

〔論文の内容の要旨〕

①論文題目

末梢小型肺腺癌の分子病理学的解析

③指導教員名

深 山 正 久

④専攻名

病因病理学専攻

⑤入進学年

平成 15 年 4 月

⑥学生氏名

高 野 寛 明

<要旨>

肺癌は、世界的に増加傾向にあり、本邦においても 1993 年以降、男性における悪性腫瘍死亡率の第一位、女性においては胃癌に次いで第二位を占めている。その発症者はなお増加しているのが現状である。特に、今回検討を行った肺腺癌は、肺癌の中で最も発症率が高く予後が悪い。その原因は、発見時にすでにリンパ節等に遠隔転移していることが多いためである。これは、肺腺癌が肺の末梢に発症するために、進行するまで自覚症状が少ないことが主な理由である。また腫瘍は進展に伴い、大きさだけでなく密度が高くなるという病理学的特徴がある。そのため、解析が困難であり、発症・進展の分子メカニズムに関してよくわかっていない。したがって、発症因子や悪性化に関わる遺伝子の解析、治療・診断の対象となる分子の同定が社会の要請となっている。肺腺癌の解析が他の癌に比べて進んでいない理由は、組織型が複雑なためである。すなわち、同一病巣内に非浸潤性、および浸潤性の増殖を示す癌細胞が同居するためである。この特徴は、末梢小型肺腺癌においては特に顕著である。病巣の“中心部”では、肺胞構造の虚脱、異型度の高い癌細胞による偽腺管構造の形成が認められる。また、線維芽細胞の増生や、リンパ球の間質浸潤が観察される。しかし、病巣の“辺縁部”においては、非浸潤性の増殖が認められる。すなわち、肺胞構造は維持されているが、異型度の低い癌細胞が、単層に肺胞上皮を置換的に覆っているのが観察される。これは CT 像では、すりガラス様病変 (GGO ; ground glass opacity) として認識されるが、経過観察を行うと、病巣中心部に密度の高い領域が出現し、それが上述した“中心部”であると考えられている。また、すりガラス様の病変を切除すると細気管支

肺胞上皮癌 (BAC ; bronchiole alveolar carcinoma) として見つかることが多く、形態的特徴が“辺縁部”に類似しているが、病巣中心部に浸潤性病変を伴わない。これが、やがて“中心部”を伴う腺癌に発展することが示唆されている。肺腺癌を材料とした既報の研究は、組織材料をバルクで用いており、そのために結果の解釈が難しいという問題を抱えている。これを解決するための手段として、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法が有効であると考えられる。この手法は顕微鏡下で、レーザー光によって細胞を採取する方法であり、薄切組織切片から特定の細胞を採取することが可能となる。これによって、複雑な組織から単一の特徴を示す細胞を採取することが可能である。しかしながら、マイクロアレイと組み合わせて用いる標準プロトコルと言えるものが存在しないことが問題である。また、遺伝子変化を網羅的に解析する手法として cDNA(complementary DNA)マイクロアレイがある。これは、ヒトの mRNA(messenger RNA)と相補的なプローブを、数センチ角のガラスチップ上に配置し、これに蛍光ラベルを施したサンプルを作用させ、ハイブリダイズしたプローブから得られる励起発光の強度によって、遺伝子の発現量を測定する技術である。本研究で使用したものは、Affymetrix 社の供給する GeneChip Human Genome U-133 Plus 2.0 である。これは、1チップに約 5 万 4 千個のプローブが搭載されており、ヒトの全遺伝子および、転写産物を一度に測定することが可能である。本研究においては、これらマイクロダイセクションとマイクロアレイを組み合わせた手法を用いることで、病巣中の“辺縁部”と“中心部”の癌細胞を解析し、発症と進展に関与する遺伝子変化をとらえることを目的とした。

まず、マイクロダイセクションとマイクロアレイ解析を組み合わせた実験系の確立を行った。その結果、凍結組織切片のマイクロアレイ解析に必要とされる品質の cRNA(complementary RNA)を得ることが可能となった。この方法を用いて、末梢小型肺腺癌の解析を行った。材料として、30 症例の肺腺癌凍結組織 (15 症例の末梢小型肺腺癌、15 症例の BAC) を用いた。この内、末梢小型肺腺癌のバルク組織から抽出した total RNA で、 $r \geq 1.2$ ($r = 28S \text{ rRNA} / 18S \text{ rRNA}$)の品質を示した 7 症例を選び出し、それぞれから“正常部”、および“辺縁部”、“中心部”の癌細胞を採取し、マイクロアレイ解析を行った。得られた 18 セットのマイクロアレイデータについて、階層的クラスタリング解析を行ったところ、症例ごとにまとまる傾向があったため、正規化処理を行った。その結果、形態に共通して変動する遺伝子を抽出した。得られた遺伝子プロファイルの確認を行うため、“中心部”においては低酸素応答遺伝子である ceruloplasmin を、“辺縁部”においては WNT4 の *in vivo* での局在を検証した。Ceruloplasmin は、転写開始領域に HRE (hypoxia response element) と呼ばれる配列を持ち、低酸素刺激によって HIF1 が核移行し、転写が制御される遺伝子である。低酸素応答は肺腺癌を含む、多くの癌で報告がなされている。また、WNT4 については、分泌型のリガンドで、細胞膜にある Frizzled / LRP を受容体とし、Wnt シグナルを活性化させる。このシグナルは、個体の発生や、傷の修復、発癌において重要な役割をしていると考えられている。最も解析が進んでいる経路として、 β -catenin / LEF-1 経路 (カノニカル経路) が

知られている。このシグナル伝達と、肺腺癌との関連はよくわかっていない。

正規化したマイクロアレイデータから、各症例の“辺縁部”に共通して発現亢進している 98 遺伝子 (122 プローブ)、および“中心部”に共通して発現亢進している 133 遺伝子 (166 プローブ) を選び出した。“中心部”においては、低酸素応答や浸潤、上皮間葉転換に関与する遺伝子が含まれていた。一方、“辺縁部”では細胞の運動性や増殖に関する遺伝子が含まれていた。そこで、低酸素応答遺伝子の一つである *ceruloplasmin* に対する免疫組織化学染色の結果、“辺縁部”より“中心部”で強い発現が観察された ($P < 0.05$)。これは、マイクロアレイデータにおける mRNA の発現パターンと同じ傾向であった。また、BAC と“辺縁部”を比較すると、“辺縁部”で強い発現が観察された ($P < 0.001$)。一方、“辺縁部”において WNT4 の免疫組織化学染色を行った。しかし、シグナルが得られなかったため、*in situ* ハイブリダイゼーションにて mRNA の局在を検証した。その結果、“中心部”より“辺縁部”にて発現が確認された ($P < 0.001$)。これは、マイクロアレイデータにおける mRNA の発現パターンと同じ傾向であった。また、BAC と“辺縁部”を比較したところ、“辺縁部”にて発現が観察された ($P < 0.05$)。さらに、Wnt シグナルの活性化を検証するため、 β -catenin について免疫組織化学染色を行った。その結果、主に膜型の局在を示したものの、“中心部”と比較して“辺縁部”において細胞質への蓄積、および核においてシグナルが観察された ($P < 0.01$)。さらに、FITC ラベル抗ヒト β -catenin 抗体を用いて、共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、同じ傾向が観察された。BAC と“辺縁部”を比較したところ、両方とも主に膜型の局在であったが、細胞質と核にシグナルが観察された。

Ceruloplasmin の免疫組織化学染色の結果から、肺腺癌の病巣中心部は低酸素状態になっている可能性が示唆された。低酸素応答は、癌細胞において悪性度の高い細胞のセレクションや、上皮間葉転換に必要であるとの報告もあり、形態的に明らかな浸潤が認められない BAC では発現が見られなかったことは矛盾しないと考えられた。このことから悪性度の指標として使用できる可能性が示唆された。さらに、“辺縁部”において WNT4 の *in situ* ハイブリダイゼーション、および β -catenin の免疫組織化学染色の結果から、“辺縁部”において Wnt シグナルが活性化している可能性が考えられた。しかしながら、Wnt シグナルと肺腺癌の関係はわかっておらず、WNT4 との関連は報告が無い。また、WNT4 によって β -catenin が局在変化をしているという確証はなく、今後検討が必要である。

以上より、本解析の結果得られたプロファイルは、癌細胞における遺伝子変化を観察しており、病理学的な特徴を反映したものであると思われた。また、*ceruloplasmin* の結果から、“中心部”で低酸素応答が生じていることが示唆された。また BAC と“辺縁部”で発現量が異なるため、悪性度の指標としての可能性が示唆された。また、“辺縁部”において、WNT4 の mRNA が発現しており、 β -catenin の細胞質および核への移行が観察されたことから、浸潤性の増殖をしていない癌細胞において Wnt シグナルが活性化していることが考えられた。したがって、本研究では、肺腺癌において発症・進展に関与する可能性のある遺伝子変化を見いだすことができたと考えられた。