

P-41 ヒトクロム肺癌における p16 遺伝子プロモーター領域メチル化の検討

高橋 裕児¹・近藤 和也¹・広瀬由紀子¹・広瀬 敏幸¹
滝沢 宏光¹・藤野 晴彦²・澤田 成彦³・石倉 久嗣¹
三好 孝典¹・露口 勝¹・落合 淳志³・門田 康正¹

¹徳島大学 医学部 病態制御外科；²徳島市民病院 外科；³国立がんセンター研究所支所 病理

【目的】p16 はヒト染色体 9p21 に locus をもつ細胞周期制御蛋白のひとつである。肺癌では p16 蛋白の発現が低下し，p16 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化は扁平上皮癌で約 40%，腺癌で約 30% に認められ，これまで主に喫煙との関連において報告がなされている。従来，我々はヒトクロム肺癌について様々な遺伝子異常を報告してきたが，今回，クロム肺癌と非クロム肺癌に対し p16 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化および p16 蛋白発現状況の比較・検討を行なった。【方法】ホルマリン固定パラフィン包埋標本のクロム肺癌 25 病変（扁平上皮癌 23，腺癌 1，小細胞癌 1）と非クロム肺癌 8 病変（全て扁平上皮癌）から microdissection して得られた DNA に対し p16 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化を Methylation Specific PCR により検出，また，同病変に対し p16 蛋白の発現を免疫染色にて評価し，両者の比較を行なった。【成績】p16 遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化はクロム肺癌 25 例中 7 例（28%），非クロム肺癌 8 例中 2 例（25%）に認められた。またクロム肺癌で p16 蛋白発現正常 11 例中，メチル化のあった症例は 1 例（9%），同発現低下 14 例中メチル化のあった症例は 7 例（50%），非クロム肺癌で p16 蛋白発現正常 4 例中メチル化のあった症例は 0，同発現低下 4 例中メチル化のあった症例は 2 例（50%）であった。【結論】クロム肺癌，非クロム肺癌の両者において，p16 遺伝子プロモーター領域のメチル化と p16 蛋白発現に差異はみられなかった。クロム肺癌においては，クロムに曝露することが p16 蛋白発現低下の要因とはならないことが示唆された。

P-43 原発性肺腺癌における p16,p15,p14 遺伝子の genetic 及び epigenetic な変化

栗屋 浩一¹・武島 幸男¹・風呂中 修¹・石田 啓
井内 康輝

広島大学 大学院 医歯薬総合研究科 病理学教室

【目的】近年，がん抑制遺伝子の不活化には，genetic のみならず epigenetic な過程によることが知られている。一方，p16, p15, p14 遺伝子は，chromosome 9p に位置し，細胞周期の制御に関連する遺伝子であるが，これらの不活化と癌の発生・進展との関係との相関が指摘されており，原発性肺腺癌におけるこれら 3 つの遺伝子の不活化の有無とその機序を探ることを試みた。【方法】外科的に切除された原発性肺腺癌 66 例の新鮮凍結切片より DNA を抽出し，9p21-22 に存在する 3 つの microsatellite marker を用い LOH 解析を行なった。また，Methylation specific PCR 法によって p16, p15, p14 遺伝子のプロモーター領域の異常メチル化を検討した。蛋白レベルの発現については，免疫組織化学的染色によって検討した。【成績】異常メチル化は，癌組織では，p16, p15, p14 遺伝子のそれぞれは，24.2%，22.7%，16.7% の症例に，正常肺組織では，それぞれ 13.6%，4.5%，15.2% の症例に認めた。p16 遺伝子について免疫組織化学的染色と異常メチル化との関連を検討した結果，相関ははなかった。異常メチル化と臨床病理学的因子との関係を見ると，p16, p14 遺伝子の異常メチル化と腫瘍径との間に，p14 遺伝子の異常メチル化と性差との間に有意な相関を認めた。LOH の結果については，後日報告する。【結論】原発性肺腺癌における p16, p15, p14 遺伝子の genetic 及び epigenetic な変化は，比較的高頻度であり，腫瘍の progression にかかわる可能性がある。

P-42 癌化における *de novo* DNA メチル転移酵素，DNMT3b1/3b2 と DNMT3b3 の機能的差異の検討—実験モデルの確立—

渡邊 秀生¹・副島 研造²・川田 一郎¹・山口佳寿博¹

¹慶應義塾大学 医学部 内科学教室；²川崎市立川崎病院 内科

【目的】DNA の異常メチル化を介したエピジェネティックな変化は癌化の重要メカニズムの一つである。我々は正常ヒト気管支上皮細胞（NHBE）を用いた不死化および癌化モデルを確立した。癌化細胞では，正常または不死化細胞と比べ，DNMT3b の 5 種類の spliced form の発現パターンが，3b1/2 優位から 3b3 優位に変化することを見いだした。そこで本研究では siRNA を用いて，各 spliced form を特異的に発現抑制する方法を確立し，癌化における DNMT3b の各 spliced form の役割を明らかにすることを目的とした。【方法】NHBE に hTERT,LT,H-ras を順次導入し，細胞を癌化した。癌化 NHBE 細胞にそれぞれ，1) Lamin (Control)，2) 全ての DNMT3b (T-3b)，3) 3b1/2 のみ (P-3b)，4) 3b3 のみ (S-3b) を抑制する siRNA を導入した。各細胞から RNA を抽出し，全 DNMT3b (t-3b)，3b1/2 のみ (p-3b)，3b3 のみ (s-3b) の発現を，それぞれ定量的 RT-PCR を用いて検出し，それらの抑制の程度を検討した。【結果】各 siRNA 処理により，Lamin と比較して十分な抑制効果が得られた。【考察】今後 siRNA 処理した癌化 NHBE を用いて，生物学的癌化能の評価を行うことで，DNMT3b の各 spliced form の癌化への関与の検討が可能と考えられる。

	Lamin	T-3b	P-3b	S-3b
t-3b (%)	100	16.4	33.9	47.2
p-3b (%)	100	22.6	20.8	153.2
s-3b (%)	100	20.0	71.3	58.4

P-44 ヒト非小細胞性肺癌における変異型 KRAS と染色体 12p 領域のヘテロ欠失の解析

内山 美佳^{1,2}・宇佐美範恭^{1,2}・近藤 征史^{1,2}・森 正一^{1,2}

伊藤 正夫^{1,2}・伊藤 源士^{1,2}・吉岡 洋²・今泉 宗久²

上田 裕一²・下方 薫³・関戸 好孝¹

¹名古屋大学 医学部 附属病院 予防医療部；²名古屋大学 医学部 附属病院 胸部外科；³名古屋大学 医学部 附属病院 呼吸器内科

【目的】癌遺伝子である KRAS の活性型変異は肺癌を含め多くのヒトの癌で認められている。最近，Ras シグナルカスケードが恒常的に活性化するためには Ras に活性型変異が入るだけでは不十分であり活性型 Ras が野生型 Ras に比しさらに過剰発現するか，あるいは野生型 Ras が欠失するかがマウスモデルで報告されている。我々は変異型 KRAS と KRAS 遺伝子の存在する染色体 12p 領域のヘテロ欠失の解析をすることによりヒト非小細胞性肺癌における KRAS の活性化機構の解析を行なった。【対象と方法】当施設や関連施設で外科切除された非小細胞性肺癌 154 例とコントロールとして KRAS の点突然変異を認める非小細胞性肺癌の細胞株 10 例を使って遺伝子の変異の検討を行い，KRAS の発現を腫瘍においては免疫組織学染色法にて，細胞株ではウエスタンブロット法にて検討した。また，NRAS 及び BRAF 遺伝子の変異の検討も行った。Loss of heterozygosity study はマイクロダイセクションを施行して得られた腫瘍検体で行った。【結果】KRAS の点突然変異は 154 例中 11 例（7%）に認められそのうち野生型 KRAS の欠失が認められたのは 2 例のみであった。細胞株では 10 例中 3 例に野生型 KRAS の欠失が認められた。野生型 KRAS を保持している細胞株では欠失しているものに比し，KRAS タンパク質が強く発現していた。cDNA を用いて解析してみると野生型 KRAS よりも変異型 KRAS の mRNA 発現が多く認められた。免疫組織学的検討では 148 例中 113 例（76%）が陽性であり，その多くは野生型 KRAS を保持していた。NRAS 及び BRAF 遺伝子で変異はみられなかった。【結論】ヒト非小細胞性肺癌では野生型 KRAS の欠失よりも変異型 KRAS の過剰発現のほうが活性化の機構のうえで重要であることが示唆された。