

氏 名（本籍）	えん 遠	どう 藤	ち 千	あき 顕
学位の種類	博 士（医 学）			
学位記番号	医 第 2972 号			
学位授与年月日	平成9年9月10日			
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当			
最終学歴	平成2年3月28日 東北大学医学部医学科卒業			
学位論文題目	胸部X線無所見肺扁平上皮癌における染色体欠失 頻度の検討			

（主 査）

論文審査委員	教授 藤 村 重 文	教授 貫 和 敏 博
	教授 堀 井 明	

## 論 文 内 容 要 旨

胸部 X 線無所見肺扁平上皮癌は、胸部写真や CT では異常を認めないが、喀痰細胞診で異常を認める、予後良好な早期の肺癌である。本研究では、肺癌発生・進展の多段階変化、特に早期段階に關与する染色体部位の解明を目的として胸部 X 線無所見肺扁平上皮癌 44 例に対し、進行肺癌で高頻度に欠失の認められている 6 染色体部位・8 種類の DNA 多型マーカーを用いて LOH 頻度の比較検討を行った。

胸部 X 線無所見肺扁平上皮癌では、最深達部位のパラフィン包埋標本から厚さ 20  $\mu$ m の切片 8 枚とこの前後の厚さ 3  $\mu$ m の切片 2 枚を薄切した。厚さ 3  $\mu$ m の切片は HE 染色にて病変の深達度を再確認した。厚さ 20  $\mu$ m の切片はキシレンにて脱パラフィンの後、顕微鏡下に HE 標本と比較しながら癌組織のみを可及的に microdissection し、プロティナーゼ K・フェノール・クロロホルム抽出法にて腫瘍 DNA を得た。また、正常 DNA は切除肺の正常部より同様の方法にて得た。胸部 X 線有所見肺扁平上皮癌では、切除肺の新鮮標本より腫瘍部と正常部からそれぞれ 5 mm 角の標本を得、 $-80^{\circ}\text{C}$  の新鮮凍結標本として保存した。腫瘍 DNA および正常 DNA は、これらの新鮮凍結標本をプロティナーゼ K・フェノール・クロロホルム抽出法にて得た。2 塩基 (CA) 反復配列のマイクロサテライトマーカーを用いた PCR 法による LOH の解析を、染色体部位 2q33・3p21・7q31・9p21・17p13 に対して行った。用いたマイクロサテライトマーカーは、D2S116 (2q33)・D3S643 (3p21)・D3S1298 (3p21)・D5S659 (5q21)・L5.71 (5q21)・D7S522 (7q31)・D9S1748 (9p21)・TP53 (17p13) である。尚、L5.71 は APC/MCC 遺伝子内に、TP53 は、p53 遺伝子内に存在するマイクロサテライトマーカーである。一方のプライマーの 5' 末端を [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP で標識した。PCR 反応は、 $95^{\circ}\text{C}$ 30 秒・ $58^{\circ}\text{C}$ 30 秒・ $72^{\circ}\text{C}$ 30 秒を 1 サイクルとし、計 40 サイクル行った。PCR 産物 5  $\mu$ l をホルムアミドダイ 10  $\mu$ l と混合し、 $85^{\circ}\text{C}$  5 分加熱後、1  $\mu$ l を 5% ポリアクリルアミドゲルで 40W の定電力にて 1~2 時間電気泳動した。ゲルは乾燥後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で 1~24 時間 X 線フィルムに感光させた。LOH の判定はデンストメーターにて、正常 DNA のバンドと比較して腫瘍 DNA のバンドの density が 50% 以下の場合を LOH と判定した。

各染色体部位の X 線無所見肺癌と有所見肺癌の LOH 頻度は、2q33 (12%, 13%), 3p21 (52%, 56%), 5q21 (34%, 61%), 7q31 (28%, 20%), 9p21 (24%, 22%), 17p13 (49%, 70%) であった。3p21 と 17p13 の染色体欠失は X 線無所見肺癌の段階から高頻度に認められた。17p13 では X 線無所見肺癌から有所見肺癌へと癌が進展するのに伴い欠失頻度がさらに上昇した。5q21 では X 線無所見肺癌では欠失頻度は低かったが、有所見肺癌では高頻度に欠失を認めた。FAL (fractional allelic loss) は、Vogelstein らによって各症例において染色体欠失の認めら

れた染色体数を informative であった染色体数で除した値として定義された指標である。X線無所見肺癌 44 例の FAL の平均は 0.28 であった。一方 X線有所見肺癌 41 例の FAL の平均は 0.36 であった。t 検定にて  $p=0.0503$  となり、有所見肺癌の FAL が高い傾向を示した。尚、X線無所見肺癌において、認められた LOH が 1 つのみの症例数は 12 例であったが、この場合の染色体欠失の生じている染色体部位は 3p21 が 7 例、17p13 が 3 例、5q21 と 2q33 が 1 例ずつであった。

染色体異常の最も早期の変化は、3p21 と 17p13 の LOH が壁内限局癌の段階から高頻度であったことによって、これらの染色体部位の染色体欠失であることが示唆された。LOH が 1 つのみ認められた症例の検討でも、3p21 と 17p13 の LOH が多かったことは、これらの異常が肺癌の発生に重要な役割を担っていることを示唆している。そして、X線無所見癌から有所見癌へと腫瘍増殖が進行する段階に 5q21 の異常が生じることも示唆された。今回の検討では、前癌病変の検討はなされなかったため、肺扁平上皮癌発癌の最も初期の染色体異常・遺伝子異常に関しては検討できなかった。今後はより多種類のマイクロサテライトマーカーを用い、新たな抑制遺伝子の同定を進めると共に、また前癌病変における変化を解析し、より詳細な多段階発癌の解明を行いたいと考える。

## 審査結果の要旨

本研究は、胸部 X 線無所見肺扁平上皮癌という、胸部写真や CT では異常を認めないが喀痰細胞診で異常を認める予後良好な早期の肺癌を対象として、肺癌発生・進展の初期段階に関与する遺伝子の局在する染色体部位の解明を目的として胸部 X 線無所見肺扁平上皮癌 40 例に対して、進行肺癌で高頻度に欠失の認められている 6 染色体部位・10 種類の DNA 多型マーカーを用いて染色体欠失頻度の比較検討を行い、以下の結果を得たものである。

X 線無所見肺癌と有所見肺癌の欠失頻度は、それぞれ 2q33 (13%, 11%), 3p21 (53%, 55%), 5q21 (44%, 48%), 7q31 (36%, 21%), 9p21 (30%, 21%), 17p13 (61%, 68%) であった。3p21, 5q21, 17p13 の染色体欠失は X 線無所見肺癌の段階から高頻度に認められた。また、3p21 の欠失は、胸部 X 線無所見肺癌の長軸進展距離と正の相関を示し、一方 17p13 の欠失は、深達度と正の相関を示した。更に 17p13 に関しては、TP53, D17S1876, D17S831 の欠失の検討より、TP53 の存在する 17p13.1 の欠失と、その telomere 側の欠失は独立して生じていると考えられた。即ち、17p13.1 の p53 遺伝子より telomere 側において、p53 遺伝子とは独立した、肺扁平上皮癌発生・進展の初期段階に関与する抑制遺伝子が存在する可能性が示唆された。気管支壁内限局癌を対象に、欠失数と染色体部位の関係を検討した結果では、欠失が 1 ケ所の場合のみは、その染色体部位には特に傾向無く、2q, 9p 以外の染色体に認められた。欠失が 2 ケ所の場合は、3p あるいは 17p が欠失している頻度が高いものの、3p と 17p の 2 つの部位が同時に欠失している頻度は低かった。壁内限局癌の段階から 3p21, 5q21 と 17p13 の欠失が高頻度であったことによって、これらの染色体欠失が肺扁平上皮癌進展の初期変化として示唆されたが、欠失数と染色体部位との検討から、3p21 あるいは 17p13 のいずれかが関与する頻度が高いものの、両者が同時に関与する頻度は決して高くなかった。これらのことから、今回の検討した染色体部位以外の欠失や、あるいはメチル化などの染色体欠失とは全く別の機序が肺扁平上皮癌発生・進展に関与している可能性が示唆された。

肺癌発生・進展における染色体・遺伝子の初期段階に関する系統的研究はほとんどなく、最近発表されたいくつか論文でも対象症例数が一桁台で、頻度に言及することは難しかった。本研究では、肺癌進展の初期段階に関与する遺伝子の局在する染色体部位の解明を目的として胸部 X 線無所見肺扁平上皮癌 40 例と対照群としての胸部 X 線有所見肺扁平上皮癌 40 例に対して、染色体 2q33, 3p21, 5q21, 7q31, 9p21, 17p13 の DNA 多型マーカーを用いて染色体欠失頻度の検討を行った。多種類の染色体部位について 40 例に及ぶ早期段階の肺癌の染色体欠失頻度を検討した論文は本研究が唯一である。また、本研究結果より、肺扁平上皮癌進展の初期段階に関与する染色体部位が解明され、ひいてはその部位の癌抑制遺伝子の存在が示唆された。これらのことから本論文が学位論文に値するものであると考えられる。