

論文の内容の要旨

論文題目 TUMOR-ASSOCIATED MOLECULES CRITICAL FOR PROGRESSION OF LUNG ADENOCARCINOMA: A HIGH THROUGH-PUT IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS USING TISSUE MICROARRAY

和訳 肺腺癌の進展において決定的な腫瘍関連分子：
組織アレイを用いたハイスループット解析

指導教員 深山正久教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 16 年 4 月入学
医学博士課程
病因・病理学専攻

氏名 マリア レヤ ルリコ ウマノ ウルビズトンド

小型の肺腺癌は、非浸潤性の肺胞上皮癌の成分と浸潤性の腺癌の成分からなる混合型の組織型を示すものが多い。このような混合型の腺癌は、非浸潤性から浸潤性へと移行する癌の進展過程を形態学的に示しているものと現在解釈されている。しかし非浸潤性の肺胞上皮癌、混合型の肺腺癌、浸潤性の肺腺癌の3者について組織アレイを用いて比較検討した具体的な報告はない。本研究では、非浸潤性の肺胞上皮癌、混合型の肺腺癌のような早期病変を含めた肺腺癌について組織アレイを用いて肺腺癌の進展に関連した分子マーカーの発現異常について解析を行った。

[方法] 組織アレイは、非浸潤性の肺胞上皮癌 5 例、混合型の肺腺癌 20 例、浸

潤性の肺腺癌 20 例から作製した。この組織アレイを用い、肺腺癌の進展に關与する可能性のある 13 の分子マーカーの発現を免疫組織学的に検討した。13 の分子マーカーの内訳は、腫瘍抑制遺伝子の産物 (p53, PTEN, E-cadherin, TSLC1, Smad4)、細胞周期制御因子 (p16, p21, p27, cyclin D1, Cyclin E)、ストレス反応に關係した蛋白 (GRP78, Hsp70, Hsp90) である。免疫染色の結果は、染色強度と陽性細胞の割合を勘案し半定量的にスコア化した。PTEN, TSLC1 については 118 例の肺腺癌切除検体 (非浸潤性肺胞上皮癌 11 例、混合型肺腺癌 21 例、乳頭型腺癌 58 例、充実性 23 例、腺房型 5 例) を用いて通常の切片の免疫染色によって確認を行うとともに、予後因子としての意義についても検討を行った。E-cadherin については、その発現低下を肺腺癌細胞株において確認するとともに、さらにオリゴヌクレオチドアレイ解析、MSP (methylation-specific polymerase chain reaction) 法、SNP アレイ (single nucleotide polymorphism array) 解析により E-cadherin 発現低下の分子機構について検討を行った。

【結果】 肺胞上皮癌と混合型腺癌の比較: 検討した 13 マーカーのうち、Hsp70 の発現は、肺胞上皮癌よりも混合型腺癌において発現が高く (63.2% vs 87.2%, $p = .0145$)、これに対し Smad4 の発現は、肺胞上皮癌に比べ混合型腺癌の非浸潤部において有意に低下していた (64.3% vs 7.9%, $p < .0001$)。浸潤癌では混合型腺癌の浸潤部と比較してさまざまな分子の発現異常が認められた。発現異常

を認めたものは、p16 (77.5% vs 55.6%, $p=0.042$), p27 (37.5% vs 2.8%, $p=0.0002$), cyclin D1 (23.1% vs 5.3%, $p=0.0255$), PTEN (97.5% vs 64%, $p=0.0002$), E-cadherin (97.4% vs 69.4%, $p=0.001$)、TSLC-1 (74.36% vs 26.5%, $p<0.0001$)であった。PTEN と E-cadherin について、通常の切片による解析をさらに行ったところ、PTEN と E-cadherin は、肺胞上皮癌、混合型腺癌、浸潤癌の順に発現が低下していた。組織亜型間の比較では、PTEN と E-cadherin の発現低下は充実型で最も顕著であった。PTEN と E-cadherin の発現低下はともに分化の低下、病期の進行、静脈侵襲の存在と相関していた。PTEN の発現は腫瘍性の増大と逆相関していた。また単変量ならびに多変量解析において E-cadherin の発現は有意な予後因子であることが判明した。E-cadherin の局在パターンを膜、細胞質、陰性の 3 群にわけて解析を行ったところ、細胞質陽性ないし陰性の群は、膜陽性の群に比べて予後不良の傾向を示した。最後に培養細胞を用いて E-cadherin の発現とその制御機構について検討を行った。腺癌細胞 18 株と気管支上皮由来の細胞 (SAEC) について E-cadherin の発現を比較したところ、5 株 (18%) において E-cadherin の発現低下を認めた。E-cadherin の発現を制御しているとされるさまざまな転写因子の発現と E-cadherin の発現の相関を検討したところ、Zeb1 が E-cadherin と逆相関を示していた。また E-cadherin のプロモーター領域のメチル化亢進が肺腺癌細胞の半数において認められ、メチル化亢進は E-cadherin の発

現低下と相関していた。SNP アレイによるコピー数解析では E-cadherin 領域のコピー数に変化はなかった。

[結論と考察] 組織アレイを用いることにより、肺腺癌の進展の過程でおきる分子の発現異常を多数の分子マーカーについて同時に解析することが可能であり、有益であることが示された。細胞株の解析結果から、E-cadherin の発現低下はプロモーターのメチル化と転写因子 Zeb1 の働きによっておきている可能性がある。