

大腸癌発生経路における遺伝子変化
(早期癌の形態分類に基づく検討)

梅谷直亨

①

大腸癌発生経路における遺伝子変化
(早期癌の形態分類に基づく検討)

梅谷直亨

目次

目的	1
対象と方法	5
1. 対象と進行度分類および形態分類	5
2. DNA 抽出	10
3. <i>K-ras</i> codon 12 点突然変異の検出	10
4. <i>APC</i> MCR 変異の検出	13
5. 経過観察症例	19
6. 統計処理	19
結果	22
1. 腫瘍形態と組織型	22
2. 腺腫の形態と腫瘍最大径	22
3. sm 浸潤癌の形態と腫瘍最大径	25
4. <i>K-ras</i> 変異	25
5. <i>APC</i> 変異	30
6. <i>APC</i> と <i>K-ras</i> 変異の関連	30
7. 経過観察症例における形態変化	37
考察	40
1. 形態変化	40
2. 検体の収集と形態分類, 組織型分類	40
3. サイズの違いの影響	46
A) 腺腫の形態と腫瘍最大径	46
B) sm 浸潤癌の形態と腫瘍最大径	46
4. 癌発生経路における遺伝子変異	47

A) <i>K-ras</i> 変異	47
B) <i>APC</i> 変異	49
C) <i>APC</i> , <i>K-ras</i> に相関がない	53
まとめ	55
参考文献	56

目的

大腸癌発生経路において、腺腫から癌が発生するという、adenoma-carcinoma sequence (ACS) の古典的な概念¹²は広く受け入れられており、腺腫は大腸癌の前駆体であると一般に考えられている。古典的 ACS の概念を支持する証拠として、大腸癌と腺腫の合併率が高い、大腸癌と腺腫の分布が類似している、大腸腺腫症の患者は未治療の場合殆ど 40 歳前に大腸癌で死亡する、経過観察中に腺腫が癌になったという臨床的データがある、腺腫内に限局性の carcinoma in situ と呼ぶる変化を認めることがまれではない、という事実が挙げられている³。ここで認識されている癌の前駆体としての腺腫は、polypoid adenoma であり、従って、想定されている癌発生経路は polypoid pathway と表現することができる。そしてその発育経路はある程度臨床病理学的に解明されてきた¹⁴。

ところが、1985 年に大腸表面型腺腫が最初に報告されて以来^{5,6}、特に日本において便潜血の精査目的の大腸内視鏡検査の増加により、多くの表面型腺腫が発見されるようになった⁷⁻¹⁰。そして、通常の polypoid adenoma と比較して癌化率が高率であること、粘膜筋板が薄いことから容易に粘膜下浸潤を起こすであろうと考えられることから、表面型腫瘍は大腸癌発生において臨床的に重要な位置にあると想定されるに至った^{5,8,16-18}。

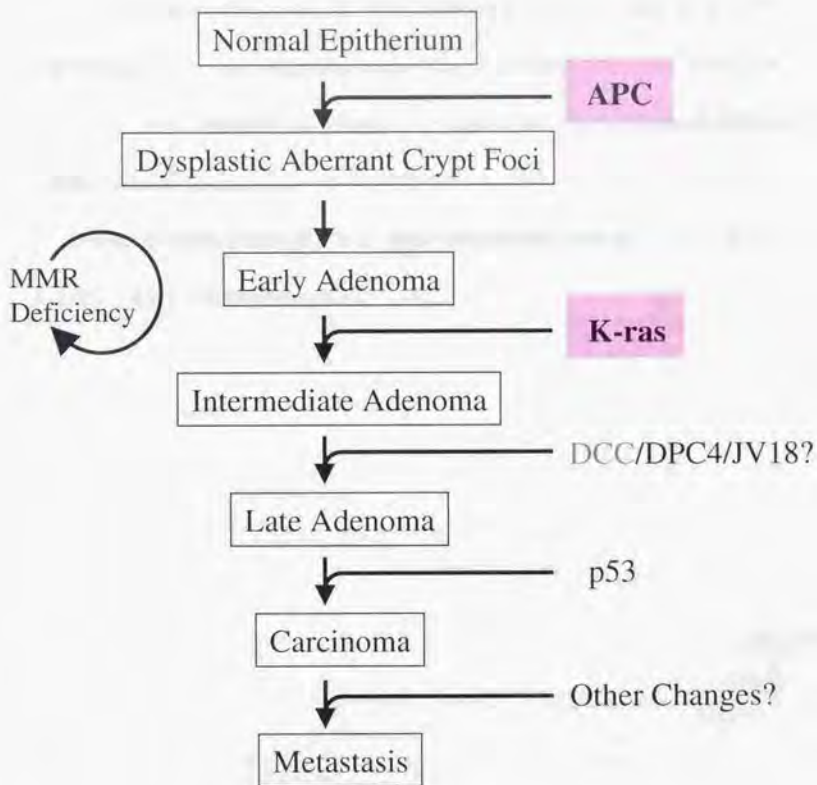
さらに、経過観察例や見逃し症例などを対象としたレントゲン上の週及的検討により、長茎性ポリープから進行癌への発育進展は稀で、小さな無茎性腺腫あるいは短茎性、広基性腺腫からの発育進展が主たるルートである可能性が示されるようになった¹⁹⁻²²。また、表面型腫瘍でも長期経過観察例が得られ¹⁹⁻²²、早期癌までは大きな形態変化を伴わずに発育進展する証拠が示されるようになった。

従って、大腸癌の発症経路として、*polypoid pathway* の他に、大腸粘膜から腺腫を経由せず直接癌が発生するといういわゆる "de novo 発癌" や、表面型腺腫からの発癌、すなわち *non-polypoid pathway* が大腸癌発症経路として存在することが想定されるようになった^{21,23,24}。

大腸癌は遺伝子変化の蓄積によって生じるとわかっており、これまでに *APC*、*K-ras*、*p53*、*DCC*、*MCC*、ミスマッチ修復遺伝子²⁵⁻³³などの多数の遺伝子異常が発見され、検討されている。遺伝子変化のモデルは Vogelstein らによって提唱されている^{28,26,37}。このモデルにおいては、図 1 に示した如く、腺腫の段階までに大きく関与している遺伝子変化は *APC* と *K-ras* と考えられており、*APC* 遺伝子変異は腺腫形成の最初の段階で生じ³⁸、腺腫のサイズと異型度の進行に並行して *K-ras* 遺伝子の点突然変異が生じ、腫瘍の進展の間にいくつものその他の癌抑制遺伝子の変異が蓄積されるとされる。

この遺伝子変化のモデルは欧米で広く認識されている *polypoid pathway* を対象としたものであり、*non-polypoid pathway* の存在については考慮されていない。しかし、表面平坦陥凹型の早期癌においては *K-ras* 変異が認められないという報告がなされ³⁹、*polypoid pathway* とは異なる遺伝子変化を示す発症経路が示唆されるようになった。山形らは、表面型腺腫の *K-ras* 変異率は *polypoid adenoma* よりも有意に低いことを示し⁴⁰、さらに非 *polypoid* 型の増殖を示す粘膜下層(sm)浸潤癌は、*polypoid* 型よりも *K-ras* 変異の率が低いことを示した⁴¹。すなわち、*non-polypoid pathway* は、遺伝子変化において、*polypoid* 型腺腫を経由する *polypoid pathway* と異なっていることを示した。これらの結果は他の研究

図 1. 大腸癌発生における遺伝子変化のモデル



Kinzler KW, Vogelstein B, Cell 1996; 87: 165

者によっても同様の結果が得られており⁴²⁻⁴⁴、実際に non-polypoid pathway が存在することが強く示唆された。

しかし、この non-polypoid pathway における APC 遺伝子の関与は殆ど解っておらず、表面型腺腫においても、その形成段階で APC 遺伝子変異が生じているのかも未だ明らかにされていない。そこで、我々は、過去の症例を詳細に検討し、大腸腫瘍の特に形態と進行度に注目して、non-polypoid pathway における APC 遺伝子変化の関与を解明することとした。また、同時に *K-ras* の異常についても検索を行い、APC との関連性を検討し、大腸癌の non-polypoid pathway における発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。同時に、経過観察症例を対象として、腫瘍の実際の形態変化の程度についても過渡的に検討し、想定した経路を検証した。

対象と方法

1. 対象と進行度分類および形態分類

1988年から1998年に手術的もしくは内視鏡的に切除された63の腺腫と100の浸潤癌を対象とした。東京大学医学部附属病院大腸肛門外科の症例の他に、三楽病院、北里大学病院、福岡大学筑紫病院、岸和田徳州会病院から、一部検体の提供を受けた。家族性大腸腺腫症の患者及びInternational Collaborative Group on HNPCCの診断基準⁴⁵を満たす家族性非ポリポシス大腸癌 (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) の患者の検体は除外した。

検討対象とする腫瘍の選択と、進行度分類および形態分類は、ホルマリン固定されたパラフィン包埋ブロックからの薄切切片のHE染色を元に行った。分類は、筆者及び二人の共同研究者によって遺伝子解析とは独立して行われた。

腺腫は、組織学的に低異型度もしくは中異型度に分類されたものの一部を無作為に選択した。ただし、後述するsuperficial depressed adenomaは、まれな腫瘍であるので、期間中に得られた評価可能な全検体を対象とした。高異型度の腫瘍は、背景を統一するために除外した。

腺腫の形態学的分類は以下の如く定義した。Superficial adenomaは、その病変部の粘膜筋板からの高さが、周囲の正常粘膜の高さの二倍を越えない腫瘍と定義し⁴⁷、それ以上の隆起を伴う隆起型腺腫をpolypoid adenomaと定義した。さらにsuperficial adenomaのうち、50%以上の部分において、その病変部の粘膜筋板からの高さが周囲の正常粘膜の高さを越えない腫瘍 (すなわち、大腸癌取り扱い規約⁴⁶におけるIc, Ic+IIa, IIb) を

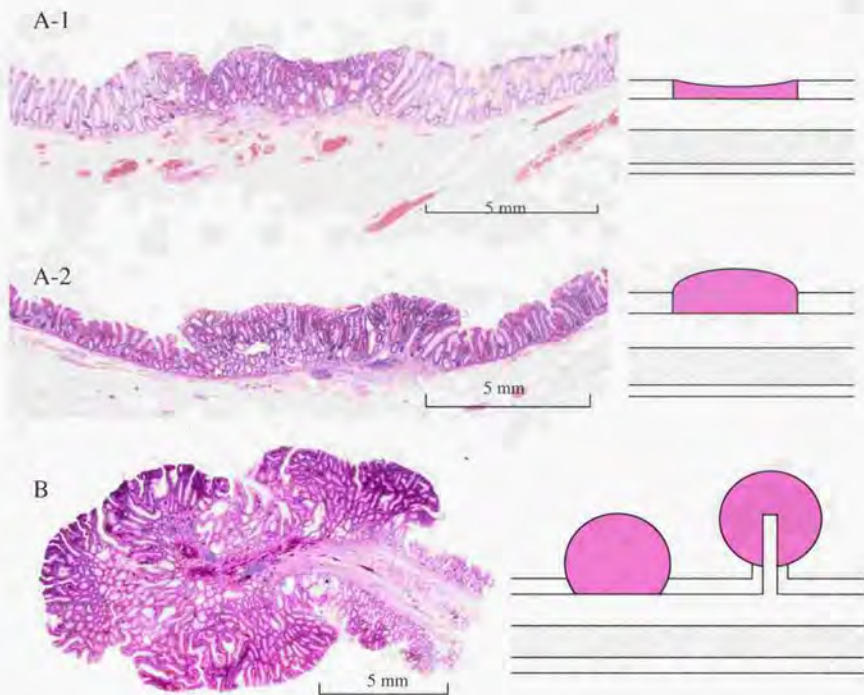
superficial depressed adenoma とし、それ以外を superficial elevated adenoma (すなわち、大腸癌取り扱い規約⁴⁶における IIa, IIa+IIc) と亜分類した。Polypoid adenoma, superficial elevated adenoma, superficial depressed adenoma の各々の腺腫の代表的な組織学的所見を図 2 に示す。これらの形態学的定義に従い、63 の腺腫を、31 の polypoid adenoma と、32 の superficial adenoma に分類し、後者は 17 の superficial elevated adenoma と 15 の superficial depressed adenoma に分類した。

浸潤癌は、その浸潤度に従い、粘膜下層浸潤早期癌 (sm 癌) と、固有筋層浸潤進行癌 (mp 癌) に分類した。

sm 癌は、1991 年から 1995 年の検体を対象とした。sm 癌の形態学的分類は以下の如く定義した。Polypoid carcinoma は周囲の正常粘膜上に腫瘍組織の辺縁が張り出すように成長する腫瘍であるとし、non-polypoid carcinoma は中央に陥凹を持ち、辺縁に腫瘍組織は突出しておらず、周囲を正常粘膜で取り囲まれている腫瘍であるとした。Polypoid carcinoma, non-polypoid carcinoma の各々の代表的な組織学的所見を図 3 に示す。これらの形態学的定義に従い、66 の sm 癌を、47 の polypoid carcinoma と、19 の non-polypoid carcinoma に分類した。はっきりと分類することが出来なかった 6 つの sm 癌は分類不能として今回の研究対象から除外した。sm 癌の一部の検体には、図 4 に示した如く、腺腫成分の併存が認められており、これは腺腫としての段階を経て癌へと進展したことを強く示唆する所見であるため、腺腫成分の併存の有無を検討した。

進行癌においては形態変化が生じやすいと考えられたため、34 の mp 癌は形態による細分類は適用しなかった。

図 2. 腺腫の組織学的形態分類



A: Superficial adenoma

病変部の粘膜筋板からの高さが、周囲の正常粘膜の高さの二倍を越えない腫瘍

A-1: Superficial depressed adenoma

Superficial adenoma のうち、50%以上の部分において、その病変部の粘膜筋板からの高さが、周囲の正常粘膜の高さを越えない腫瘍 (IIc, IIc+IIa, IIb)

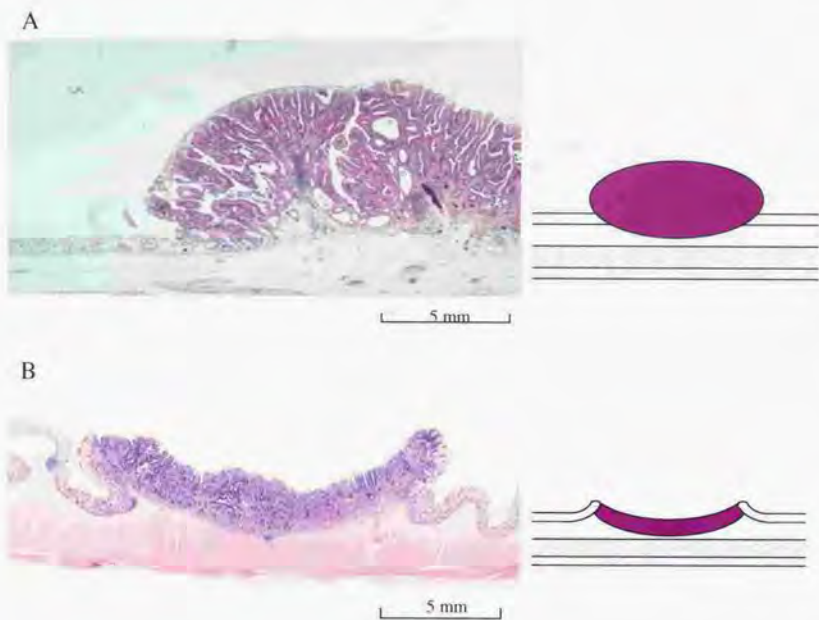
A-2: Superficial elevated adenoma

上記以外の superficial adenoma (IIa, IIa+IIc)

B: Polypoid adenoma

病変部の粘膜筋板からの高さが、周囲の正常粘膜の高さの二倍を越える腫瘍

図 3. 浸潤癌の組織学的形態分類



A: Polypoid carcinoma

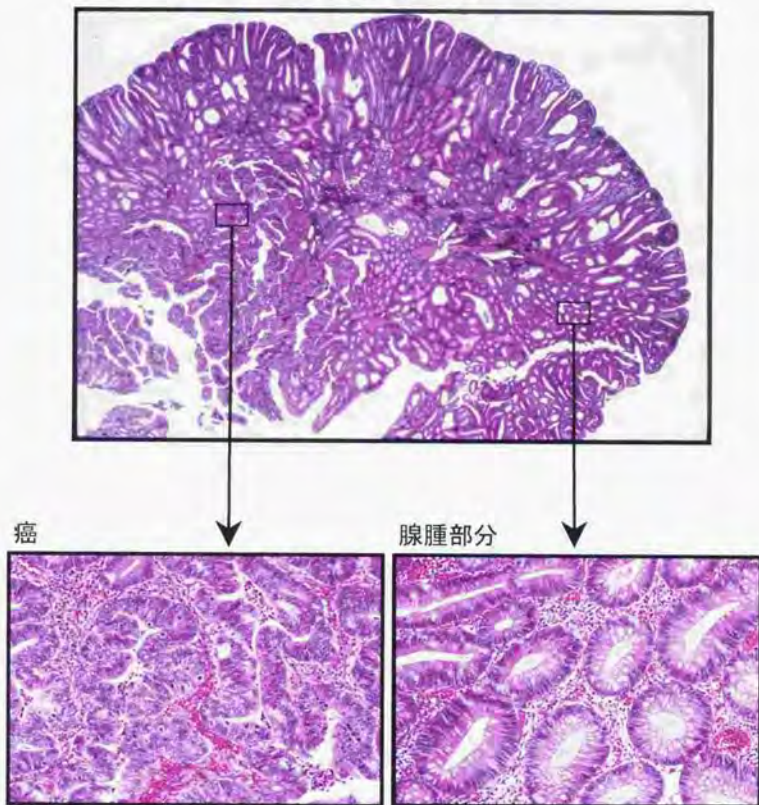
周囲の正常粘膜上に腫瘍組織の辺縁が張り出すように成長する腫瘍

B: Non-polypoid carcinoma

中央に陥凹を持ち、辺縁に腫瘍組織は突出しておらず、周囲を正常粘膜で取り囲まれている腫瘍

図 4. 腺腫成分を伴う sm 浸潤癌

Polypoid Carcinoma (内視鏡切除標本)



腺腫成分を有する内視鏡切除された polypoid carcinoma の一例。粘膜下層浸潤を伴う高分化腺癌であった。

Polypoid carcinoma の約半数は腺腫成分を有しており、腺腫から癌が発生したことを示唆している。Non-polypoid carcinoma にはこのような腺腫成分を有するものは認められなかった。

2. DNA 抽出

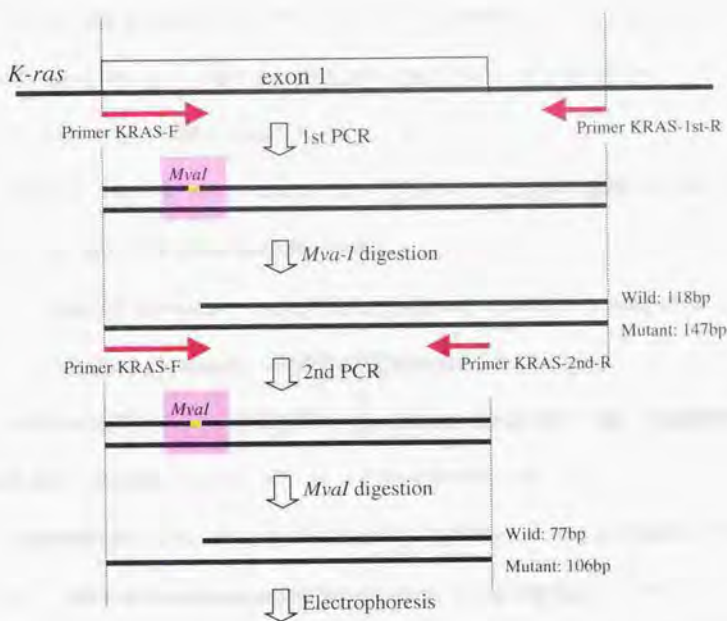
ホルマリン固定されたパラフィン包埋ブロックから、20 μ 厚のパラフィン包埋切片を製作し、隣接した切片の HE 染色を参考にして顕微鏡下に腫瘍部分を正確に切り出す方法 (microdissection method) を用いて、腺腫においては最も異型の強いと思われる部分を、癌においては浸潤部を中心に腫瘍細胞が密に増殖している部分を、約 4 mm²の面積で切り出し、DNA 抽出のための組織を得た。正常細胞の混入はほぼ間質細胞に限られ、殆どの正常上皮細胞は検体からは排除された。得られた組織を脱パラフィン後に sodium dodecyl sulfate (SDS)-proteinase K により消化し、DNA を phenol-chloroform-isoamyl alcohol により抽出し、ethanol 沈殿して精製した³⁹。最終的な DNA 濃度は吸光度の測定により 20 ng/ μ l に調整した。

3. *K-ras* codon 12 点突然変異の検出

K-ras 変異は、散発性大腸癌において 77-82%の変異が集中するとされる^{26,45} codon 12 の点突然変異を検索した。DNA を山形らの用いた方法^{40,41}である two-step PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法^{40,41,29}により増幅、解析した (図 5)。

まず、codon 11 に 1塩基置換を有する変異 primer により 1st PCR を行うことで、wild type の codon 12 に対して、制限酵素 *MvaI* の認識配列を導入した。この際、codon 12 に変異がある allele には、*MvaI* の認識配列は導入されない。1st PCR 産物を *MvaI* で処理したフラグメントを template として、2nd PCR を行うことで変異を含むフラグメントを選択的に増幅し、その産物を更に *MvaI* で処理した後、8% polyacrylamide gel による電

図 5. 2-step PCR-RFLP 法による *K-ras* codon 12 point mutation の検出 (1)



K-ras codon 12 point mutation 検出のための 2-step PCR-RFLP (two-step polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism).

PCR product を *Mva*I で処理することにより, codon 12 に mutation を有しない wild type の DNA fragment のみを切断する. PCR を 2 回行うことで, 高感度に検出できる.

電気泳動における移動度の差で, 変異を検出する.

気泳動を行い変異の有無を判定した。1st PCR においては、20 ng の抽出 DNA、各々0.1 pM の濃度のプライマー、200 mM deoxyribonucleoside triphosphates、0.125 単位 Taq ポリメラーゼ (AmpliTaqGold, Perkin Elmer, Foster City, CA)、10%量の添付バッファー、を含む 5 μ l の反応混合液を作製し、サーマルサイクラー (PCR9600, Perkin Elmer) を用い、[95°C 10 分] (ポリメラーゼ活性化) - [94°C 30 秒; 54°C 2 分; 72°C 1 分] \times 30 サイクル - [72°C 3 分] の条件で DNA を増幅した。

1st PCR に用いたプライマーは以下の通りである。ここで KRAS-F は変異プライマーであり、枠で囲まれた塩基が変異導入部位となる。

KRAS-F (forward): 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGA \square CT-3'

KRAS-1st-R (reverse): 5'-GTCCTGCACCAGTAATATGC-3'

PCR 反応液に、*MvaI* 1 単位を加えて調製し 10 μ l の反応混合液を作製し、制限酵素処理を 37°C で 6 時間行ったのち、72°C 10 分で *MvaI* を不活化した。

2nd PCR においては、20 ng の *MvaI* 処理 PCR 産物 DNA、各々0.1 pM の濃度のプライマー、200 mM deoxyribonucleoside triphosphates、0.125 単位 Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer(R) AmpliTaqGold)、10%量の添付バッファー、を含む 5 μ l の反応混合液を作製し、サーマルサイクラーにて、[95°C 10 分] - [94°C 30 秒; 54°C 2 分; 72°C 1 分] \times 30 サイクル - [72°C 3 分] の条件で DNA を増幅した。

2nd PCR に用いたプライマーは 1st PCR に用いた KRAS-F および、下記の配列のプライマーを用いた。

KRAS-2nd-R (reverse): 5'-CTATTGTTGGATCATATTCG-3'

PCR 反応液に、*Mva*I 1 単位を加えて 10 μ l の反応混合液を作製し、制限酵素処理を 37°C で 12 時間行った。

電気泳動の結果、変異を持たない wild type であれば 77 bp の fragment として泳動され、変異を持つ場合には 106 bp の fragment として泳動される (図 6)。各泳動において、negative control (正常 DNA) と positive control (変異 DNA) を同時に泳動した。

4. APC MCR 変異の検出

APC 遺伝子の変異は、exon 15 に存在し、散発性大腸癌の変異の 70% 程度が集中するとされる⁵⁰⁻⁵² mutation cluster region (MCR) を検索した。まず、polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法⁵³で変異をスクリーニングし、ダイレクトシーケンス法⁵⁴で配列を決定した。

ホルマリン固定されたパラフィン包埋切片より得られる DNA は切断、架橋されており質が悪い⁵⁵ため、長い配列を一度に解析するのは不可能である。このため、MCR 領域全長を含む exon 15 の codon 1251 から 1536 を増幅する一部オーバーラップした 5 組のプライマーを合成し、5 つの領域に分割して変異の検出を行った (図 7)。

各々のプライマーの増幅対象 DNA フラグメントは 194 塩基対から 227 塩基対の長さであった。PCR に用いた 5 組のプライマーは以下の通りである。

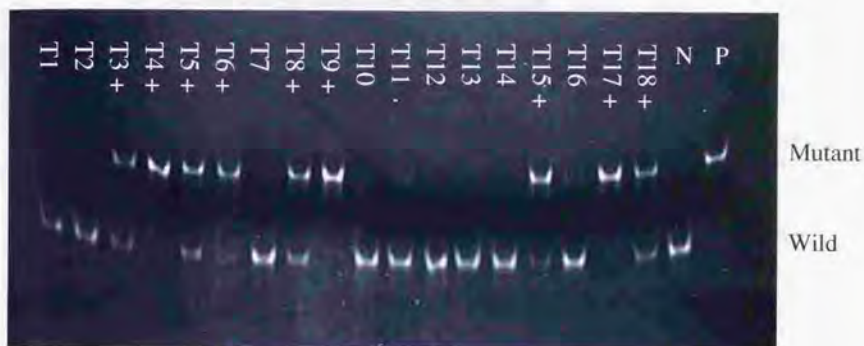
MCR1F (forward): 5'-AAGGCTGCCACTTGCAAAG-3'

MCR1R (reverse): 5'-CTTCAGCTGACCTAGTTCC-3'

MCR2F (forward): 5'-GCTAATACCCTGCAAATAGC-3'

MCR2R (reverse): 5'-GGTGTCTGAGCACCACCTT-3'

図 6. 2-step PCR-RFLP 法による *K-ras* codon 12 point mutation の検出 (2)



Lanes

T1 ~ T18: Tumor samples.

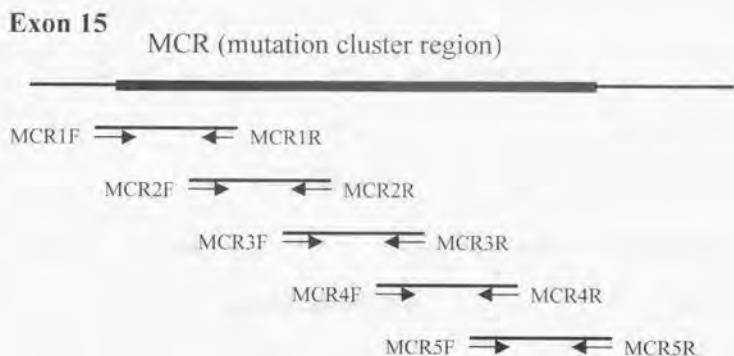
N: Normal control.

P: Positive control.

Mutant の PCR product は *Mva*I で切断さないために、wild type とは異なる位置のバンドに泳動される。

この例では、T3, T4, T5, T6, T8, T9, T15, T17, T18 において codon 12 point mutation が認められる。

図 7. SSCP 法を用いた APC MCR における変異のスクリーニング (1)



MCR 領域全長を含む exon 15 の codon 1251 から 1536 を増幅できる、一部オーバーラップした 5組のプライマーを合成した。まず、全てのフラグメントを PCR で増幅した後、4°Cの一定環境温度で、6%のグリセロールを含む5%のアクリルアミドゲルで、1600ボルト、3時間電気泳動した。異常バンドを示した部分についてはダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

MCR3F (forward): 5'-TTCTTCAGGAGCGAAATCTC-3'

MCR3R (reverse): 5'-GGGCTATCTGGAAGATCAC-3'

MCR4F (forward): 5'-CAGTGGAAATGGTAAAGTGGC-3'

MCR4R (reverse): 5'-AGCATCTGGAAGAACCTGG-3'

MCR5F (forward): 5'-GAGTGGACCTAAGCAAGCT-3'

MCR5R (reverse): 5'-TCCTGAACTGGAGGCATTAT-3'

まず、全てのフラグメントの変異を SSCP にてスクリーニングした。20 ng の抽出 DNA、³²P-ATP でラベルされた各々 0.1 pM の濃度のプライマー、200mM deoxyribonucleoside triphosphates、0.125 単位 Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer(R) AmpliTaqGold)、10% 量の添付バッファー、を含む 5 µl の反応混合液を作製し、サーマルサイクラーにて、[95°C 10 分]・[94°C 30 秒; 55°C 2 分; 72°C 1 分] × 40 サイクル・[72°C 3 分] の条件で DNA を増幅した。PCR 生成物は、6% の glycerol を含む 5% の polyacrylamide gel で、4°C の一定環境温度下で、1600 ボルト、3 時間電気泳動した。ゲルは乾燥した後、X 線フィルムに密着させ、得られた PCR 産物の titer に応じて 3 時間から 48 時間露光した (図 8)。SSCP において異常な泳動パターンを示したフラグメントは、ダイレクトシーケンズを行ってその変異を同定した。

まず、SSCP と同じ条件で変異部分を含むフラグメントを増幅した。1% agarose gel で 100 ボルト、40 分間電気泳動し、紫外線照射下に PCR 生成物の存在するバンドを切り出して粉碎後、DNA 回収用フィルター (SUPREC-01, Takara, Otsu, Japan) を用いて DNA を抽出し、さらに、エタノール沈殿により二重鎖 DNA フラグメントを精製した。続いて、

図 8. SSCP 法を用いた APC MCR における変異のスクリーニング (2)



矢印で示したレーンにおいて, aberrant band が認められるので, ここに泳動された fragment に変異もしくは polymorphism が存在すると考えられる。

シーケンスに用いる一重鎖 DNA を非対称 PCR 法²⁸⁾にて作製した。変異部分を含む二重鎖 DNA フラグメントを template とし, forward 方向は 0.3 pM の濃度の内側プライマー, reverse 方向は 0.006 pM の濃度の内側プライマー, 800 mM deoxyribonucleoside triphosphates, 0.5 単位 Taq ポリメラーゼ (Perkin Elmer(R) AmpliTaqGold), 10%量の添付バッファー, を含む 20 μ l の反応混合液を作製し, サーマルサイクラーにて, [95°C 10 分] - [94°C 30 秒; 52°C 30 秒; 72°C 1 分] \times 35 サイクル - [72°C 3 分] の条件で DNA を増幅した。

用いた 5 組の内側プライマーは以下の通りである。

MCR1intF (forward): 5'-GCCACTTGCAAAGTTTCTTCT-3'

MCR1intR (reverse): 5'-CAGCTGACCTAGTTCCAATC-3'

MCR2intF (forward): 5'-TACCCTGCAAATAGCAGAAATA-3'

MCR2intR (reverse): 5'-TCTGAGCACCACTTTTGGAG-3'

MCR3intF (forward): 5'-AGGAGCGAAATCTCCCTCC-3'

MCR3intR (reverse): 5'-TATCTGGAAGATCACTGGGG-3'

MCR4intF (forward): 5'-GGAATGGTAAGTGGCATTATAA-3'

MCR4intR (reverse): 5'-CTGGAAGAACCTGGACCCT-3'

MCR5intF (forward): 5'-GACCTAAGCAAGCTGCAGTA-3'

MCR5intR (reverse): 5'-GAACTGGAGGCATTATTCTTAA-3'

この PCR product から DNA 回収用フィルター (SUPREC-02, Takara) を用いてプライマーを取り除き, 洗浄して一重鎖 DNA フラグメントを精製した。こうして作製した一重鎖

DNA フラグメントは、³²S-dCTP と Amersham Sequenase Version 2.0 7-deaza-dGTP キット (Amersham Life Science, Cleveland, Ohio) を利用し、ダイレクトシーケンスを行った。40%の尿素を含む6%の polyacrylamide gel で、1200 ボルト、3 時間電気泳動した。ゲルは乾燥した後、X 線フィルムに密着させ、12 時間から 48 時間露光した。検出された全ての変位は、反対方向の解析でも確認し、2 回のシーケンスを行って確認した (図 9-A,B)。

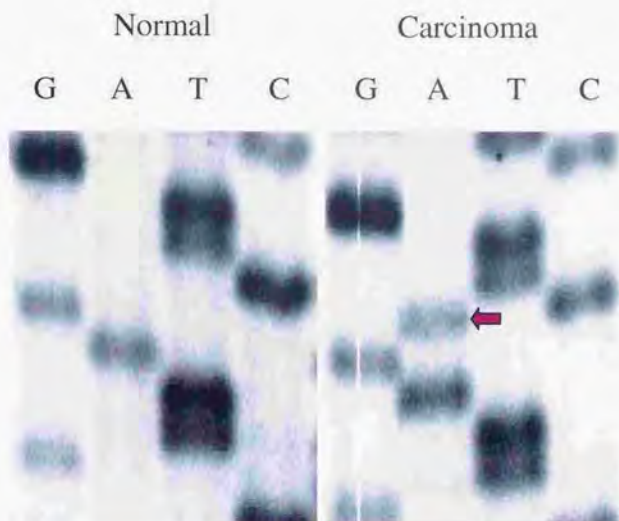
5. 経過観察症例

実際に起こっている形態の変化から、想定した癌発生経路について検証するため、当教室における見逃し症例や、経過観察症例における注腸検査の適時的検討を行った。6 カ月以上の間隔を置いた注腸検査によって経過観察され、最終的に手術となった 11 例の大腸癌の症例を集め、適時的に患者の記録を参照し、その形態変化を検討した。

6. 統計処理

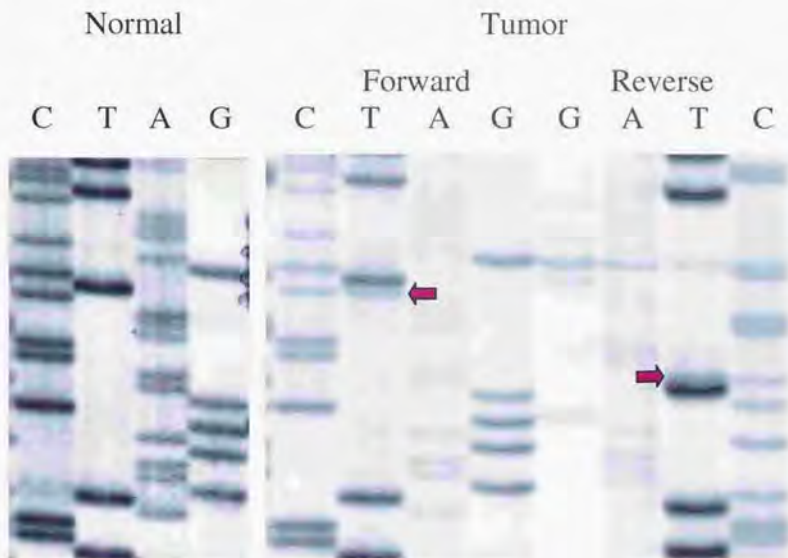
腫瘍形態毎の遺伝子変異の割合に関する統計学的 P 値は Fisher's exact test で計算した。多重比較による影響は Bonferroni の不等式により P 値の統計学的有意性を判定した。腫瘍径の検討は、2 群では Mann-Whitney's U test、3 群では Steel-Dwass test で検討した。

図 9-A. Ddirect sequencing 法を用いた APC MCR における変異の検出 (1)



矢印は codon 1408 における 'A' insertion を示しており、この変異の結果 stop codon を生じて truncated APC protein が産生される。

図 9-B. Direct sequencing 法を用いた APC MCR における変異の検出 (2)



矢印は codon 1453 における 'C' から 'T' への単塩基置換 (Glu to Stop) を示しており、この変異の結果 truncated APC protein が産生される。

Direct sequence は、両方向から行って結果を確認している。

正常のバンドも同時に認められているが、これは変異を持たない正常細胞の混入によると考えられる。

結果

1. 腫瘍形態と組織型

sm 浸潤癌における腫瘍形態の割合は、polypoid carcinoma が 47 検体、non-polypoid carcinoma が 19 検体であり、分類不能が 6 検体存在したことを考慮すると、それぞれ sm 浸潤癌全体の 65%、26%であった。殆どの sm 浸潤癌は高分化腺癌 (52/61; 85%) であり、残りは中分化腺癌であった。各々の組織型の割合は、polypoid carcinoma と non-polypoid carcinoma で大きな差は認められなかった (polypoid: 高分化 87%, 中分化 13%; non-polypoid: 高分化 84%, 中分化 16%)。Polypoid carcinoma のうち 49%が腺腫成分を伴っていたが、non-polypoid carcinoma には腺腫の併存は認められなかった (表 1)。Polypoid carcinoma と non-polypoid carcinoma の間には、腺腫成分の存在の有無において統計学的な有意差が存在した (Fisher's exact test, $P < 0.0001$)。

2. 腺腫の形態と腫瘍最大径

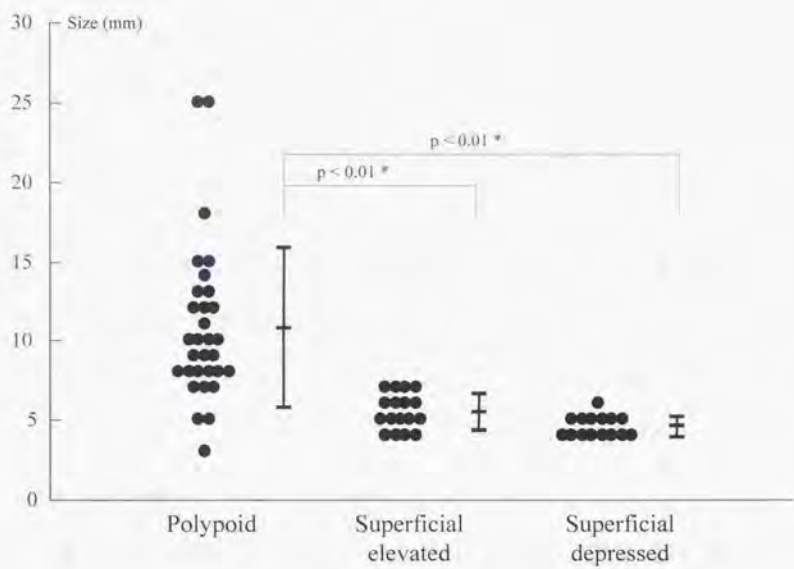
腺腫において、polypoid adenoma, superficial elevated adenoma, superficial depressed adenoma の腫瘍最大径を比較したところ、superficial elevated adenoma, superficial depressed adenoma はともに polypoid adenoma と比較して有意に腫瘍径は小さかった ($P < 0.01$, Steel-Dwass test)(図 10)。Superficial elevated adenoma と superficial depressed adenoma の間には腫瘍径の差は認められなかった。

表1. sm 浸潤癌の形態学的分類と腺腫併存率

形態分類	腫瘍数	腺腫併存率
Polypoid	47	49%]*
Non-polypoid	19	0%]
計	66	35%

* $P < 0.0001$, Fisher's exact test.

図 10. 腺腫の形態と腫瘍最大径



* Steel-Dwass test

Superficial elevated adenoma, Superficial depressed adenoma はどちらも, polypoid adenoma と比較して有意に腫瘍最大径が小さかった.

3. sm 浸潤癌の形態と腫瘍最大径

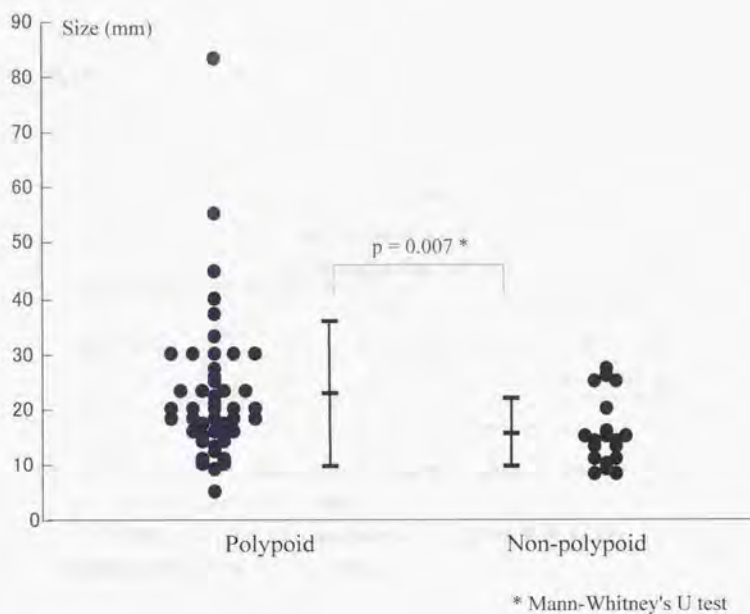
sm 浸潤癌において、polypoid carcinoma, non-polypoid carcinoma の腫瘍最大径を比較したところ、non-polypoid carcinoma は polypoid carcinoma よりも有意に腫瘍径は小さかった ($P = 0.007$, Mann-Whitney's U test) (図 11).

4. *K-ras* 変異

表 2 に示した如く、腺腫においては *K-ras* codon 12 の点突然変異は polypoid adenoma の 9/29 (31%) に認められ、superficial elevated adenoma の 5/17 (29%) に認められたが、superficial depressed adenoma においては認められなかった (0/15, 0%). Superficial depressed adenoma の変異率は polypoid adenoma と比較して有意に低値であった (0% vs. 31%; $P = 0.018$, Fisher's exact test). sm 浸潤癌においては non-polypoid carcinoma の変異率は 2/19 (11%) であり、polypoid carcinoma の変異率 24/43 (56%) よりも有意に低値であった ($P = 0.0008$, Fisher's exact test). Non-polypoid carcinoma の変異率は polypoid adenoma と比較しても有意差はないが低い傾向を認めた (11% vs. 31%). 進行癌の変異率は腺腫、sm 浸潤癌のいずれよりもやや高値を示した。

腺腫において、形態分類別の各群とも、*K-ras* 変異の有無により腫瘍最大径には違いは認められなかった (表 3)。ただし、腫瘍径が 15 mm 以上の腫瘍の殆どが *K-ras* 変異陽性であった。sm 癌においても、形態分類別の各群とも、*K-ras* 変異の有無により腫瘍最大径には違いは認められなかった (表 4)。

図 11. sm 浸潤癌の形態と腫瘍最大径



Polypoid ca. の腫瘍最大径は Non-polypoid ca. の腫瘍最大径よりも大きかった。

表2. 腫瘍の形態学的分類と *K-ras* codon 12 point mutation

深達度		形態分類	<i>K-ras</i> 変異頻度
Adenoma		Polypoid	9/29 (31%)
		Superficial Elevated	5/17 (29%)
		Superficial Depressed	0/15 (0%)
Carcinoma	sm	Polypoid	24/43 (56%)
		Non-polypoid	2/19 (11%)
	mp		18/30 (60%)
計			

* $P = 0.018$, polypoid adenoma vs. superficial depressed adenoma by Fisher's exact test.

† $P = 0.0008$, polypoid sm carcinoma vs. non-polypoid sm carcinoma by Fisher's exact test.

表3. 腺腫の各群における *K-ras* 変異の有無と腫瘍最大径

形態分類	<i>K-ras</i> (-)		<i>K-ras</i> (+)	
	検体数	腫瘍最大径 (mm)	検体数	腫瘍最大径 (mm)
Polypoid	20	10.0 ± 2.7	9	13.2 ± 8.1 *
Superficial Elevated	12	5.4 ± 1.2	5	5.6 ± 1.1 *
Superficial Depressed	15	4.5 ± 0.6	0	-
計	47	7.1 ± 3.1	14	10.5 ± 7.4

* n.s.

表4. sm 浸潤癌の各群における *K-ras* 変異の有無と腫瘍最大径

形態分類	<i>K-ras</i> (-)		<i>K-ras</i> (+)	
	検体数	腫瘍最大径 (mm)	検体数	腫瘍最大径 (mm)
Polypoid	19	21.3 ± 8.1	24	24.1 ± 16.0 *
Non-polypoid	17	15.0 ± 6.1	2	20.0 ± 7.1 *
計	38	18.3 ± 7.8	26	23.8 ± 15.4

* n.s.

5. APC 変異

APC遺伝子のMCR領域における変異は全部で56例の腫瘍において同定されたが、うち51例(91%)は蛋白のtruncationを生じるframe shiftまたはnonsense mutationであり、残りの5例(9%)は単一アミノ酸置換となる一塩基置換であった(表5, 図12)。

表6に示した如く、腺腫においてはAPC変異はpolypoid adenomaの13/30(43%), superficial elevated adenomaの3/16(19%), superficial depressed adenomaの1/15(7%)に認められた。Superficial depressed adenomaにおける変異率はpolypoid adenomaよりも有意に低値を示した(7% vs. 43%; $P=0.016$, Fisher's exact test)。sm 浸潤癌においてはnon-polypoid carcinomaの変異率は6/17(35%)であり、polypoid carcinomaの変異率20/47(43%)と較べてやや低値を示したが近い値であった。進行癌の変異率は14/33(42%)であって、polypoid pathwayを構成するpolypoid adenoma, polypoid carcinoma, とほぼ同程度の変異率を示した。

腺腫において、形態分類別の各群とも、APC変異の有無により腫瘍最大径には違いは認められなかった(表7)。ただし、サイズの大きい腫瘍では変異を伴うものが多い傾向が認められた。sm 癌においても、形態分類別の各群とも、APC変異の有無により腫瘍最大径には違いは認められなかった(表8)。

6. APC と K-ras 変異の関連

表9に示した如く、APC変異とK-ras変異の間には、どの腫瘍の段階においても有意な相関は認められなかった。

表5. MCRを含む exon 15 コドン 1251 から 1536 に検出された APC 変異

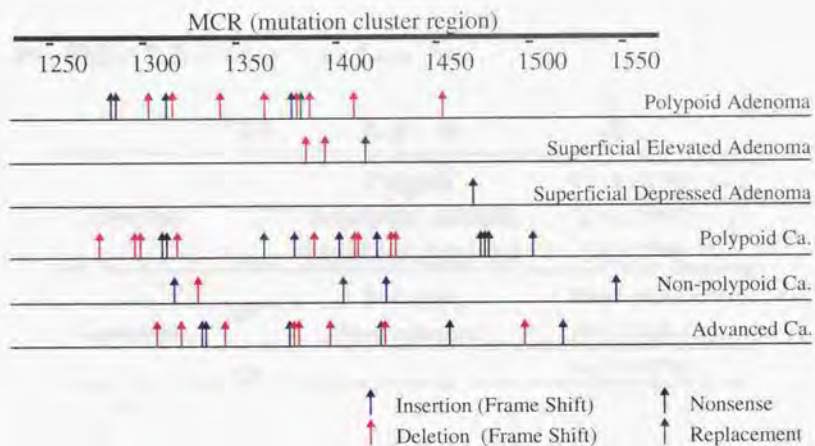
症例	組織型*	径 (mm)	深達度†	形態分類	コドン	変異内容	変異の種類
腺腫							
A2	mild	25		Polypoid	1286	G insertion	frameshift
A7	mild	18		Polypoid	1303	T deletion	frameshift
A9	mild	13		Polypoid	1408	CC deletion	frameshift
A12	mod.	5		Polypoid	1282	C to G (Ser to Stop)	nonsense
A13	mild	7		Polypoid	1340	C deletion	frameshift
A22	mild	7		Polypoid	1384	CA deletion	frameshift
A29	mild	8		Polypoid	1313	C insertion	frameshift
AH2	mild	19		Polypoid	1451	A deletion	frameshift
AH17	mild	12		Polypoid	1376	C deletion	frameshift
AH21	mod.	6		Polypoid	1315	GAAA deletion	frameshift
AH22	mild	6		Polypoid	1378	G insertion	frameshift
AH23	mild	9		Polypoid	1362	T deletion	frameshift
AH28	mild	7		Polypoid	1379	C to A (Pro to Thr)	amino acid change
FA7	mild	2		Superficial Elevated	1384	CA deletion	frameshift
FA10	mild	4		Superficial Elevated	1394	T deletion	frameshift
FA18	mild to mod.	5		Superficial Elevated	1414	G to A (Gly to Gln)	amino acid change
FA15	mild	4		Superficial Depressed	1464	G insertion	frameshift
浸潤癌							
SO4	well	14	sm	Polypoid	1417	A insertion	frameshift
SO6	well	20	sm	Polypoid	1359	A to T (Glu to Val)	amino acid change
SO8	well	5	sm	Polypoid	1415	A insertion	frameshift
SO17	well	17	sm	Polypoid	1406	A insertion	frameshift
SR4	well	20	sm	Polypoid	1497	T insertion	frameshift
SR7	well	9	sm	Polypoid	1470	G to T (Glu to Stop)	nonsense
SR9	well	13	sm	Polypoid	1470	G to T (Glu to Stop)	nonsense
SR13	well	20	sm	Polypoid	1309	C to T (Gln to Stop)	nonsense
SR17	well	83	sm	Polypoid	1470	G to T (Glu to Stop)	nonsense
SE2	well	13	sm	Polypoid	1384	G deletion	frameshift
SE6	well	12	sm	Polypoid	1373	T insertion	frameshift
SE8	well	15	sm	Polypoid	1407	T deletion	frameshift
SE10	well	9	sm	Polypoid	1275	TA deletion	frameshift
SE11	well	8	sm	Polypoid	1397	A insertion	frameshift
SE15	well	5	sm	Polypoid	1295	A deletion	frameshift
ST11	well	10	sm	Polypoid	1317	TGGAA deletion	frameshift
ST16	well	30	sm	Polypoid	1424	AA deletion	frameshift
ST22	well	30	sm	Polypoid	1309	C to T (Gln to Stop)	nonsense
ST34	well	12	sm	Polypoid	1427	A deletion	frameshift
ST35	mod.	18	sm	Polypoid	1297	GCAGAA deletion	frameshift
SR12	well	3	sm	Non-polypoid	1327	CGAAG deletion	frameshift
SO43	well	7	sm	Non-polypoid	1422	T insertion	frameshift
SO5	well	14	sm	Non-polypoid	1542	G insertion	frameshift
SE9	well	9	sm	Non-polypoid	1399	T to C (Leu to Pro)	amino acid change
ST5	well	20	sm	Non-polypoid	1314	C insertion	frameshift
P1	well	27	mp		1453	C to T (Glu to Stop)	nonsense
P8	mod.	45	mp		1515	T insertion	frameshift
P9	mod.	24	mp		1416	G to A (Glu to Lys)	amino acid change
P11	well	30	mp		1374	A insertion	frameshift
P12	muc	17	mp		1329	A insertion	frameshift
P13	por.	50	mp		1420	A deletion	frameshift
P15	well	24	mp		1375	C deletion	frameshift
P17	well	45	mp		1395	T deletion	frameshift
P18	well	32	mp		1318	GAACT deletion	frameshift
P19	well	43	mp		1307	C deletion	frameshift
P20	well	23	mp		1328	G insertion	frameshift
P21	well	18	mp		1385	TA deletion	frameshift
P44	well	34	mp		1340	CC deletion	frameshift
P47	well	21	mp		1493	TTTA deletion	frameshift

* 腺腫, mild: mild atypia; mod.: moderate atypia.

浸潤癌: well: well differentiated adenocarcinoma; mod.: moderately differentiated adenocarcinoma; por.: poorly differentiated adenocarcinoma; muc: mucinous adenocarcinoma

† sm: 粘膜下層浸潤早期癌; mp: 固有筋層浸潤進行癌

図 12. APC MCR において検出された変異とその位置の分布



検出された変異は、形態分類による特徴は認められず、明らかな差はなかった。

表6. 腫瘍の形態学的分類と APC mutation

	深達度	形態分類	APC *
Adenoma		Polypoid	13/30 (43%)
		Superficial elevated	3/16 (19%)
		Superficial depressed	1/15 (7%)
Carcinoma	sm	Polypoid	20/47 (43%)
		Non-polypoid	6/17 (35%)
	mp		14/33 (42%)
計			

* Mutation cluster region における APC mutation の頻度.

† P = 0.016, polypoid adenoma vs. superficial depressed adenoma by Fisher's exact test.

表7. 腺腫の各群における APC 変異の有無と腫瘍最大径

形態分類	APC (-)		APC (+)	
	検体数	腫瘍最大径 (mm)	検体数	腫瘍最大径 (mm)
Polypoid	17	10.1 ± 3.3	13	10.5 ± 5.5 *
Superficial Elevated	13	5.5 ± 1.1	3	6.0 ± 1.0 *
Superficial Depressed	14	4.6 ± 0.7	1	4.0
計	44	7.0 ± 3.3	17	9.4 ± 5.3

* n.s.

表8. sm 浸潤癌の各群における APC 変異の有無と腫瘍最大径

形態分類	APC (-)		APC (+)	
	検体 数	腫瘍最大 径 (mm)	検体 数	腫瘍最大 径 (mm)
Polypoid	27	22.8 ± 11.5	20	22.5 ± 15.8 *
Non-polypoid	11	15.8 ± 7.4	6	15.0 ± 2.6 *
計	38	20.6 ± 5.7	26	20.7 ± 14.1

* n.s.

表9. APC 変異と K-ras 変異の相関

	形態分類	K-ras [*]	APC [†]			
			+	-		
腺腫	Polypoid	+	2	5	n.s. [‡]	
		-	9	11		
	Superficial Elevated	+	1	4	n.s.	
		-	2	9		
	Superficial Depressed	+	0	0	n.s.	
		-	1	13		
(Total)		+	3	9	n.s.	
		-	12	33	n.s.	
sm 癌	Polypoid	+	12	12	n.s.	
		-	6	12		
	Non-polypoid	+	0	2	n.s.	
		-	5	8		
	(Total)		+	12	14	n.s.
			-	11	20	
mp 癌		+	6	11	n.s.	
		-	5	7		

* K-ras codon 12 mutation; +: 変異あり; -: 変異無し

† Mutation cluster region における APC mutation;

+; 変異あり; -: 変異無し

‡ n.s.: not significant

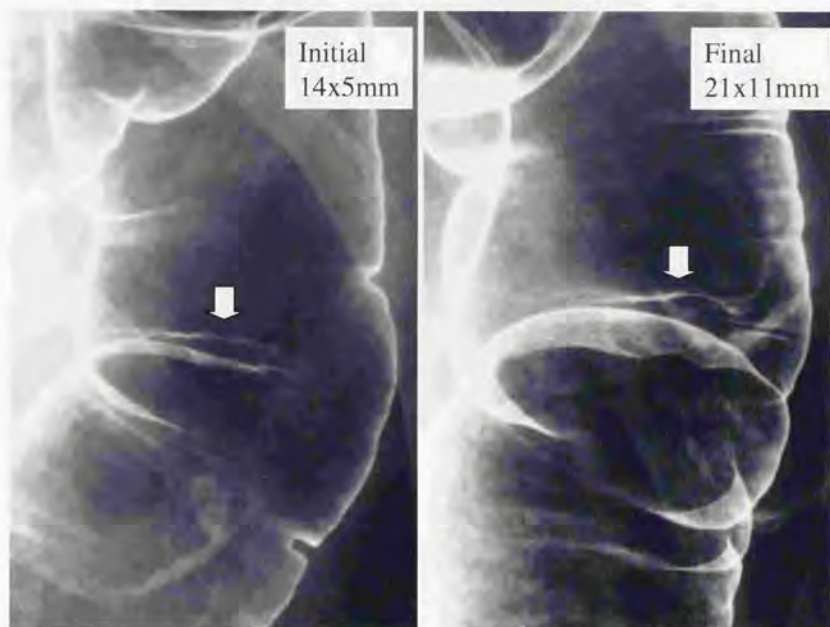
7. 経過観察症例における形態変化

2回の注腸検査により形態変化の確認が可能であった11例の大腸癌の症例における、初回病変の形態は表面型3、無茎7、亜有茎1であり、有茎性の病変は存在しなかった。切除標本は5つの早期癌と6つの進行癌からなっていたが、いずれの病変も大きな形態の変化を伴わないで浸潤癌へと進展していた(表10)。また、29か月の間隔を置いて経過観察された、non-polypoid pathwayの典型例と考えられるIIcの形態のsm浸潤癌の症例を確認できた(図13)。

表10. 6か月以上の間隔を置いた注腸検査による適及的検討例

	年齢	性別	初回注腸		最終注腸 径 (mm)	観察期間 (月)	切除標本	
			形態	腫瘍径 (mm)			形態	深達度
早期癌 (n=5)	62	M	無茎	5	15	27.0	Polypoid	sm
	25	F	無茎	7	20	26.0	Polypoid	sm
	65	M	表面型	10	15	11.6	Non-polypoid	sm
	62	M	表面型	16	20	12.0	Non-polypoid	sm
	70	M	表面型	14	21	29.0	Non-polypoid	sm
平均	57			10.4 ± 4.6	18.2 ± 2.9	21.1 ± 8.6		
進行癌 (n=6)	63	F	無茎	8	15	7.6	2型	ss
	55	F	亜有茎	15	30	10.5	2型	ss
	57	M	無茎	12	40	23.7	2型	se
	68	M	無茎	10	18	13.1	2型	mp
	62	M	無茎	25	34	7.4	2型	ss
	53	M	無茎	26	112	41.1	2型	se
平均	60			16.0 ± 7.7	41.5 ± 35.8	17.2 ± 13		
計 (n=11)	58			13.5 ± 6.8	30.9 ± 28.2	19.0 ± 11		

図 13. 29か月の間隔を置いて経過観察された, non-polypoid pathwayの典型例と考えられる症例



70才男性に発見された下行結腸の21×11mm大の表面陥凹型(IIc)のsm浸潤癌は、典型的なnon-polypoid carcinomaであったが、29か月前の注腸にも14×5mm大の表面型病変が認められ、その形態が保たれていることが確認された。

考察

1. 形態変化

腺腫, sm 浸潤癌の形態を考察すると, 大きな形態変化を伴わない限り, polypoid carcinoma は主に polypoid adenoma から polypoid pathway, すなわち, いわゆる古典的 ACS を経由して進展し, non-polypoid carcinoma は de novo 発癌により生じるかまたは superficial depressed adenoma から non-polypoid pathway を経由して進展する, と仮定できる. Superficial elevated adenoma は中間的な形態であり, どのような形態を経て進展するのか想定するのは困難である.

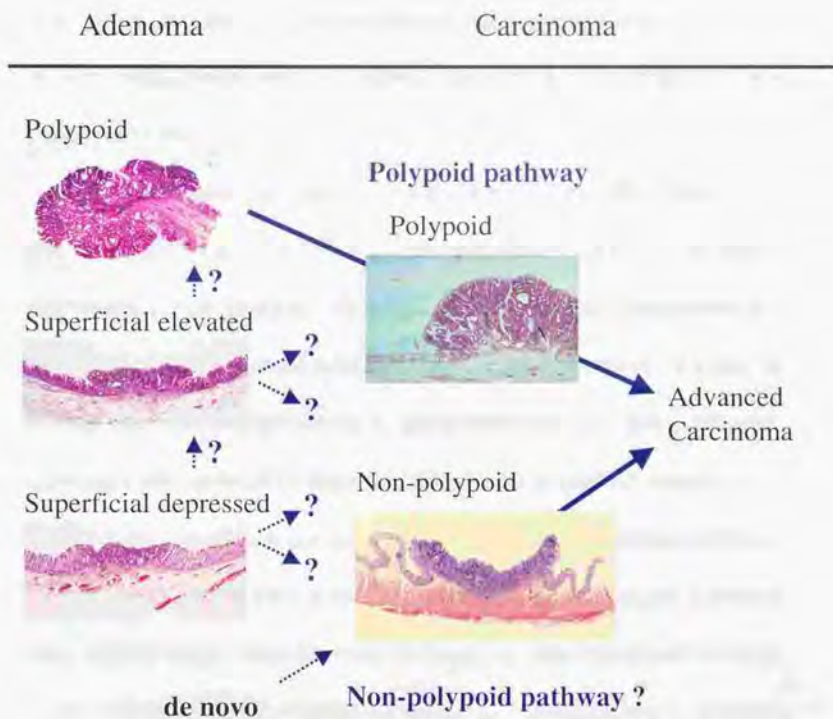
形態学的な考察に基づく大腸癌発生経路のシエーマを図 14 に示す.

注腸検査により経過観察された症例における, 実際の形態変化の適及的検討の結果によれば, いずれの病変も大きな形態の変化を伴わないで浸潤癌へと進展することが示され (表 10, p38), 先の仮定を支持する結果であった.

2. 検体の収集と形態分類, 組織型分類

大腸腫瘍発生経路における APC と K-ras 遺伝子の関与を解明するため, 手術的もしくは内視鏡的に切除された 63 の腺腫と 100 の浸潤癌を形態毎に集めて検討を行った. 基本的には, 検体は同一期間に切除されたものからランダムに集められたので, 腺腫, 癌それぞれにおける形態分類毎の検体の個数は自然界における存在確率に一致する. ところが, superficial depressed adenoma は極めてまれな腫瘍であり, それを発見するのはかなり困難であるので, 積極的にその形態の腫瘍を収集した. そのため, この研究における superficial depressed adenoma の割合だけは, 通常見られる割合よりも高い.

図 14. 腫瘍の形態から想定される腫瘍発生経路



形態学的な大きな変化が途中で生じないと仮定すれば, non-polypoid carcinoma を経由する腫瘍は, polypoid adenoma から発生するとは考えにくい. 正常粘膜から腺腫を経由せずに発癌する de novo 発癌や, superficial depressed adenoma を前駆腫瘍とする non-polypoid pathway を想定するのが自然である.

腺腫は、組織学的に低異型度もしくは中異型度に分類された腫瘍を対象とした。異型度が上がるにつれ遺伝子変異の蓄積も進むと考えられているため、背景を一定に保つ目的で、高異型度の腫瘍は除外した。また、superficial depressed adenoma に形態分類された腺腫は全て tubular adenoma であり、villous adenoma, tubulovillous adenoma は含まれていなかった。Villous な発育パターンを示す腫瘍は、隆起傾向があり、表面型腫瘍として発見されないものと考えられた。

sm 浸潤癌は、polypoid carcinoma と non-polypoid carcinoma に分類して検討した。早期癌の形態分類としては、下田らが、大腸早期癌の形態分類を行っており、大腸早期癌を粘膜内の腺腫または癌の増殖を伴う PG (polypoid growth) と、粘膜内の隆起性増殖を伴わない NPG (non-polypoid growth) に分類している⁵⁷⁾。しかし、今回我々は、より容易に判定が可能でわかりやすい分類を目標として、癌部分の辺縁の形状に主に注目し、polypoid carcinoma を周囲の正常粘膜上に腫瘍組織の辺縁が張り出すように成長する腫瘍であるとす (図 3-A, p8)、non-polypoid carcinoma を中央に潰瘍を持ち、辺縁に腫瘍組織は突出しておらず、周囲を正常粘膜で取り囲まれている腫瘍であるとした (図 3-B, p8)。この分類方法は、腫瘍部分の周囲への突出のみで判定可能であるため、粘膜内癌を含む全ての大腸癌の分類に容易に適用することが可能であると考えられた。この分類方法により、大部分の腫瘍 (72 検体中 66 検体) は確実に分類された。腺腫は腫瘍の高さを基準に分類したにもかかわらず、sm 癌では高さを基準にしなかったのは、粘膜成分の増殖による隆起と sm 層への浸潤による 2 次的な隆起との区別が、高さだけからは判定できないためである。

また、*polypoid carcinoma* と *non-polypoid carcinoma* との間には腺腫成分の併存率に明らかな差 (49% vs. 0%) が認められたことは、腫瘍の発育進展経路の違いを示唆していると考えられ、この分類が大腸癌発生の研究において極めて有用な分類法であることを表している。腺腫成分が併存している浸潤癌は、ある程度の大きさに至るまでは組織学的に腺腫の状態のまま増大し、その一部がさらに何らかの遺伝子変異を獲得し癌化し、腺腫部分を圧排もしくは一部置き換えながら発育したと考えられる。それに対し、腺腫成分が併存していない浸潤癌においては、腺腫部分が癌に完全に置き換わってしまった場合の他に、正常粘膜から直接癌が発生した場合や、もしくは最初は腺腫として発生しても、サイズが極めて小さいうちに癌化して発育したため腺腫部分の残存が認められないという場合などが考えられ、遺伝子変化の蓄積の質的、時間的な差異を反映している組織学的な指標と考えることができる。*Non-polypoid carcinoma* には腺腫成分の併存が全く認められなかったという事実は、この形態の腫瘍は腺腫を経由せずに発生するか、もしくは *superficial depressed adenoma* のようにサイズの小さな腺腫から発育進展しているということを示唆しており、形態学的に想定された *non-polypoid pathway* は、組織学的にも支持される結果であった。

34 の *mp* 癌は形態による細分類は行わなかった。なぜなら、進行癌においては、隆起部分の壊死や脱落、中心陥凹部分の隆起、もしくは辺縁部分の浸潤による形態変化が容易に生じうると考えられ、初期形態が保持されている確率が低くなると考えられ、その形態から起源を議論することは説得性に欠けると判断したためである。山形らの検討⁴¹⁾においても、*PG*, *NPG* の分類において *sm* 浸潤早期癌において認められた *K-ras* 遺伝子の変異率の

違いが、mp 進行癌では、同じ傾向の違いは認められるもののその差は小さくなっており、その理由として形態学的分類の不確定性に起因する可能性が考えられる。実際の症例の検討においても、表面陥凹型早期癌の経過観察例が隆起性進行癌 (type 1) に変化した症例 (図 15) を確認しており、その逆の例も観察されている。



図 15. 表面陥凹型早期癌の経過観察例が隆起性進行癌 (type 1) に変化した症例

初回大腸内視鏡検査



15か月後大腸内視鏡検査



切除標本



70才男性に発見された直径約2cmの表面陥凹病変(左上)は、sm 浸潤早期癌と診断されたが、15か月間経過の後に、直径約6cmの隆起型の進行癌(右上下)へと形態変化した。

進行癌においては、中心陥凹部分の隆起、辺縁部分の浸潤、隆起部分の壊死や脱落などによる形態変化が容易に生じうると考えられる。

3. サイズの違いの影響

A) 腺腫の形態と腫瘍最大径

この研究における対象検体において、*polypoid adenoma* の腫瘍最大径は *superficial elevated adenoma*, *superficial depressed adenoma* のそれよりも有意に大きく、遺伝子変異の解析における結果の相違が、腫瘍の大きさに起因するという可能性を否定できない。特に、*superficial depressed adenoma* においては腫瘍の体積は極めて小さいといえる。従って、形態の違いにより認められた *K-ras* および *APC* 遺伝子変異の割合の違いが腫瘍の大きさに起因するという可能性を否定できないと考えられたので、遺伝子変異の結果と腫瘍最大径を検討した。しかし、腺腫の *K-ras* および *APC* 変異の有無により、形態分類の各群において、腫瘍最大径には違いが認められなかった。ただし、*APC* 変異は、全体まとめると変異の検出された腫瘍は検出されない腫瘍よりもわずかに大きく、*polypoid adenoma* で *APC* 遺伝子変異の割合が大きいのはサイズが大きいことに起因する可能性も考えられた。しかし、形態の違いによるサイズの違いはその腫瘍の性質の違いによる必然の結果と考えられ、また、サイズの違いは遺伝子変化の状態の原因でなく結果である可能性もある。特に表面型腫瘍においてはあまり大きな腫瘍が含まれないことから、サイズの違いを無くして検討することは不可能であろうと考えられる。

B) sm 浸潤癌の形態と腫瘍最大径

sm 浸潤早期癌においても、*polypoid carcinoma* の腫瘍最大径は *non-polypoid carcinoma* のそれよりも有意に大きく、遺伝子変異の解析における結果の相違が、腫瘍の大きさに起因するという可能性を否定できない。しかし、*K-ras* 変異の有無および *APC* 変

異の有無により腫瘍最大径には違いが認められなかったことを考えると、形態の違いにより認められた遺伝子変異の割合の違いが腫瘍の大きさに起因するとは考えにくい。ただし、径の大きな腫瘍は *K-ras* 変異を高率に作っている傾向があった点を考慮する必要がある。しかし、そのような腫瘍は全て polypoid carcinoma に分類されており、発癌経路を考察する上で、解析結果に影響を与えないと考えられた。

4. 癌発生経路における遺伝子変異

A) *K-ras* 変異

K-ras 変異は、非腫瘍細胞には生じていないと考えられるため、非腫瘍細胞の混入により偽陰性の結果を生じる可能性がある。今回我々は、microdissection 法を用いて正確に腫瘍部分だけを切り出して DNA を抽出したため、殆どの正常上皮細胞は含まれておらず、大部分は腫瘍細胞由来の DNA が占めていると考えることができる。我々が用いた 2-step PCR-RFLP 法は、およそ 100 倍数の wild type allele の中の mutant allele を検出できる⁴⁰ため、非腫瘍細胞の混入による偽陰性の可能性はないと考えられた。

Vogelstein らが示したように、*K-ras* 変異は腫瘍形成の早い段階に生じる事象で、腺腫形成における成長と異形性変化に関与すると考えられている³⁶。*K-ras* 遺伝子の変異は腫瘍の大きさ、異型度が増加するときにその変異が関与すると推測されており^{25-28,36,58}、径 1 cm 以上の polypoid adenoma のほぼ 50% に認められていることが示されている³⁶。大腸癌全体としては、検出感度により結果のばらつきが大きいが、17%から 53%程度と報告されている^{25-27,30,41,59-62}。

本研究において、その変異率は、non-polypoid carcinoma において polypoid carcinoma よりも有意に低く、また、polypoid adenoma よりも低いことが示された (表 2)。さらに、superficial depressed adenoma における変異率は polypoid adenoma よりも有意に低い事が示された。これらの結果は、以前の報告^{30,31}に合致する結果であり、non-polypoid carcinoma の前駆体が polypoid adenoma ではなく、de novo もしくは superficial depressed adenoma であって、non-polypoid carcinoma は古典的 ACS を經由しないで発症するという説を支持し、ACS のとる polypoid pathway ではなく、non-polypoid pathway と呼ぶべき大腸発癌経路が存在していることを示唆している。また、この仮説は、polypoid adenoma が顕著な形態学的変化を伴わずには non-polypoid carcinoma に進展しないという想定に合致する。すなわち、*K-ras* 変異は non-polypoid pathway においてはあまり重要な役割を果たしていないと考えられた。

Superficial elevated adenoma についてはその変異率が polypoid adenoma の変異率と同等であり、polypoid pathway に属するグループである可能性が高いと考えられ、いったん polypoid adenoma を經由して浸潤癌へと至る経路が存在する可能性を示唆した。

さらに、non-polypoid carcinoma の sm 浸潤早期癌全体に占める割合は、26%であったことから、non-polypoid pathway を經由して発育進展する癌の割合も同程度であろうと推察された。その起源は de novo 発癌であるか、superficial depressed adenoma を經由するものであろうと想定される。しかし、superficial depressed adenoma は実際の臨床場においては極めてまれな形態の腺腫であるという事実から、non-polypoid pathway においては、

1) de novo 発癌が主であり、腺腫を経由するものは少ない。

2) Superficial depressed adenoma は粘膜筋板が薄いことから想像されるように容易に粘膜下浸潤を起こし、急速に癌へと進展するため、腺腫の段階でとどまる期間が短いという可能性が考えられた。ただし、superficial depressed adenoma は大腸内視鏡検査や注腸検査において発見が困難であるため、存在していても発見される数が少ないであろうことも考慮しなくてはならない。

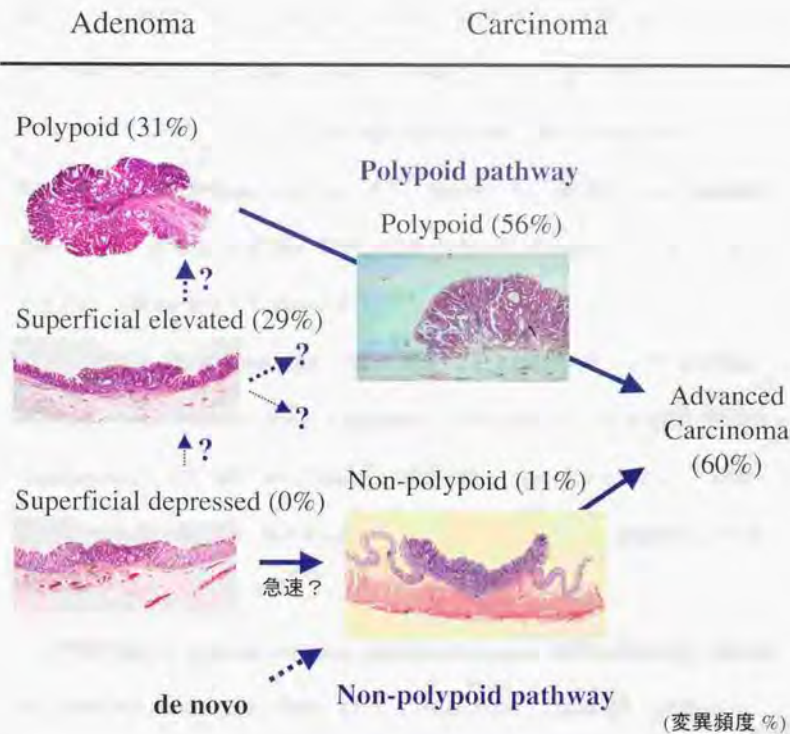
以上の考察に基づき大腸癌発生経路のシエーマを、図 16 に示す。

B) APC 変異

APC 遺伝子は家族性大腸腺腫症 (FAP)⁶³ の原因遺伝子²⁹⁻³¹ であり、散发性の大腸腺腫や大腸癌において変異が 80% 以上に認められる^{37,59,62} 遺伝子である。APC 遺伝子は上皮細胞の増殖に "門番" として働き、この遺伝子の不活化が細胞増殖に必要であると考えられている³⁷。

本研究において同定された APC 変異の率は、polypoid adenoma で 43% と、過去の報告^{53,62} と比較してやや低い値となっている。これは、我々が MCR のみを検索したことと、スクリーニングに用いた SSCP 法に限られた検出力しか持っていないことに起因すると考えられる。しかし、APC 遺伝子は 8529bp からなる巨大な遺伝子であり、特にパラフィンブロックから得られる断片化した DNA の変異を検討する場合には、PTT 法⁶⁴ などの、効率よく大きな領域の変異を検出する手法が使えないため、我々の用いた手法による検出率が限界であろうと考えている。

図 16. *K-ras* 変異頻度から想定される腫瘍発生経路



Polypoid pathway において、*K-ras* 変異頻度は腫瘍の進展に従って増大した。

Non-polypoid carcinoma においては *K-ras* 変異頻度は低く、polypoid adenoma が前駆体であるとは考えにくく、de novo 発癌ないしは superficial depressed adenoma を経由する発癌経路の存在が確認された。Superficial elevated adenoma の変異頻度はむしろ polypoid pathway の頻度に近かった。

APC変異の検出においても *K-ras* の場合と同様に、非腫瘍細胞の混入による偽陰性が問題となる。しかし、その割合が50%以下であれば変異を十分に検出できるので、混入した正常DNAの量は変異をマスクするには充分でないと考えられる。また、偽陰性の生じる可能性は、全ての検体において一様に存在するため、特定のグループに集中して生じるとは考えられず、従って、その影響は平均化され、無視できるものと考えられる。

表3に示した如く、同定されたAPC遺伝子変異の91%は蛋白のtruncationを生じるframe shift または nonsense mutation であり、9%が単一アミノ酸置換となる塩基置換であった。この結果は、APC遺伝子変異の約95%は蛋白のtruncationを引き起こすものであるという過去の報告^{50,52}に合致した。

本研究においては、散发性大腸癌において最も一般的に認められる2ヶ所の体細胞性APC変異、すなわちコドン1309の5塩基欠落、コドン1450のナンセンス変異⁵²が認められなかった。これは偶然の結果であろうと考えられるが、ナンセンス変異は、その部位とSSCPの条件によっては、検出率が低いことが考えられるため、その影響があった可能性もある。

本研究において、polypoid adenoma, polypoid carcinoma, 進行癌が殆ど同じAPC遺伝子変異の割合と分布パターンを持っていることが示された。この結果は、polypoid pathwayにおいてAPCが大腸上皮細胞の増殖の"門番"の役を演じているという考えを支持する結果であった。また、polypoid carcinoma と non-polypoid carcinoma がほぼ同じAPC変異率を持っていることを示した。すなわち、non-polypoid pathwayにおいても、

APCは polypoid pathway における場合と同様の役割を果たしていることが示唆され、形態の違いを規定する因子ではないことが示唆された (表 4)。

ところが, superficial depressed adenoma においては APC 変異の検出率が polypoid adenoma よりも有意に低い事が示された。その結果の解釈としては, superficial depressed adenoma においては実際に APC 変異が少ないのではなく, MCR⁵⁰⁻⁵² 以外の部分の変異を伴っているために変異の検索範囲を MCR に限定した今回の検討では検出できなかった可能性も考えねばならない。しかし, APC の germline mutation を伴う家族性大腸腺腫症の患者においては, MCR の部位に変異を持つ家系は約 50% といわれており^{50-52, 69-67}, それ以外の家系は MCR 以外の様々な部位に変異を持っている。そしてその変異部位に依存してポリープの数や, 大腸外病変に特徴を有している⁶⁸⁻⁷¹。にもかかわらず, これまで知られている限りでは, superficial depressed adenoma を形成する家系は存在せず, すべて polypoid adenoma を生じている。すなわち, 変異部位の相違により形態が変化していることは考えにくい。従って, superficial depressed adenoma においては実際に APC 変異が少ないと考えるのが妥当であろう。

以上より, superficial depressed adenoma が non-polypoid carcinoma に進展する経路を考えたとき, いくつかの仮説が導かれる。

- 1) 浸潤癌に至るまでに新たな APC 変異が獲得される。
- 2) APC に変異を持つ一部の腫瘍のみが癌に進展する。
- 3) Non-polypoid carcinoma は主に APC 変異を伴う de novo 発癌により生じており,

superficial depressed adenoma を経由するものは少ない。

これら仮説を確認するためには、臨床的な経過観察例の蓄積とさらなる検討が必要である。また、今回の検討では、その診断基準について現段階では日欧米の間で必ずしも一致が得られていない⁷²こともあり粘膜内癌を対象としなかったが、診断基準が明確になれば、腺腫と sm 浸潤癌の中間の段階である粘膜内癌を検討することにより、さらに知見が得られるものと思われる。

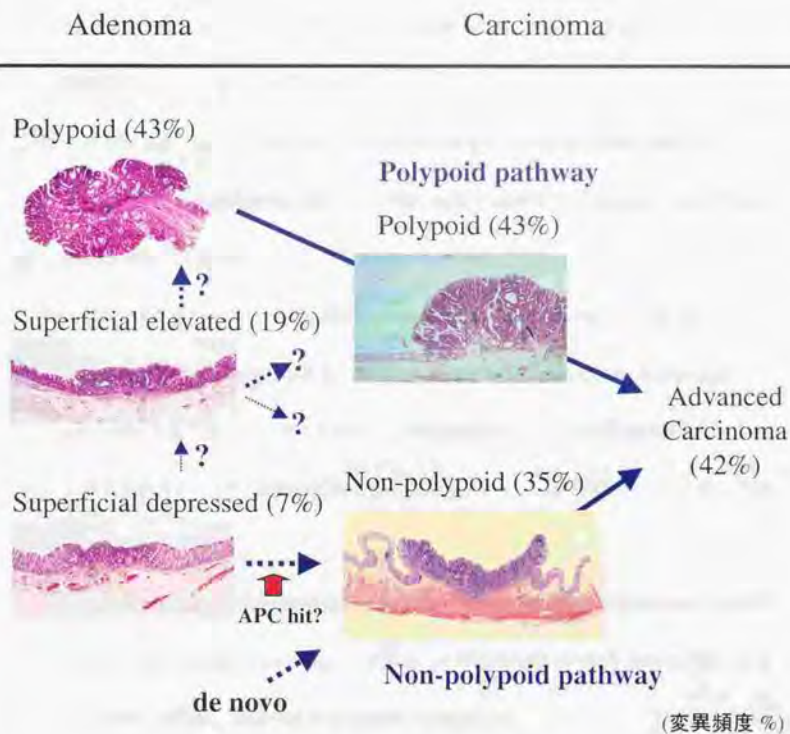
K-ras 遺伝子の解析結果から polypoid adenoma に近い性質を持つと考えられた superficial elevated adenoma は、*APC* 変異率は 19% と、polypoid adenoma と superficial depressed adenoma の中間的な値であった。形態学的にもそれらの中間的なグループであるため、遺伝子変異においても両者の中間的な性質を持つことも考えられ、また、両者が混在している可能性も否定できない。

以上の考察に基づく大腸癌発生経路のシェーマを図 17 に示す。

C) *APC*: *K-ras* に相関がない

加えて筆者らは、全ての腫瘍発生段階において、*APC* の MCR 領域における変異と *K-ras* コドン 12 の変異に相関がないことを示した。すなわち、大腸腫瘍発生経路においては、*APC* と *K-ras* 遺伝子の上記部分における変異は独立していると考えられた。

図 17. APC 変異頻度から想定される腫瘍発生経路



Polypoid pathway においては, APC 変異頻度はほぼ一定で, APC は腫瘍発生の初期段階に生じていることが示された。

Non-polypoid carcinoma における APC 変異頻度は polypoid carcinoma のそれに近い値で, non-polypoid pathway においても同程度の APC 遺伝子の変異が生じていた。

Superficial adenoma, 特に superficial depressed adenoma における変異頻度は低かった。

まとめ

- 1) 大腸 sm 浸潤癌を、その辺縁の形態に着目し、polypoid carcinoma と non-polypoid carcinoma へ分類した。この形態学的分類方法は、粘膜内癌を含む全ての大腸癌の分類に容易に適用することが可能であつて、腺腫併存率に大きな差を認めることから大腸癌発生の検討に極めて有用であることを示した。
- 2) この分類方法に基づき、*K-ras* および *APC* の両遺伝子の変異の有無を検討することで、大腸癌の発育進展過程において、古典的 ACS とは異なる、non-polypoid pathway が存在することを確認した。
- 3) 大腸癌全体の約 1/4 を占めると思われる non-polypoid carcinoma の大部分は、polypoid adenoma 由来ではなく、de novo 発癌もしくは superficial depressed adenoma 由来であろうと考えられた。この経路において、*K-ras* 変異の関与は小さいと考えられたが、*APC* 遺伝子変異は polypoid pathway と同等に関与していることを初めて示した。
- 4) さらに、superficial depressed adenoma においては *APC* 遺伝子変異が少ないことを示した。Non-polypoid pathway におけるこの病変の位置づけを行うためには、さらなる症例の蓄積と、粘膜内癌などの検討が必要である。
- 5) 大腸発癌に関与する遺伝子は多数存在する。大腸癌発生の機構の解明のためには、今後更に多くの遺伝子に関する知見を蓄積する必要があると考える。

参考文献

1. Morson BC. Precancerous and early malignant lesions of the large intestine. *Br J Surg* 1968; 55: 725-31
2. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975;36:2251-70
3. 武藤徹一郎. 大腸癌の組織発生と形態発生 -その歴史的展望- 日本外科学会雑誌 1998;99:351-6
4. Muto T, Kamiya J, Kusama S, Umeda N. Rapid evolution of colon cancer from a colonic polyp. Report of two cases. *Am J Proctol Gastroenterol Colon Rectal Surg* 1982;33:15, 22-4
5. Muto T, Kamiya J, Sawada T, Komishi F, Sugihara K, Kubota Y, Adachi M, Agawa S, Saito Y, Morioka Y, et al. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. *Dis Colon Rectum* 1985;28:847-51
6. 工藤進英, 武藤輝一. 大腸 IIc 型早期癌の検討. *Gastroenterol Endosc* 1986; 28: 2811-13
7. Adachi M, Muto T, Morioka Y, Ikenaga T, Hara M. Flat adenoma and flat mucosal carcinoma (IIb type)--a new precursor of colorectal carcinoma? Report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1988;31:236-43
8. Adachi M, Muto T, Okinaga K, Morioka Y. Clinicopathologic features of the flat adenoma. *Dis Colon Rectum* 1991;34:981-6
9. Hirata I, Tanaka M, Sugimoto K, et al. Clinicopathological study on flat and depressed minute colo-rectal carcinomas. *Dig Endosc* 1991; 3: 526-35
10. Iishi H, Tatsuta M, Tsutsui S, Imanishi K, Otani T, Okuda S, Ishiguro S, Taniguchi H. Early depressed adenocarcinomas of the large intestine. *Cancer* 1992;69:2406-10

11. Kudo S. Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer. *Endoscopy* 1993;25:455-61
12. Kuramoto S, Oohara T. Flat early cancers of the large intestine. *Cancer* 1989; 64: 950-5
13. Iishi H, Kitamura S, Nakaizumi A, Tatsuta M, Otani T, Okuda S, Ishiguro S. Clinicopathological features and endoscopic diagnosis of superficial early adenocarcinomas of the large intestine. *Dig Dis Sci* 1993;38:1333-7
14. Minamoto T, Sawaguchi K, Ohta T, Itoh T, Mai M. Superficial-type adenomas and adenocarcinomas of the colon and rectum: a comparative morphological study. *Gastroenterology* 1994; 106: 1436-43
15. Adachi M, Muto T, Morioka Y, Ikenaga T, Hara M. Flat adenoma and flat mucosal carcinoma (IIb type)--a new precursor of colorectal carcinoma? Report of two cases. *Dis Colon Rectum* 1988;31:236-43
16. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch PM, Jenkins JX, Rouse J, Cavalieri J, Howard L, Lynch J. Hereditary flat adenoma syndrome: a variant of familial adenomatous polyposis? *Dis Colon Rectum* 1992;35:411-21
17. Wolber RA, Owen DA. Flat adenomas of the colon. *Hum Pathol* 1991;22:70-4
18. Lanspa SJ, Rouse J, Smyrk T, Watson P, Jenkins JX, Lynch HT. Epidemiologic characteristics of the flat adenoma of Muto. A prospective study. *Dis Colon Rectum* 1992;35:543-6
19. Matsui T, Yao T, Yao K, Takenaka K, Sakurai T, Iwashita A, Fuchigami T, Aoyagi K, Date H. Natural history of superficial depressed colorectal cancer: retrospective radiographic and histologic analysis. *Radiology* 1996;201:226-32
20. 牛尾恭輔, 阿部荘一, 光島徹, 森山紀之, 高杉敏彦, 岡崎正敏, 松江寛人, 笹川道三, 山田達哉, 森谷宜晴 他. 大腸癌のX線像による週及的検討. *胃と腸* 1979; 14: 537-47

21. 牛尾恭輔, 志賀泰夫, 後藤裕夫, 村松幸男, 高安賢一, 森山紀之, 松江寛人, 笹川道三, 山田達哉, 市川平三郎. Retrospective にみた大腸癌の発育・進展. 胃と腸 1985; 20: 843-58
22. Umetani N, Masaki T, Watanabe T, Sasaki S, Matsuda K, Muto T.
Retrospective radiographic analysis of non-pedunculated colorectal carcinomas with special reference to tumor doubling time and morphological change. Am J Gastroenterol (in printing)
23. Tada S, Yao T, Iida M, Koga H, Hizawa K, Fujishima M. A clinicopathologic study of small flat colorectal carcinoma. Cancer 1994;74:2430-5
24. Matsumoto T, Iida M, Yao T, Fujishima M. Role of nonpolypoid neoplastic lesions in the pathogenesis of colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1994;37:450-5
25. Forrester K, Almqvister C, Han K, Grizzle WE, Perucho M. Detection of high incidence of *K-ras* oncogenes during human colon tumorigenesis. Nature 1987;327:298-303
26. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 1987;327:293-7
27. Burner GC, Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:2403-7
28. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. Science 1990;247:49-56
29. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, et al. Identification of a

- gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;251:1366-70
30. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991;253:665-9
 31. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991;253:661-5
 32. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53
 33. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1994;77:167
 34. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9
 35. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61
 36. Vogelstein B, Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., White R., Smits A.M., Bos J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32
 37. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70

38. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. *APC* mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359:235-7
39. Fujimori T, Satonaka K, Yamamura-Idei Y, Nagasako K, Maeda S. Non-involvement of *ras* mutations in flat colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1994;57:51-5
40. Yamagata S, Muto T, Uchida Y, Masaki T, Sawada T, Tsuno N, Hirooka T. (1994) Lower incidence of *K-ras* codon 12 mutation in flat colorectal adenomas than in polypoid adenomas. *Jap. J. of Cancer Res.*, 85, 147-51
41. Yamagata S, Muto T, Uchida Y, Masaki T, Higuchi Y, Sawada T, Hirooka T. (1995) Polypoid growth and *K-ras* codon 12 mutation in colorectal cancer. *Cancer*, 75, 953-7
42. Kuramoto S, Oohara T. How do colorectal cancers develop? *Cancer* 1995;75:1534-8
43. Minamoto T, Sawaguchi K, Mai M, Yamashita N, Sugimura T, Esumi H. Infrequent *K-ras* activation in superficial-type (flat) colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cancer Res* 1994;54:2841-4
44. Chiang JM, Chou YH, Chou TB. *K-ras* codon 12 mutation determines the polypoid growth of colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:3289-93
45. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5
46. 大腸癌取り扱い規約(第6版): 大腸癌研究会編, 金原出版, 東京 1998
47. Goeltz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130:118-26

48. Oudejans JJ, Slebos RJC, Zoetmulder FAN, Mooi WJ, Rodenhuis S.
Differential activation of ras genes by point mutation in human colon cancer
with metastases to either lung or liver. *Int J Cancer* 1991;49:875-9
49. Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, Thomas DM, Gilbertson J, Foster C, Marshall
CJ. Multiple *K-ras* codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated
with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res*
1991;51:3497-502
50. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y,
Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the *APC* gene in colorectal tumors:
mutation cluster region in the *APC* gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:229-33
51. Beroud C, Soussi T. *APC* gene: database of germline and somatic mutations in
human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1996;24:121-4
52. Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K,
Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M, et al. Characteristics of
somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors.
Cancer Res 1994;54:3011-20
53. Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point
mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4009
54. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating
inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463-7
55. Dubeau L, Chandler LA, Gralow JR, Nichols PW, Jones PA. Southern blot
analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer*
Res 1986;46:2964-9
56. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the
polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-
DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7652-6

57. Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer* 1989;64:1138-46
58. Ando M, Maruyama M, Oto M, Takemura K, Endo M, Yuasa Y. Higher frequency of point mutations in the c-*K-ras* 2 gene in human colorectal adenomas with severe atypia than in carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:245-9
59. Sasaki M, Sugio K, Sasazuki T. *K-ras* activation in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli. *Cancer* 1990;65:2576-9
60. Losi L, Ponz de Leon M, Jiricny J, Di Gregorio C, Benatti P, Percesepe A, Fante R, Roncucci L, Pedroni M, Benhattar J. *K-ras* and p53 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancers. *Int J Cancer* 1997;74:94-6
61. Finkelstein SD, Sayegh R, Bakker A, Swalsky P. Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by *K-ras*-2 analysis. *Arch Surg* 1993;128:526-31
62. Moerkerk P, Arends JW, van Driel M, de Bruine A, de Goeij A, ten Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res* 1994;54:3376-8
63. Burt RW, Bishop DT, Cannon LA, Dowdle MA, Lee RG, Skolnick MH. Dominant inheritance of adenomatous colonic polyps and colorectal cancer. *N Engl J Med* 1985;312:1540-4
64. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;329:1982-7

65. Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsunomiya J, Baba S, Petersen G, et al. Germ-line mutations of the *APC* gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4452-6
66. Stella A, Resta N, Gentile M, Susca F, Mareni C, Montera MP, Guanti G. Exclusion of the *APC* gene as the cause of a variant form of familial adenomatous polyposis. *Am J Hum Genet* 1993;53:1031-7
67. Tops CM, van der Klift HM, van der Luijt RB, Griffioen G, Taal BG, Vasen HF, Khan PM. Non-allelic heterogeneity of familial adenomatous polyposis. *Am J Med Genet* 1993;47:563-7
68. Bussey HJ. Historical developments in familial polyposis coli. *Semin Surg Oncol* 1987;3:67-70
69. Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, Aoki T, Ogawa M, Utsunomiya J, Baba S, Sasazuki T, Nakamura Y. Correlation between the location of germ-line mutations in the *APC* gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992;52:4055-7
70. Nugent KP, Phillips RK, Hodgson SV, Cottrell S, Smith-Ravin J, Pack K, Bodmer WF. Phenotypic expression in familial adenomatous polyposis: partial prediction by mutation analysis. *Gut* 1994;35:1622-3
71. Olschwang S, Tiret A, Laurent-Puig P, Muleris M, Parc R, Thomas G. Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of *APC* mutations in adenomatous polyposis coli patients. *Cell* 1993;75:959-68
72. Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, Lewin KJ, Riddell RH, Shimoda T, Sipponen P, Stolte M, Watanabe H. Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;82:60-9



