である2ヶ所を採取して total RNA を抽出した後、DNA マイクロアレイ法により遺伝子変異を網羅的に解析した。



解析した遺伝子群はホルマリン固定後の標本を用いたため、凍結標本から得られる情報よりはるかに減少していたものの、連続性病変の異なる2ヶ所における遺伝子変異は共通しているものが多く、単発性病変とは変異パターンが異なっていた。



以上のように、前立腺癌においては単発の独立腫瘍巣は遺伝子レベルの変異においても独立しており、多発性腫瘍は遺伝子的に多発性に生じていると考えられる。差異のある遺伝子群は 87 種あり、発癌に関わるものは、71 遺伝子あり、免疫組織学的に抗体が利用できる遺伝子は 5 種であった。今後、これらの遺伝子が単発、多発に関わるか否かの解析を行ってゆく。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Ishida, E., Nakamura, M., Shimada, K., Higuchi, T., Takatsu, K., Yane, K., Konishi, N., DNA hypermethylation status of multiple genes in papillary thyroid carcinomas, *Pathobiology*, Vol. 74:344-352, 2007, 査読有
2. Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Higuchi, T., Tanaka, M., Ota, I., Konishi, N., c-Jun NH2 terminal kinase activation and decreased expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 play important roles in invasion and angiogenesis of urothelial carcinomas, *Am J Pathol*, Vol. 171(3): 1003-1012, 2007, 査読有
3. Uno, K., Konishi, M., Yoshimoto, E., Kasahara, K., Mori, K., Maeda, K., Ishida, E., Konishi, N., Murakawa, K., Mikasa, K., Fatal cytomegalovirus-associated adrenal insufficiency in an AIDS patient receiving corticosteroid therapy, *Inern Med*, Vol. 46(9): 617-620, 2007, 査読有
4. Nakamura, M., Shimada, K., Ishida, E., Higuchi, T., Nakase, H., Sakaki, T., Konishi, N., Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors, *Neuro-Oncol*, Vol. 9(2): 113-123, 2007, 査読有
5. Nakamura, M., Shimada, K., Ishida, E., Nakase, H., Konishi, N., Genetic analysis to complement histopathological diagnosis of brain tumors, *Histol Histopathol*, Vol. 22: 327-335, 2007, 査読有
6. Higuchi, T., Nakamura, M., Shimada, K., Ishida, E., Hirao, K., Konishi, N., HRK inactivation associated with

promoter methylation and LOH in prostate cancer, *Prostate*, Vol. 68

(1): 105-113, 2008, 査読有

7. Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Higuchi, T., Yamamoto, H., Tsujikawa, K., Konishi, N., Prostate cancer antigen-1 contributes to cell survival and invasion though discoidin receptor 1 in human prostate cancer, *Cancer Sci*, Vol. 99: 39-45, 2008, 査読有
8. Konishi, N., Shimada, K., Nakamura, M., Ishida, E., Ota, I., Tanaka, N., Fujimoto, K., Function of JunB in transient amplifying cell senescence and progression of human prostate cancer, *Clin Cancer Res*, Vol. 14(14): 4408-4416, 2008, 査読有
9. Ishida, E., Nakamura, M., Shimada, K., Tasaki, M., Konishi, N., Immunohistochemical analysis of neuroendocrine differentiation in prostate cancer, *Pathobiology*, Vol. 76:30-38, 2009, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 石田英和、中村光利、島田啓司、樋口智紀、小西 登、前立腺癌 Gleason grade における分子マーカーの検討、第18回前立腺がんワークショップ、2007年9月28日、東京
2. 石田英和、中村光利、島田啓司、樋口智紀、小西 登、前立腺癌における神経内分泌分化の検討、第66回 日本癌学会総会、2007年10月3日、横浜
3. 島田啓司、中村光利、石田英和、樋口智紀、小西 登、前立腺progenitor cellの生物学的特性と病理組織学的意義について、第97回日本病理学会総会、2008年5月15日、金沢
4. 石田英和、中村光利、島田啓司、樋口智紀、小西 登、前立腺癌 Gleason grade における分子マーカーの検討、第97回日本病理学会総会、2008年5月16日、金沢
5. 樋口智紀、島田啓司、石田英和、中村光利、小西 登、前立腺癌新規遺伝子PCA-1の機能解析、第97回日本病理学会総会、2008年5月16日、金沢
6. Ishida, E., Nakamura, M., Shimada, K., Tasaki, M., Konishi, N., DNA microarray analysis of multicentric prostate cancer based on the computer-assisted three-dimensional

model、第67回日本癌学会総会、2008年  
10月29日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田英和 (ISHIDA EIWA)  
奈良県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：1032967

(2) 研究分担者

小西 登 (KONISHI NOBORU)  
奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20145832