




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第534号	氏名	西田陽登
審査委員会委員		主査氏名	藤原 372 年 
		副査氏名	藤本 正志 
		副査氏名	是松 聖子 
<p>論文題目 KIT (CD117) expression in benign and malignant sweat gland tumors (良性および悪性の汗腺系腫瘍における KIT(CD117)の発現)</p>			
<p>論文掲載雑誌名 The American Journal of Dermatopathology</p>			
<p>論文要旨 KITは第4染色体に位置し、膜貫通型チロシンキナーゼ受容体をコードする遺伝子であり、癌原遺伝子とされている。正常では乳腺、唾液腺、皮膚、腸管のCajal細胞、肥満細胞などに発現が確認されているが、今回学位申請者らは、正常皮膚の汗腺におけるKIT蛋白質の発現に着目し、汗腺由来の良性・悪性腫瘍に関して、KIT蛋白質の発現とKIT遺伝子変異の有無について検討を行った。良性腫瘍としてsyringoma 10例、poroma 8例、mixed tumor 20例、spiradenoma 21例、cylindroma 1例、hidradenoma 5例、syringocystadenoma papilliferum 8例、papillary hidradenoma 1例、tubulopapillary hidradenoma 2例、hidrocystoma 7例、悪性腫瘍としてadenoid cystic carcinoma 2例、porocarcinoma 5例、apocrine carcinoma 6例、extramammary Paget's disease 10例、spiradenocarcinoma 1例、syringocystadenocarcinoma papilliferum 1例の計108例を対象とした。方法はホルマリン固定パラフィン包埋切片を賦活液に浸して、95℃にて抗原の賦活化を行い、抗KIT抗体とビオチン二次抗体とを反応させ、DAB発色させた。腫瘍細胞のうち、肥満細胞と同程度に染色される細胞を2+、それ以下の強度を1+と分類し、2+と1+を合わせた割合が全体の細胞の10%以上を占める切片を陽性症例とした。KIT遺伝子変異の検索は、パラフィン切片からDNAを抽出して、PCR法にてhot spotとされるexon 9, 11, 13, 17の部分を増幅し、ポリアクリルアミドゲルを用いてSSCPを検索した。免疫染色の結果、非腫瘍部のエクリン汗腺、アポクリン汗腺の分泌部では、各々80%、54%の陽性所見が得られた。良性腫瘍、悪性腫瘍に関しては、陽性率(陽性症例数/総症例数)は様々であった。即ちsyringoma 0%(0/10)、poroma 25%(2/8)、mixed tumor 40%(8/20)、spiradenoma 43%(9/21)、cylindroma 0%(0/1)、hidradenoma 40%(2/5)、syringocystadenoma papilliferum 0%(0/8)、papillary hidradenoma 100%(1/1)、tubulopapillary hidradenoma 50%(1/2)、hidrocystoma 29%(2/7)、adenoid cystic carcinoma 100%(2/2)、porocarcinoma 20%(1/5)、apocrine carcinoma 33%(2/6)、extramammary Paget's disease 30%(3/10)、spiradenocarcinoma 100%(1/1)、syringocystadenocarcinoma papilliferum 0%(0/1)であった。KITの変異は検討を行ったすべての検体において、認められなかった。良悪の混在したsyringocystadenocarcinoma papilliferumでは良性・悪性成分共に陰性、spiradenocarcinomaでは良性・悪性成分共に陽性となったことから、汗腺系腫瘍の良悪の決定にKIT蛋白質の発現は決定的な役割を演じていないと考えられた。KIT蛋白質の発現は腫瘍によって多寡があるものの、spiradenomaやmixed tumorなどの二層性を呈する腫瘍の内腔側の細胞がKIT陽性であったことは非常に興味深い。</p> <p>本研究は汗腺の幹細胞とKITとの関連性の研究や、腫瘍以外の汗腺疾患の病態研究にも課題を提供すると考えられ、このため審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 (課)・論	第534号	氏名	西田陽登
審査委員会委員		主査氏名	藤原 3924 (藤原)
		副査氏名	鈴木 正志 (鈴木)
		副査氏名	尾形 聖悟 (尾形)
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Abstract では、10 benign and 6 malignant tumors としているが、Materials and Methods 中の記載のように、10 types of benign and 6 types of malignant tumors と記載すべきではないか。またそれぞれ7, 8例となっているが、syringocystadenoma papilliferum 8例、hidrocystoma 7例ではないのか。 2. これまでの報告では、どのような悪性腫瘍にどの程度KITが発現しているのか。臨床経過や予後との関連を報告した論文はあるか。今回は良性腫瘍も対象としているが、これまで良性腫瘍にもKITが発現している報告はあるのか。 3. 正常汗腺におけるKITの役割は何か。その際のKITのリガントは何か。 4. 他の悪性腫瘍におけるKIT遺伝子変異の程度はどの程度か。imatinibの作用機序は、どのようなものか。 5. Proto-oncogene とは何か。CMLではKIT遺伝子が発現しているのか。 6. 学位論文要旨の対象の内訳で良性腫瘍 poroma 8例が抜けているのではないか。 7. 対照として用いた正常組織は対象腫瘍の周辺正常組織ではなく、全く別の検体からのものを用いたのは何故か？ 学位論文要旨の中に「発生母地となった汗腺の元来の形質をそのまま保持している可能性がある」とあるが、それならやはり腫瘍部分と非腫瘍部分を同一の検体で調べるべきではないか。 8. KIT遺伝子変異はhot spotを検索したとのことであるが、全てが細胞増殖に働く変異なのか。 9. Fig.1にはfaintly positive (+/-)が示されていないが、positive (1+)とはどう区別したのか。陽性症例は、2+と1+の細胞を合わせて10%以上の場合としているが、それなら+/-は不要ではないか。 10. 学位論文要旨中の「腫瘍細胞のうち、10%以上の細胞で陽性所見が得られたものを2+、1+に分類した」との記述は、本文の内容と一致していないのではないか。 11. Table 3では2+あるいは1+のどちらかの細胞があれば陽性症例としているようであるが、本文中では陽性症例は、2+と1+の細胞を合わせて10%以上の場合としていることとの整合性はあるのか。 12. KITの染色性について、2+が90%でも、1+が10%でも陽性症例と判断されているが、強染色性の細胞が高頻度に存在する症例が、対象症例の中に存在したか否かの検討はおこなわなかったのか。 13. 筋上皮細胞は陰性とのことであるが、Fig.2では、陽性のように見えるがどうか。 14. 正常のエクリン腺とアポクリン腺で、KITの染色性に差があるが、今回の検討が、起源未同定の汗腺腫瘍の起源同定に役立つのではないか。 15. エクリン汗腺分泌部は、dark cell と clear cell から構成されていると言われているが、そのどちらが、あるいは両方がKIT染色陽性だったのか。eccrine spiradenoma、mixed tumorの内側の細胞が主に染色されているので、clear cellがKIT染色陽性ではないのか。 16. 非腫瘍部の汗腺より腫瘍部の方がKIT陽性率が低い、他の報告ではどうか。 17. 今回の結果はpositiveなものではなかったが、この領域で癌診断や悪性度の指標、あるいは治療のターゲットとなる分子はKIT以外に何か考えられているのか。 18. 汗腺腫瘍について、これまで何がわかり、何がわかっていないのかが、この論文中で明確に記載されていない。それを踏まえた上でこの研究の位置づけを考察すれば、もう少し積極的な意義を導くことができたのではないか。 19. KIT遺伝子変異以外の活性化機序として、どのようなものが示唆されているのか。 20. エクリン汗腺、アポクリン汗腺の幹細胞はどこに存在するのか。KIT染色陽性の細胞が幹細胞に相当する可能性はあるか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 西田 陽登

論 文 題 目

KIT (CD117) expression in benign and malignant sweat gland tumors

(良性および悪性の汗腺系腫瘍における KIT(CD117)の発現)

要 旨

【はじめに】KITは第4染色体に位置し、膜貫通型チロシンキナーゼ受容体をコードする遺伝子であり、癌原遺伝子とされている。正常では乳腺、唾液腺、皮膚、腸管のCajal細胞、肥満細胞などに発現が確認されている。正常皮膚ではメラノサイトの細胞質や汗腺の分泌部に発現している。KIT蛋白の発現は悪性腫瘍でも認められており、GIST、悪性黒色腫、唾液腺の腺様嚢胞癌に認められ、GISTではKIT蛋白を標的としたイマチニブが使用されている。まれに皮膚の悪性黒色腫でもイマチニブの効果が認められたとの報告もある。今回我々は、正常皮膚の汗腺におけるKIT蛋白の発現に着目し、汗腺由来の良性・悪性腫瘍に関して、KIT蛋白の発現とKIT変異の有無について検討を行った。

【材料と方法】対象の選択：大分大学医学部附属病院とその関連施設において診断された108例を対象とした。内訳は良性腫瘍 syringoma 10例, poroma 8例, mixed tumor 20例, spiradenoma 21例, cylindroma 1例, (clear cell) hidradenoma 5例, syringocystadenoma papilliferum 8例, papillary hidradenoma 1例, tubulopapillary hidradenoma 2例, hidrocystoma 7例, 悪性腫瘍 adenoid cystic

carcinoma 2 例, porocarcinoma 5 例, apocrine carcinoma 6 例, extramammary Paget's disease 10 例, spiradenocarcinoma 1 例, syringocystadenocarcinoma papilliferum 1 例であり, ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。それぞれの症例に関して臨床情報(性別・年齢・発生部位)もまとめた。

免疫染色: 通常の診断に用いる方法にて免疫染色を行った。即ち賦活液に浸して 95°Cにて抗原の賦活化を行い, 抗 KIT 抗体と室温で 30 分反応させた。その後ビオチンで標識した 2 次抗体と反応させ, DAB にて発色を行った。肥満細胞と同程度に染色される細胞を 2+, それ以下の染色強度を 1+とし, 2+と 1+を合わせた細胞の全細胞に対する割合が 10%以上占める切片を陽性症例とした。**KIT 変異の検索:** パラフィン切片から DNA 抽出キットを使用して, DNA を抽出した。PCR 法にて hot spot とされている exon 9, 11, 13, 17 の部分を増幅し, ポリアクリルアミドゲルを用いて SSCP を検索 (PCR-SSCP 法) し, 遺伝子変異のスクリーニングを行った。

【結果】免疫染色の結果: 非腫瘍部のエクリン汗腺, アポクリン汗腺の分泌部では, 免疫染色にて各々 80%, 54%の陽性所見が得られた。良性腫瘍, 悪性腫瘍に関して, 陽性率(陽性数/総数)は様々 (syringoma は 0%(0/10), poroma は 25%(2/8), mixed tumor は 40%(8/20), spiradenoma は 43%(9/21), cylindroma は 0%(0/1), hidradenoma は 40%(2/5), syringocystadenoma papilliferum は 0%(0/8), papillary hidradenoma は 100%(1/1), tubulopapillary hidradenoma は 50%(1/2), hidrocystoma は 29%(2/7), adenoid cystic carcinoma は 100%(2/2), porocarcinoma は 20.%(1/5), apocrine carcinoma は 33%(2/6), extramammary Paget's disease は 30%(3/10), spiradenocarcinoma は 100%(1/1), および syringocystadenocarcinoma papilliferum は 0%(0/1)であった。**KIT 変異の検索:** 検討を行ったすべての検体において, KIT の変異は認められなかった。

【考察】 KIT 陽性細胞は 2 層性を呈する腫瘍では内腔側の細胞が陽性となった。良悪の混在した syringocystadenocarcinoma papilliferum では良性成分・悪性成分共に陰性, spiradenocarcinoma では良性成分・悪性成分共に陽性となったことから, 汗腺系腫瘍の発生において KIT 蛋白の発現は関与していない可能性がある。KIT 蛋白の発現は腫瘍によってばらつきがあり, 発生母地となった汗腺の元来の形質をそのまま保持している可能性がある。KIT の発現は免疫染色にて腫瘍間にばらつきがあること, 各組織型においても陽性例と陰性例が混在することから, 診断という観点からは, KIT の免疫染色は有用とは言えない。