

論文内容の要旨

申請者氏名 Goranova, Teodora Evgenieva

Multi-stage carcinogenesis is an important concept in cancer biology. Each new stage is triggered by the acquisition of an additional genetic aberration, leading to clonal expansion of the cancer cell. The resulting tumor mass consists of cancer cells with all genetic aberrations, but may include precursor cells at some point of carcinogenesis. In present study we focused on a typical example of the multi-stage tumorigenesis - the model of Vogelstein on chronology of genetic events in colorectal cancer. We aimed to analyze the process of carcinogenesis through study of genetic heterogeneity, a biological feature of human cancer.

Eighty-six bulk colorectal cancer tissue samples and thirteen metastases were examined for mutations in genes *APC*, *CTNNB1*, *K-ras* and *TP53*. Primary cancer tissues with three mutated genes were selected for the next experiments. In order to analyze intratumor heterogeneity of mutations, 50 regions (100x100x40μm) consisting of only tumor cells were microdissected from each sample. Mutational status was determined by SNaPshot assay, a primer extension assay.

In the present study, simultaneous occurrence of mutations in *APC*, *K-ras* and *TP53* genes was found in 13 out of 86 cases (15.1%). In 10 out of 13 tumor tissues analyzed, we verified the existence of intratumor heterogeneity and identified cancer cell subpopulations corresponding to putative precursors: those with mutations in one or two of the three genes. Intratumor heterogeneity in human cancer is probably due to the precursor cancer cells. Also, most samples were likely to be of monoclonal origin, and temporal sequences of the mutations could be deduced from the mutation patterns of putative precursors. The orders of mutation events were various. The results with two tissues accompanying adenoma histology did not contradict the core of the Vogelstein model, i.e., *APC* is the first. The analysis also revealed considerable heterogeneity in allele ratios of one or two of the chromosomes. Comparing primary tumor tissue and its paired metastasis, we found significant similarity in somatic mutation profiles.

To our knowledge, this is the first study of colorectal tumorigenesis, based on three mutated genes, in individual cancer tissues. Our approach is promising to uncover the process of carcinogenesis in other cancers too.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Goranova, Teodora Evgenieva

癌組織は単一の細胞からなりたっていると一般に考えられているが、ほとんどの癌組織は性質の異なる多種類の癌細胞から成り立っている。例えば、抗癌剤は最初の間は効果があるが、必ず耐性細胞があらわれ効かなくなる。これは原発巣にすでに少数の耐性細胞が存在し、治療中に増殖するためと考えられている。このように腫瘍内の腫瘍細胞多様性は癌の重要な性質であるのにもかかわらず十分な研究がなされていない。

申請者はこのような背景から、大腸癌について体細胞突然変異すなわち APC, p53, K-ras の腫瘍内多様性を解析した。これまでの腫瘍内多様性の解析は、解析のために採取するサンプル領域が大きく複数の細胞集団を採取している可能性が高い。申請者はこの点を改良し、定量 PCR で測定可能な最小領域を決定した。これは、従来法での 200 分の 1 以下の量であり、遙かに高い精度での腫瘍内多様性の解析が可能になった。又、採取する領域を約 50 力所とし（これも従来法の約 5-10 倍に当たる）検出力を高めた。APC, p53, K-ras の 3 つの遺伝子すべてに体細胞突然変異のある症例について解析を行い、大部分の症例に遺伝的多様性、すなわち 3 つの遺伝子すべてではなく、そのうち 1 個あるいは 2 個にのみ変異のある癌細胞の存在を認めた。

申請者はさらに遺伝的多様性のパターンから変異蓄積の順序を推定できることを見いだした。例えば、APC, p53, k-ras の 3 つの遺伝子に変異があるがん細胞の中に、k-ras, APC に変異のある癌細胞と APC にのみ変異のある癌細胞が混在していれば変異の入った順序は APC → k-ras → p53 である。変異のパターンを調べたところ一つのカスケードに対し矛盾した細胞集団はなく、また LOH 解析から変異獲得後変異遺伝子が欠失した可能性も否定できた。多段階発癌説は発癌過程に関する重要なコンセプトであるが、たとえば、Vogelstein の大腸癌モデルでは APC → k-ras → p53 という順番で変異が起こるとされているが、これはあくまでも“説”である。腺腫と癌の比較や多数の患者のデータをもとにつくられたものであり、一人の患者の癌組織の変異蓄積過程を調べたものではない。申請者の研究は腫瘍内遺伝的多様性の解析から、個々の癌組織の変異蓄積の順序を推定できることを初めて示したものである。

以上のように、本論文は腫瘍内遺伝的多様性を解析する方法論を確立し、その解析により変異獲得の順序を推定し得ることを示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。