

氏 名	お 織 だ まさし 田 雅
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3100 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Quantitative analysis of topoisomerase II $\alpha$ to rapidly evaluate cell proliferation in brain tumors. (脳腫瘍における細胞分裂能を迅速に評価するための topoisomerase II $\alpha$ の定量分析の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 真 鍋 俊 明 教 授 野 田 亮 教 授 武 藤 誠

### 論 文 内 容 の 要 旨

腫瘍病理学において、特に悪性度を知るために、細胞増殖能を評価することは、臨床的に重要である。なぜなら細胞増殖能はその予後と密接な関係があることが知られているからである。最近では、免疫組織学的細胞分裂能のマーカーとして PCNA, MIB-1 さらには topoisomerase II $\alpha$  (topo II $\alpha$ ) が用いられるようになった。これらのマーカーを用いた免疫染色による Labeling Index (LI) は様々な脳腫瘍においてその組織学的分類と予後とに関連しているとの報告がある。

しかし、免疫染色による判定は短時間で行うことは不可能であり、また観測者の主観が大いに加わるため、施設間での比較に差が生じる場合があることも事実である。そこで客観的に定量を行うために real-time reverse transcription-PCR をもちいて、腫瘍細胞内で発現している mRNA の定量を行うことを検討した。MIB-1 を用いた LI が最も多く使用されているが、その塩基配列が不明であるため、MIB-1 の LI と相関関係があり、配列が知られている topoisomerase II $\alpha$  をマーカーとして検討した。

Topoisomerase II は、細胞周期での DNA の様々な変化に用いられる。これには2つの isoform, topoisomerase II $\alpha$  (topo II $\alpha$ ) と II $\beta$  (topo II $\beta$ ) が存在しており、Topo II $\alpha$  は、有糸分裂の染色体凝縮と分離で役割を果たす。さらに Topo II $\alpha$  の蛋白発現は、S 相後期で増加し、G2/M 期に最高値となり、有糸分裂の後、急速に減少する。一方 Topo II $\beta$  表現は、細胞周期に依存しない。Goswami らによると、topo II $\alpha$  の mRNA の量は細胞周期依存的にそのタンパク発現の量と平行して変化すると報告されている。

real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) は様々な組織において客観的に目的の mRNA の定量に用いられている。そして、その作業は2, 3時間を費やすだけで行われることができる。今回、我々は real-time RT-PCR を用いて、topo II $\alpha$  mRNA の定量を迅速に行い、28例の脳腫瘍において topo II $\alpha$  の mRNA レベルと MIB-1 の LI 間の相互関係を分析した。その結果、real-time RT-PCR を用いた topo II $\alpha$  mRNA の定量は MIB-1 の LI と有意に正の関係を示した ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.9077$ )。

一方で神経膠腫について、特に低分化型の神経膠腫では MIB-1 の LI は予後予想を反映しないことが多々ある。つまり低分化型の神経膠腫の一部が、早期に悪性転化することがある。今回の研究では diffuse astrocytoma が3例、anaplastic astrocytoma が2例しか含まれていないため、topo II $\alpha$  の mRNA の発現レベルが組織学的悪性度または予後予想と関連するかどうかについては不明である。しかし topo II $\alpha$  の mRNA の発現レベルの方がタンパク発現より鋭敏に反映されることが in vitro で示すことができた。これは細胞増殖能においてさらに鋭敏に反映している可能性がある。これらについては特に神経膠腫において症例数を増やして検討する必要がある。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

腫瘍病理学において、特に悪性度を知るために、細胞増殖能を評価することは、臨床的に重要である。なぜなら細胞増殖

能はその予後と密接な関係があることが知られているからである。しかし、免疫染色による判定は短時間で行うことは不可能であり、また観測者の主観が大いに加わるため、施設間での比較に差が生じる場合があることも事実である。そこで客観的に定量を行うために real-time reverse transcription-PCR をもちいて、腫瘍細胞内で発現している mRNA の定量を行うことを検討した。免疫組織学的細胞分裂能のマーカーである MIB-1 を用いた免疫染色による Staining Index (SI) が最も多く使用されているが、その塩基配列が不明であるため、MIB-1 の SI と相関関係があり、配列が知られている topoisomerase II $\alpha$  (Topo II $\alpha$ ) をマーカーとして検討した。

Topo II $\alpha$ mRNA の定量を迅速に行い、28例の脳腫瘍において topo II $\alpha$  の mRNA レベルと SI 間の相互関係を分析した。その結果、real-time RT-PCR を用いた topo II $\alpha$ mRNA の定量は topo II $\alpha$  の SI と有意に正の関係を示した ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.9077$ )。

一方で神経膠腫について、特に高分化型の神経膠腫では MIB-1 の SI は予後予想を反映しないことが多々ある。つまり高分化型の神経膠腫の一部が、早期に悪性転化することがある。今回 topo II $\alpha$  の mRNA の発現レベルの方がタンパク発現より鋭敏に反映されることが *in vitro* で示すことができた。これは細胞増殖能においてさらに鋭敏に反映している可能性がある。

以上の研究は脳腫瘍の予後判定の解明に貢献し、脳腫瘍における細胞増殖能の標準化に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年3月5日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。