

P-313 悪性胸膜中皮腫における PI3K/AKT 経路, PTEN 遺伝子変異の検討

鈴木裕太郎^{1,2}・村上 秀樹¹・川口 晃司¹・谷口 哲郎¹

長谷川好規²・下方 薫³・関戸 好孝¹

愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学部¹; 名古屋大学 医学部 呼吸器内科²; 中部大学 生命健康科学部 生命医科学科³

[背景・目的] 悪性胸膜中皮腫 (MPM) はアスベスト曝露後約 30~40 年の潜伏期間を経て発症する予後不良な疾患である。日本において今後患者数の増加が予想されており, 有効な治療法を確立する上で分子生物学的特性の解明が望まれている。種々の悪性腫瘍において PI3K/AKT 経路の活性化が認められ, 腫瘍細胞の増殖, 生存等に関与することが知られている。MPM においても約 2/3 の症例において AKT 活性化が報告されている。腫瘍における AKT 活性化のメカニズムは多様であるが, MPM においては Testa 博士らにより PTEN 欠失 (細胞株 1/9 株, 腫瘍組織 2/26 組織) が報告されているのみである。そこで今回我々は既存の欧米人由来 MPM 細胞株 7 株に加え, 当研究室で樹立した日本人 MPM 患者由来の細胞株 11 株, 計 18 細胞株を用い, PI3K/AKT 経路に関与する分子の遺伝子変異, 発現解析を施行した。[結果] AKT の活性化を MPM 細胞株 17 株中 5 株に認めた。PIK3CA 遺伝子変異解析では, 全 exon を genomic PCR, direct sequencing 法を用いて解析するも遺伝子変異は認められなかった。一方 PTEN 遺伝子変異解析では, MPM 細胞株 18 株中 1 株において欠失を認めた。また LKB1 遺伝子解析では変異を認めなかった。[結語] MPM では AKT 活性化の関与が示唆されたが, PIK3CA 遺伝子変異解析では 18 細胞株中変異は認められなかった。PTEN 欠失を 1 細胞株において認めたが他の腫瘍よりその頻度は低く, 今後さらにより多くの細胞株を樹立し検討を行う予定である。

P-314 肺癌細胞における PTEN の不活化とその回復

野呂林太郎・弦間 昭彦・宮永 晃彦・峯岸 祐司

奈良 道哉・小久保 豊・小斉平聖治・片岡 清子

岡野 哲也・清家 正博・松田久仁子・吉村 明修

工藤 翔二

日本医科大学

PTEN 発現低下は肺癌の予後や Gefitinib を含める抗癌剤の薬剤耐性と関係があるといわれている。我々はそのメカニズムを明らかにするため発現低下を示す細胞株を中心に蛋白, 遺伝子, epigenetic の変化を検索した。25 種の肺癌細胞株のうち 6 種 (24%) に蛋白発現低下を認め, 同時に mRNA の発現低下も認めていた。PCR-SSCP 法では 2 種 (8%) に Homozygous deletion を認め, ともに蛋白発現低下を認めていた。また MSP-PCR 法では 2 種に promotor の Hypermethylation を認め, 5-AZA 投与にて mRNA 及び蛋白発現は上昇した。PC9 の高転移株であり Gefitinib 耐性株でもある PC9/f9, PC9/f14 は感受性株である PC9 に比べ mRNA 及び蛋白発現の著明な低下を認めた。TSA (HDAC inhibitor) 投与にてこれらの mRNA 及び蛋白発現は上昇した。以上より蛋白発現の低下のメカニズムとして Homozygous deletion に加え Histone deacetylation, プロモーター領域の Hypermethylation が考えられる。また gefitinib 耐性株において, TSA 併用により有意な殺細胞効果を認めた (MTT assay)。PTEN を活性化させる HDAC inhibitor や demethyltransferase と Gefitinib を始めとする他の抗癌剤や分子標的薬の併用は肺癌治療に有用であろう。

P-315 肺癌における RASSF2 遺伝子のエピジェネティックな不活性化

解良 恭一¹・砂長 則明¹・富澤 由雄³・柳谷 典子¹

今井 久雄¹・佐藤 浩二³・飯島 浩宣¹・久田 剛志¹

石塚 全¹・土橋 邦生²・齋藤 龍生³・中島 孝⁴

森 昌朋¹

群馬大学大学院 病態制御内科学 呼吸器・アレルギー内科¹; 群馬大学 保健学科²; 国立病院機構西群馬病院 呼吸器科³; 群馬大学大学院 応用腫瘍病理学⁴

[目的] 染色体 20p13 領域に位置する RASSF2 遺伝子は, RASSF1 family の一つで, 近年, 大腸癌や胃癌において, プロモーター領域の異常メチル化により発現の低下が認められた。[対象と方法] 肺癌細胞株 69 株と原発性非小細胞肺癌患者 106 症例を用い, RASSF2 の発現を RT-PCR 法により, また RASSF2 のプロモーター領域の異常メチル化を Methylation Specific PCR 法により検討した。[結果] 26% の小細胞癌細胞株 (7/27) と 50% の非小細胞癌細胞株 (21/42) に RASSF2 の発現低下を認めた。また 27% の小細胞癌細胞株 (6/22), 65% の非小細胞癌細胞株 (17/26) に異常メチル化を認めた。非小細胞癌細胞株における異常メチル化の頻度は, 小細胞癌細胞株に比べて有意に高かった。RASSF2 の発現は, 5-aza-2'-deoxycytidine, trichostatin-A, またはその両方の処理を行った肺癌細胞株で回復した。原発性非小細胞肺癌 106 症例にてメチル化の解析をしたところ, 31% (33/106) に異常メチル化を認め, 異常メチル化の頻度は非喫煙者で有意に高かった。[結語] プロモーター領域の異常メチル化による RASSF2 遺伝子の不活性化は, 肺癌のうち, 特に, 非喫煙者における非小細胞肺癌の発生に重要な役割を果たしていると考えられた。

P-316 Frequent Aberrant Methylation of gene SAMD14 in Human Pulmonary Adenocarcinoma

孫 衛紅¹・飯嶋 達生²・加野 准子¹・穴見 洋一¹

森下由紀雄¹・大窪 千草¹・野口 雅之¹

筑波大学大学院 人間総合科学研究科¹; 茨城県立中央病院²

Methylation is known to play an important role in neoplasia by inactivating tumor suppressor genes. The aim of this study is to detect the abnormally methylated gene in the adenocarcinogenesis using A/J mouse lung adenoma tissue. The PCR-based methylated CpG island amplification technique, modified suppression subtractive hybridization and differential screening were used to identify the differentially methylated sequence. Four genes were identified from A/J mouse adenoma tissue. These were Kif21a, Samd14, EG436235 and Vwal. Quantitative RT PCR result showed differences in expression level between A/J mouse normal lung tissue and adenoma tissue for Kif21a ($p < 0.005$), Samd14 ($p < 0.005$) and EG436235 ($p < 0.01$) genes. Using homoloGene software, human homologue genes were detected. Further study of the human homologues of KIF21A ($p = 0.045$) and SAMD14 ($p = 0.007$) showed that they were expressed in normal lung tissue but markedly down-regulated in lung adenocarcinoma tissue. Bisulfite sequencing and MSP revealed that the promotor region of SAMD14 in human lung adenocarcinoma was methylated more frequently than that of its normal counterpart. These data suggest that promotor methylation of this gene is a specific event in pulmonary adenocarcinogenesis, and that their down-regulation may be functionally associated with malignant progression of lung adenocarcinoma.