

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	澁川 紀代子
学位論文題目			
High Incidences of Chromosomal Abnormalities at 1p36 and 9p21 in Early-stage Central Type Squamous Cell Carcinoma and Squamous Dysplasia of Bronchus Detected by Autofluorescence Bronchoscopy (自家蛍光内視鏡で検出される早期中枢性肺癌と異形成病変の1p36、9p21領域に関する研究)			
共著者名			
三代川 斉之、徳差 良彦、佐々木 高明、長内 忍、大崎 能伸			
未公表			
研究目的			
<p>肺癌は主要な癌死の原因の一つである。扁平上皮癌 (SCC) は肺癌の中でおよそ30%を占め、末梢肺組織よりも中枢気管支に多く発生する。重喫煙者では病変が同時多発する傾向があり、臨床経過や予後を改善するためには早期に肺癌を発見することが重要である。我々は中枢性早期肺癌や異形成病変を発見するために自家蛍光内視鏡 (autofluorescence bronchoscopy: AFB)、PDS-2000を用いて気管支壁の観察を行ってきた(1)。</p> <p>癌の発生や進行にはさまざまな遺伝子が関わっている。近年、さまざまな癌組織での検討により、癌抑制遺伝子の存在する染色体領域にloss of heterozygosity (LOH)やmicrosatellite instability (MSI)が高頻度に発生していることが示された。肺癌では1p,3p,9p,17pなどのLOHが報告されており、それらの染色体上にはそれぞれ癌抑制遺伝子とされる<i>p73</i>、<i>FHIT</i>、<i>p16</i>、<i>p53</i>が存在している。そのことから、肺癌の発癌に関わる癌抑制遺伝子の異常とそれに基づく多段階発癌のメカニズムに関する報告がされてきた(2)。</p> <p>我々は扁平上皮癌におけるLOH/MSIと癌抑制遺伝子関連タンパク発現の病的意義を解明するために、AFBで異常蛍光を呈した異形成病変や早期中枢性扁平上皮癌、末梢の浸潤性扁平上皮癌に対して、LOH/MSIや癌抑制遺伝子関連タンパクの発現について比較検討した。</p>			
対 象			
1、早期中枢性肺癌 (early SCC) と異形成病変 (squamous dysplasia)			
2001年から2007年までにearly SCCとしてPDTを行った15症例のうち研究に同意された13症例について検討した。PDS-2000による自家蛍光内視鏡検査を行い、異常蛍光を呈した13箇所 early SCCと9箇所のsquamous dysplasiaを用いた。対照としてそれぞれの正常気管支上皮を用いた。			

2、浸潤性扁平上皮癌 (invasive SCC)

2004年と2005年で扁平上皮癌にて手術を行った患者のうち同意の得られた19例について検討した。対照としてそれぞれの正常気管支上皮を用いた。

方 法

1、DNA抽出

PALM社製のlaser microdissection and pressure catapulting (LMPC)法を用いてそれぞれの検体から核を採取し、DNAを抽出した。

2、LOH/MSIの解析

polymerase chain reaction (PCR)法を用いて、1p36と9p21の染色体領域のLOH/MSIを調べた。マイクロサテライトマーカーは1p36に対してD1S2672、9p21に対してD9S1784を使用した。1p36には *p73*、9p21には *p16*がそれぞれ存在する。PCR産物はABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で電気泳動を行い、GeneScan (Applied Biosystems)で解析した。SCCおよび dysplasiaの2本の対立遺伝子の信号強度の比が、正常気管支上皮での比と比較し50%以上減少したときにLOHと判定した。また、正常気管支上皮と比較し2base pair以上異なったsizeのpeakが出現したときにMSIと判定した。

3、免疫組織化学染色 (IHC)と評価法 (score)

p73、p16、p53、Ki-67の抗体を用いてそれぞれの組織にIHCを行った。p73は活性型p73を、p53は主に変異型p53を検出する。評価は染色された核の割合と染色強度により0-8段階で評価した。

結 果

1、early SCCとsquamous dysplasia、およびinvasive SCCにおけるLOH/MSI

13症例のearly SCCにおけるLOH/MSIの頻度は1p36で62%、9p21で54%であった。9症例の squamous dysplasiaではそれぞれ33%、63%であった。early SCCとsquamous dysplasiaでLOH/MSIの頻度に統計学的な差はなかった。19症例のinvasive SCCにおけるLOH/MSIの頻度は1p36で44%、9p21で84%であった。いずれも病変部におけるLOH/MSIの頻度は高かった。early SCCと invasive SCCの間でLOH/MSIの頻度に差はなかった。

2、early SCCとsquamous dysplasia、およびinvasive SCCにおけるタンパク発現

early SCCとsquamous dysplasia、invasive SCCにおけるp73の発現は正常気管支上皮と比較して有意に低く、p53、Ki-67の発現は有意に高かった。early SCCとsquamous dysplasiaとの比較ではいずれのタンパク発現においても差はなかった。p16はいずれの組織においても発現は減少していたが、early SCCとinvasive SCCでタンパクの発現に差はなかった。他の正常上皮で発現の低い活性型p73が正常気管支上皮では発現が亢進していた。

考 案

我々は自家蛍光内視鏡による観察が気管支上皮の遺伝子異常を反映しているかどうか調べるために、自家蛍光内視鏡で異常蛍光を呈した気管支病変について2箇所の染色体領域のLOH/MSIを解析した。1p36と9p21には癌抑制遺伝子である*p73*、*p16*がそれぞれ存在している。*p73*は*p53*ファミリーであり(3)、*p16*はcyclin-dependent kinase 4および6を阻害し細胞周期を停止させる。

今回の研究ではearly SCC、squamous dysplasiaで2つの染色体領域のLOH/MSIの頻度が高かったが、invasive SCCとの間には差がみられなかった。また、early SCC、squamous dysplasiaにおける*p73*の発現は正常気管支上皮と比較して有意に低下していた。このことは1p36のLOH/MSIに関連する可能性が示唆された。一方、*p73*は正常組織では発現が低いといわれていたが(3)、今回の研究では正常気管支上皮で発現の増加がみられた。発癌患者においてはAFBにて正常に見える気管支上皮でも既に*p73*経路を介したシグナル伝達カスケードの活性化が起こっている可能性がある。early SCC、squamous dysplasiaでは*p16*に発現の低下がみられ、細胞増殖の指標であるKi-67の発現が増強していた。この結果は*p16*の発現低下による、細胞周期回転の亢進が中枢性SCCの発癌過程に関与していると推察される。また、変異型の*p53*の発現がearly SCCやinvasive SCCだけではなくsquamous dysplasiaでも増強していた。これらの結果より、自家蛍光内視鏡で発見される前癌病変としてのsquamous dysplasiaは、すでに早期中枢性扁平上皮癌や間質浸潤のある扁平上皮癌と同じタンパク発現異常を有していることが示唆された。

PDS-2000では癌だけではなくsquamous dysplasiaのような前癌病変からの異常蛍光を観察することが可能である。PDS-2000で検出される気管支のmoderate～severe dysplasiaは早期中枢性扁平上皮癌や間質浸潤のある扁平上皮癌と同じように1p36や9p21のLOH/MSIを有し、癌抑制遺伝子関連のタンパク発現異常を認める頻度が高いことから、これら前癌病変も光線力学的治療の対象にすべきであると考えられた。

引用文献

(1) Nakanishi, K, Ohsaki, Y, Kurihara, M, et al. Color auto-fluorescence from cancer lesions: Improved detection of central type lung cancer. Lung cancer 2007; 58 :214-219.

(2) Pan, H, Califano, J, Ponte, JF, et al. Loss of heterozygosity patterns provide fingerprints for genetic heterogeneity in multistep cancer progression of tobacco smoke-induced non-small cell lung cancer. Cancer Res, 2005; 65(5): 1664-1669.

(3) Ozaki, T and Nakagawara, A p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. Cancer Sci, 2005; 96(11): 729-737.

参考論文

なし

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	澁川 紀代子
<p>審査委員長 小川 勝 洋 ㊟</p> <p>審査委員 葛 西 眞 一 ㊟</p> <p>審査委員 長谷部 直 幸 ㊟</p> <p>審査委員 大 崎 能 伸 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>High Incidences of Chromosomal Abnormalities at 1p36 and 9p21 in Early-stage Central Type Squamous Cell Carcinoma and Squamous Dysplasia of Bronchus Detected by Autofluorescence Bronchoscopy</p> <p>(自家蛍光内視鏡で検出される早期中枢性肺癌と異形成病変の 1p36、9p21 領域に関する研究)</p>			
<p>肺癌は現在、癌死亡の主要な原因となっており、早期発見、早期治療が望まれる。肺癌の中でも扁平上皮癌は肺癌全体の 30%を占め、重喫煙者に多く、末梢気管支よりも中枢気管支に発生する頻度が高い。したがって、気管内視鏡検査による早期扁平上皮癌の発見率の向上は早期治療に繋がるものと期待されている。</p> <p>本学位論文提出は自家蛍光内視鏡 (Autofluorescence Bronchoscopy : AFB) により発見された気管異形成病変、早期扁平上皮癌及び手術により摘出した進行扁平上皮癌組織を用いて肺癌の発癌に関する癌抑制遺伝子について検討を行った。</p> <p>方法は、microdissection 法にて組織切片上から異形成細胞及び癌細胞を採取して、DNA を抽出し、p73 の遺伝子座に相当する 1p36 領域及び p16^{INK4A} の遺伝子座に相当する 9p21 領域について microsatellite marker を用いて PCR を行い、loss of</p>			

heterozygosity (LOH)及び microsatellite instability (MSI)解析を行った。また、同じ組織材料を用いて p73, p16^{INK4A}, p53, Ki67 抗体を用いて免疫染色を行い、これらの蛋白の発現を検討した。

その結果、気管異形成病変、早期扁平上皮癌、進行扁平上皮癌のいずれにおいても LOH / MSI は 1p36 領域で 33~62%、9p21 領域で 53~84%の頻度で認められた。一方、免疫染色では、正常気管支粘膜に比較して気管異形成病変、早期扁平上皮癌、進行扁平上皮癌のいずれにおいても p73, p16^{INK4A} の発現が低下しており、p53, Ki-67 の発現が亢進していた。以上の結果から、癌抑制遺伝子の異常は肺癌の発癌過程の早期から起こっていることが明らかになった。この結果は肺癌の発癌過程における早期の biomarker を明らかにした点で重要である。

本学位論文提出者は諮問審査においても当該領域について十分な知識と経験を備えていることが確認された。したがって本審査委員会は、本論文が学位論文にふさわしいものであると判定した。