

## 招 請 講 演

## 癌細胞の発生とプログレッション

京都府立医科大学病理学教室

教授 藤 田 哲 也

## Genesis, Progression and Prevention of Human Cancers

Setsuya FUJITA

Department of Pathology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

## 結 言

ヒトの癌細胞の動態と癌組織の成長に関する最近の分析的な研究によつて、ヒトの癌腫は平均25年にも及ぶ長い自然史をもつことが明らかにされてきた<sup>3)</sup>。しかもこの2/3以上が潜在的な前臨床期であると推定されている。

この長い潜在的成長の最初の時点で癌はどのような姿で発生し、前臨床期を通じてどのような様相で進行してくるのであろうか。この姿を明らかにするには癌の初発像を求めて、人癌や実験動物癌のできるだけ初期と思われる病変に遡つていくアプローチが正攻法となるだろう。

最近では癌細胞のDNA量を顕微蛍光測定法で定量したり、初期癌を組織細胞化学的な方法で検索することにより発癌のごく初期には癌細胞といえども非癌細胞と同じくdiploid量のDNAをもち、細胞異型も少なく、正常細胞にみられる分化形質を部分的に発現する能力をもっていることが示されるようになってきた。それに対して、進行癌の多くではDNAの量が大幅に変異し、70%以上の症例でaneuploidyになつていこともわかつた。この自然史の途中で、DNA量の分布がどのようになつていのかを調べたデータは<sup>1)</sup>、人癌というものが長い自然史の中で染色体を構成するDNAの複雑な変異を積み重ねることによつて、癌細胞がさまざまなclonal evolutionを遂げつつ進展していくものであることを明らかにした。ただ、DNAの測定結果をみると進行癌の約70ないし80%はDNAの量が1.5倍以上にも増えたaneuploidyを示すが残りの約30ないし20%の症例では顕微蛍光測定によつて、diploidと区別できない癌細胞が発見される。人癌でも、DNAに変化のない進行癌が20ないし30%も存在するのであろうか。それはどうもそうではないらしい。こ

れらの見掛けのdiploid癌細胞で、染色体の分析を行つたMisawa et al.<sup>4)</sup>は、その症例のすべてに例外なく、複数の高度の変化が起こつているのを検出している。多くの染色体に、部分的欠失、転座、monosomy, trisomy, tetrasomyなどが必発しており、これら悪性の高い癌細胞のclonal evolutionが長時間かけて積み重なつてきたDNAの高度のかつ重積する変化によつて実現されてきたものであることを裏書きするデータを示したのである。

## 人癌プログレッションの分子メカニズム

人癌のプログレッションで特に目立つのは、癌細胞のDNA量が癌の進展につれて変化してくることである。実験動物の原発癌では、これが顕著でない。一般に、実験動物の細胞のほうが、ヒトの細胞よりはるかにDNAの質的变化(つまり突然変異)を起こしやすいことが知られている<sup>2)</sup>。にもかかわらず、癌の進展に伴つてヒトの癌細胞は高度の変異を積み重ねるのである。一見diploidのようにみえる場合も、上述したように真の悪性細胞ではほとんど常に複数の染色体変化を伴っている。その変化は1個の細胞の中で10~20程度にも達する。末期の癌細胞にかくも多数個の染色体変化がみられる一つの理由は、人癌の自然史が長期にわたり、その間にDNAの変異を起こす確率が高くなることにあるだろう。しかし、この頻度は人癌の自然史が25年の歳月を経ることを考慮に入れてみても、普通の突然変異率では、とても説明できるようなものではない<sup>2)</sup>。明らかに、ヒトの癌細胞は大掛かりな突然変異を大変起こしやすい体質を獲得しているのである。しかも、ほとんどの人癌が末期には、このような変異を蓄積し、そのほとんどすべての症例において顕微鏡による単純な形態学的観察によつても、その核と細胞質の異形性が証明されるように変化してきている。つま

り、DNA のかなりの変化の集積とそれに基づく表現形質の異常が証明される状態になつており、それが人癌の特性となつているのである。

### 人癌プログレッションの

#### DNA クロスリンケージ仮説

これらの観察事実をうまく説明できるものとして Nakanishi and Fujita によつて<sup>5)</sup>提出された“クロスリンケージ仮説”がある。それは、もともと多倍体細胞形成のメカニズムを説明するものであつた。染色体を構成するDNAの二重鎖の間にクロスリンケージを生じ二重鎖の完全な分離が不可能になつた細胞が、増殖サイクルを回り、S期を経て分裂期へ突入した場合、染色体の不分離を起こし、クロスリンケージがなんらかの機転で解消しないかぎり分裂が流産し多倍体細胞になる、というものである(図1)。

つまり、この仮説に従えば、増殖する細胞から多倍体細胞が生み出されつつある状況が存在する場合には、その背景にDNA二重鎖間にクロスリンケージをもつた母細胞が増殖サイクルを回り、分裂期に突入する、といった現象があると推察できる。このような状況で、多倍体細胞が生み出される最初の分裂では、染色体が極めて不安定な状態に置かれることは間違いない。というのは、もし彼らが多倍体化せず、何らかの方法で分裂を完遂するとすれば、図1にみられるように、シャム兄弟を無理に引き裂くように、一部で繋がった2本のクロマチドが分裂に際して左右に引かれ、物理的な力で引きちぎられるか(a)、2核になるか(b)、あるいはnon-disjunction的にもう1本の染色体(c)あるいはその一部だけが、予定されたとは違う娘細胞の中に取り込まれるという異常分裂を起こす可能性が濃厚に生じるはずだからである。(c)の場合

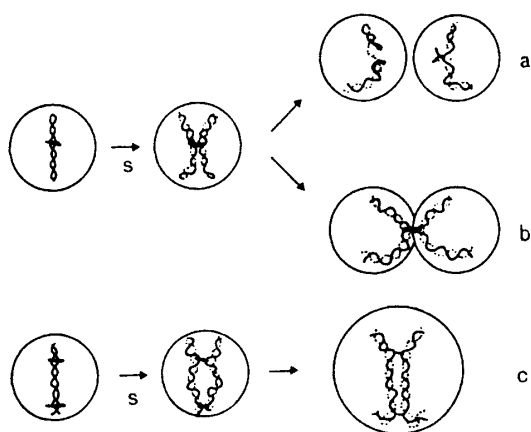


図 1

には、同一染色分体2本が同一細胞の中に入ることになり、いわゆる loss of heterozygosity の状態が生じる。ちぎれた染色体では、その断端における欠失が必然的に起こり、また一旦できた断端は他のDNA断端と非常に結合しやすくなっているから translocation などの染色体異常が当然起こってくるものと考えられる。このような染色体異常は発癌との関連で、最近特に注目を集めている現象である。

### 人癌のDNAレベルにおける

#### クローナル・エボリューションとそのメカニズム

上述したように、人癌の本当の初発像が正常と区別しにくい、極めておとなしい形態を示しているものであると考えると、自然史の経過の間に、多倍体や高度な異型性をもつ細胞が高率に出現するような異常な状況が存在すると思えなければならない。染色体内クロスリンケージの存在はその状況を作り出しうる、と考えられる。クロスリンケージをもつた細胞が分裂すると上述のようにDNAに障害をもつ細胞が高い確率で生じる(図2)。これらは、いずれも局所で生存可能かどうか、成長能力においてより優位に立ちうるかどうかの過酷なテストにかけられる。これに失敗するものは死滅してしまうわけである。

図2の中に selection と書かれているのがそれである。したがって、生存するものは、局所により適応したものに限定されている。

一方、クロスリンケージをもつ細胞の分裂流産によつてできた多倍体細胞や異倍体細胞は、その染色体の

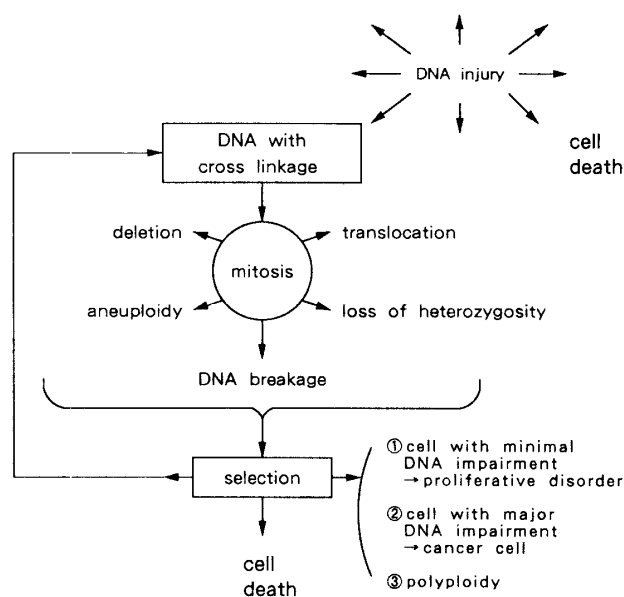


図 2

中にクロスリンケージを保有したままである可能性が高い。したがって、この細胞が生存の可能性と増殖の可能性のテストに生き抜き再び分裂期に突入したときも、図 2 に示すいくつかの帰結のうちの一つが選ばれる確率は非常に高くなる。クロスリンケージから生じる異常細胞発生のリスクは、クロスリンケージが可逆的に解消されないかぎり、それをもつ増殖細胞が死滅し尽くす以外のことで消失することはない。

#### 染色体不安定とディスプラジア

このメカニズムが人癌のプロGRESSIONにおける染色体不安定 (chromosomal instability) の原因となると考えると、人癌では、突然変異率が異常に高い理由がよく説明できる。人癌自然史の約25年の経過のうちに、正常あるいは非癌細胞では考えられないくらい高度の突然変異が癌細胞の中に集積される。そのために、もともと一つのクローンから成立したはずの癌がDNA レベルでみても無数のサブクローンに分かれているのが進行癌である。当然の間には、移行期ともいえる時期があつて、その間に染色体変異が一つ一つ獲得されつつあるプロGRESSIONの段階があると考えられる。かれらは少数ながら多倍体細胞を生産することで、核異型性を表してくる。しかし、かれらはいまだ癌細胞ではない。完成した浸潤・破壊性や転移能をそなえるには到っていないだろうからである。しかし、なによりも重要な点は、かれらが正常細胞とは決定的に異なり、極めて高い確率で癌性細胞を生み出す状態にあることである。この状態こそ、正しい意味で前癌状態あるいは形態的にみてディスプラジアとよばれるべきものであろう。

#### 人癌自然史の理解と癌制圧戦略への寄与

人癌はそのプロGRESSIONの全段階においても、

染色体の異常を蓄積し悪性度を増すと考えられる。環境の中の発癌性因子は、いずれも最終的には染色体に働くものであり、その意味で人癌のプロGRESSIONを促進する物質でもあるといえる。この期間中においても、これらの因子を可能な限り排除することは、癌の進展を抑制する効果もあると考えられる。発癌とプロGRESSIONの分子的な変化は、それほど違わないのである。

今後の基礎的な研究において、癌細胞の特徴を踏まえつつ人癌自然史の実体を正確に把握し、更に微小癌から進行癌のプロGRESSIONの様相を明らかにすることは、初期癌・早期癌のみならず、前癌やディスプラジアの正しい理解を可能とするばかりではなく、人癌の予防や早期診断や適切な治療を有効に行うための必須のステップとなるであろう。その研究がいまや可能になりつつあるといえるのである。

#### 文 献

1. 藤田哲也：核 DNA 量とプロイディパターン。第 86 回日本医学会シンポジウム記録集、『前癌病変』, 67: 80, 1988.
2. 近藤宗平：昭和 61 年度日本遺伝学会木原賞受賞講演。突然変異の機構。遺伝子・進化放射線。Jpn. J. Genet., 64: 137, 1989.
3. Fujita, S.: Biology of early gastric carcinoma. Path. Res. Pract., 163: 297, 1978.
4. Misawa, S., et al.: Chromosome abnormalities of gastric cancer detected in cancerous effusions. Jpn. J. Cancer Res., 81: 148, 1990.
5. Nakanishi, K. and Fujita, S.: Molecular mechanism of binucleate formation and polyploidization of the hepatocyte. Cell Struct. Func., 2: 1, 1980.

### Synopsis

Long-term studies of in vivo kinetics of growth and proliferation of human cancers in vivo have revealed that carcinomas become manifest in patients some 25 years after carcinogenetic process has begun (Fujita '78). During this long period of cancer growth, do cancer cells remain unchanged, in morphology and function? So far, few pathologists have attempted to answer the question.

At late stages of cancer growth, human carcinoma cells show high degree of atypism so that correct diagnoses can always be established by microscopic examination of the atypism. By DNA quantification or karyotype analyses of individual cancer cells, however, we found that incipient cancers show much less DNA abnormalities than the advanced ones.

It is now clear, from molecular studies (Fialkow '76) that, in principle, a human cancer starts from one mutated host cell. Histochemical studies revealed that the newborn cancer cell and their direct progeny, at least during the earliest stage of carcinogenesis, are diploid in DNA content and seem to show very little abnormalities. Obviously during the progression of cancer growth from the single cell to the final stage, gross changes are accumulated in the cancer cell genome so that highly atypical cells are constant final outcome of the human cancer growth in vivo.

We analyzed abnormalities of chromosomal morphology together with DNA contents in advanced human cancer cells and found that, commonly, 10~20 chromosomal changes accumulate in individual cancer cells, thereby marked atypisms are produced in morphology and DNA contents in the cancer cells. Gross mutations in the cancer cell DNA occur very frequently and accumulate in the genome 1 per 2~4 doubling times. This is extremely high rate of mutation that cannot be explained by any theories and observations of genomic mutation in human cells so far known.

To explain this high rate of mutation in cancer cells, we adopt the "cross linkage hypothesis" (Nakanishi and Fujita '80). This is to assume presence of cross linkage between 2 strands in the double helix of DNA. In quiescent state, it does nothing, but when the cell enters into DNA synthesis and mitosis, the 2 daughter chromatids cannot be separated from each other by the presence of the cross linkage, and the aborted mitosis may sometimes produce polyploid cells. If, however, the mitosis is accomplished, forced separation in mitosis may produce breakage, partial loss, translocation, monosomy, trisomy, tetrasomy, and other abnormalities of chromosomes. This "instability of chromosome" should recur every time the cell with the cross linkage enters into DNA synthesis and division, since the abnormality of DNA is replicated and inherited to the daughter cells. From this cross linkage theory, following conclusions were drawn: 1) At an earlier phase of carcinogenesis, there should be a stage in which cancer cells are not fully developed in atypical morphology and malignant function, though they are destined to produce full-blown cancer cells at high probability later in its natural history. They are thought to be high risk cell population and rightly called "pre-cancerous", but cannot be classified either benign or malignant in any deterministic way, because their risk depends on the future phenomena that will be produced by DNA cross linkage and repeated mitoses. Thus the meaning of the pre-cancerous or dysplastic lesions could only be understood by a concept of probability. 2) The pre-cancerous lesions mentioned above are characterized with chromosomal instability so that they can show some degree of cellular atypism. Such state of chromosomal instability tends to produce polyploid cells and show anisomorphosis of nuclei. So far, this kind of change in cell population should have been called "dysplasia". 3) For correct diagnosis of earliest lesions of human cancers, we pathologists should develop new concepts and criteria, because simple projection of those established with full-blown cancer cells should not be applicable straightforward in earlier phases of natural history of human cancers. 4) So far we have believed that the same kind of cancer cells proliferate also in earlier phases of cancer growth. If so, even if we could succeed in early detection, treatment of the cancer may require the same drastic maneuver as we usually apply to the advanced cancers. It is definitely not true. The earlier we detect the cancer, the milder maneuver should be sufficient. 5) During the long course of natural history of human cancers, they progress and accumulate chromosomal abnormalities. Thus the removal of carcinogenic environments should be similarly effective at the time of carcinogenesis and at the period of cancer progression as well. 6) Proper understanding of progression of human cancers in vivo will provide us essential knowledges to manage and prevent human cancer diseases in the most effective way.