

O-33 肺癌における TIG1 遺伝子メチル化の定量的解析

遠藤 誠¹・宗 幹²・田村 元²・柳川 直樹²
金内 直樹¹・大泉 弘幸¹・本山 倂一²・貞弘 光章¹

山形大学 医学部 循環器・呼吸器・小児外科学¹; 山形大学 医学部 人体病理病態学²

【背景】遺伝子メチル化の検出方法としては従来, MSP 法, COBRA 法, MS-SNuPE 法, bisulfite-SSCP 法などがあるが, いずれも定量性に乏しく判定基準も不明確である。メチル化の状態を定量的に判定できれば, 良悪性診断, 個性診断, 発癌リスク評価などに有用と考えられる。今回我々はメチル化診断に特化した DNA microarray を開発した。【目的】25 例の肺腺癌および扁平上皮癌とその対応する非腫瘍組織において, TIG1 遺伝子プロモーター領域近傍のメチル化を DNA microarray を用いて定量的に解析し, 特徴を明らかにする。【対象】50 例の肺癌手術例(腺癌 25 例, 扁平上皮癌 25 例)における腫瘍組織および非腫瘍組織。男性 34 例, 女性 16 例, 年齢: 42 歳~86 歳(平均 68.0 歳)。【方法】手術検体から DNA を抽出, Bisulfite 処理をしたものを PCR にて増殖する。PCR 産物を生成, strandase 処理を行い, メチル化チップに搭載したプローベとハイブリダイゼーションさせ, 検出, 解析する。解析は standization curve からメチル化率を算出する。【結果】組織型と TIG1 メチル化率では, 扁平上皮癌で 14.5% に対し, 腺癌では 0.5% と有意に低頻度であった。非腫瘍部は 0.3% と低頻度であった。年齢と TIG1 メチル化率では, 相関関係を認めなかった。【まとめ】肺扁平上皮癌では, 腺癌と比較し TIG1 遺伝子は高率にメチル化を認めた。肺腺癌では, TIG1 はほとんどメチル化を認めなかった。肺非腫瘍組織では, TIG1 はほとんどメチル化されておらず, 加齢とも関連がない。【結語】TIG1 遺伝子のメチル化を DNA microarray を用いて定量的に解析した。TIG1 遺伝子は肺扁平上皮癌において高率にメチル化されていた。

O-34 肺癌研究における組織マイクロアレイ (TMA) の有用性

鈴木 弘行¹・岡部 直行¹・長谷川剛生¹・米地 敦¹
大杉 純¹・星野 実加¹・樋口 光徳¹・塩 豊¹
藤生 浩一¹・菅野 隆三³・大石 明雄²・後藤 満一¹

福島県立医科大学 医学部 第一外科 呼吸器外科¹; 福島赤十字病院 呼吸器外科²; いわき市立総合磐城共立病院³

肺癌における予後因子の同定や治療効果予測などの目的でバイオマーカーの必要性がより高まっている。バイオマーカーの検討においては組織における分子の発現解析は必須であるが, 多検体の網羅的解析がより精度の高い解析には重要である。TMA は多検体をより均一な条件で検討できるという利点により広く用いられるようになった。当科では肺癌組織を用い各種分子発現と予後因子の解析のために, 同手法を用いた検討を行っているので紹介する。TMA アレイヤー (AZUMAYA KIN-1) を用いて 2 セットの組織マイクロアレイを作成した。検体はいずれも当科での切除症例であり, 1998 年~2000 年の症例で予後の確定がなされた患者群のセット, 2004 年~2005 年の症例で FDG-PET の検討症例や新しい世代の補助療法の施行例を対象としたセット, 計 159 例である。各症例につき 2Spots を採取, 径 2mm の Spot サイズにて検討した。これまで免疫染色ベースで細胞周期関連分子, アポトーシス関連分子, HLA 関連分子, 薬剤耐性関連分子を検討した。分子発現の heterogeneity の問題については予めランダムに選択した症例についてドナーブロックにおける分子発現と TMA の分子発現のデータを比較検討し 93.3% の一致率であることを確認した。分子発現と臨床病理パラメータとの関連を検討, クラスターリング手法も併用し, 細胞周期関連分子発現プロファイル, HLA クラス I, PUMA などを非小細胞肺癌の予後因子として抽出した。今後は症例の集積による精度向上と外部データの参照による validation が必要と考えられる。

O-35 肺癌細胞における Notch シグナルのアポトーシス誘導効果

橋本 直純¹・今泉 和良¹・松尾 正樹¹・長谷川好規
名古屋大学医学部呼吸器内科

Notch シグナルは, Notch 細胞内ドメインの核内移行により Notch の下流シグナルの活性化を促し, 多様な生物活性を示す。Notch シグナルは腫瘍種によって増殖促進・抑制など多様な生物活性を示すとされているが, 肺癌における Notch シグナルの役割は明らかでない。肺癌における Notch シグナルの役割を明らかにするために, Notch1 細胞内ドメイン (NICD1) 遺伝子移入したマウス肺癌細胞株 3LL・血管内皮細胞株 M1 における表現型の比較検討を試みた。NICD1 恒常発現株は樹立されたが, NICD1 遺伝子導入 3LL は樹立されなかった。一過性遺伝子発現導入において GFP 導入細胞株は細胞質内に GFP 発現を認めたが, GFP-NICD1 導入細胞株はいずれの細胞株も GFP の発現は核内に局在していた。一過性遺伝子導入後 48 時間での AnnexinV の発現は, M1 では有意な差を認めなかったが, GFP-NICD1 発現 3LL は GFP 発現 3LL のものと比較し有意な AnnexinV 陽性細胞の増加を認めた。ヒト肺癌細胞株 A549 においても 3LL と同様の傾向を認めた。これらの data は肺癌細胞における Notch シグナルは, 一部にアポトーシスを介して抗腫瘍効果を示す可能性を示唆した。

O-36 悪性中皮腫における phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 遺伝子の変異についての検討

林 ゆり¹・高部 和彦¹・芝 靖貴¹・齊藤 和人¹
篠原 陽子¹・小貫 琢哉²・井口けさ人²・稲垣 雅春²
鈴木 恵子³

土浦協同病院 呼吸器内科¹; 土浦協同病院 呼吸器外科²; 土浦協同病院 病理³

【目的】phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) はチロシンキナーゼ受容体のシグナル伝達系の下流に存在し, 種々の悪性腫瘍において癌化への関与が考えられている。遺伝子変異は, 卵巣癌, 乳癌で報告され, Exon 9 の E542K, E545K, Exon 20 の H1047R/L の頻度が高い。また, PI3K の遺伝子変異による発癌を Rapamycin (免疫抑制剤) が阻害する可能性が示唆されている。PI3K の遺伝子変異は肺癌ではまれと報告されているが, 悪性中皮腫における検討は報告されていない。今回, 我々は, 当院悪性中皮腫において PI3K の遺伝子変異のうち E542K, E545K, H1047R/L の遺伝子変異の有無を検討したので報告する。【方法】当院の悪性中皮腫 10 例(胸膜 8 例, 心膜 2 例)の生検・手術のホルマリン固定標本 (7 例), 胸水 (3 例) より DNA を抽出し, PI3K 遺伝子の Exon 9, Exon 20 を PCR 法で増幅し, 制限酵素分析 (E542K; Hpy188I, E545K; TspRI, H1047R/L; BsaBI) により変異の有無を検索した。対照として, 卵巣癌 22 例, 乳癌 10 例についても同様の検索を行った。【成績】悪性中皮腫は男性 9 例, 女性 1 例, 平均年齢は 64 歳 (39~76 歳) で, 石綿曝露を 8 例 (80%) に認めた。組織型は, 上皮型 4 例, 二相型 3 例, 肉腫型 3 例であった。卵巣癌では, E545K, H1047L, 各 1 例の計 2 例 (9.1%), 乳癌では, H1047R を 3 例 (30%) に認めた。中皮腫では, E545K を 1 例 (65 歳, 男性, 二相型胸膜中皮腫, 石綿曝露あり) に認めた。【結論】悪性中皮腫 10 例中 1 例 (10%) に E545K の遺伝子変異を認めた。PI3K の変異を認める中皮腫例では, Rapamycin による治療が奏功する可能性があり, 今後の検討が必要と考えられる。