

論文の内容の要旨

氏名：中 西 陽 子

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：Semi-Nested リアルタイム RT-PCR 法による微小な肺生検検体からの遺伝子発現定量解析の有用性に関する研究

—非小細胞肺癌におけるサイトケラチン mRNA 発現量による組織型鑑別と予後との関係について—

目的

近年、肺癌の組織型を鑑別することは有効な治療方法を選択する上で必須となっているが、切除不能な進行肺癌患者の場合は、形態学的な解析に適した手術検体を得ることができず、1mm 四方程度と微小な肺生検検体での解析および評価が求められるため、組織型鑑別困難となる場合も多い。肺癌の組織型鑑別マーカーは多数報告されているが、この中でサイトケラチン (CK) は、そのサブタイプの発現の細胞種での違いから様々な癌の鑑別に用いられる。しかし、癌細胞における発現の意義についてはいまだ明らかではない。そこで本研究では、肺癌の組織型鑑別にも有用な CK 蛋白質の mRNA レベルでの発現に着目した。微小な肺生検からの高感度な遺伝子発現定量解析手法の構築を試み、組織型鑑別マーカーとしての可能性 (実験 I) と、組織型特異的な mRNA 高発現の意義 (実験 II) について予後との関係を明らかにすることを目的とした。

対象

対象は日大板橋病院にて 2009 年から 2010 年に肺生検を施行した肺癌 47 例と非悪性 5 例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片で、臨床研究倫理審査委員会の承認を受けて研究対象とした (臨床研究承認番号 RK-121109-9)。

方法

実験 I では、対象の FFPE 切片より、レーザーマイクロダイセクション (LMD) 法で癌細胞を回収し、Total RNA 抽出後、相補的 (c) DNA 合成を行って鋳型とした。mRNA 発現定量解析の高感度化を図るため、これまで微生物検出分野でのみ報告のあった semi-nested quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (snq RT-PCR) 法を初めて FFPE 検体に応用した。本法は、標的遺伝子配列を増幅させる 1 回目の RT-PCR 反応と、2 回目の qRT-PCR 反応で同一のプライマーセットを使用する方法である。標的として CK 6、CK7、CK14、CK18、甲状腺転写因子 (TTF)-1、内因性コントロールに glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。また蛋白発現との相関を検討するため、CK5/6、CK7、CK14、CK18、TTF-1 の免疫組織化学を施行した。

実験 II では、肺腺癌における CK18 高発現の意義についてさらに検討するため、対象症例を CK18 高発現群、低発現群に分けて①カプラン・マイヤー法による予後解析、②非小細胞肺癌で着目されているドライバー変異の解析、③snqRT-PCR 法により上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナル伝達関連遺伝子発現定量解析を行った。統計学的有意性については SPSS Statistics version 20.0 (IBM) を用いて解析した。

結果

本研究で構築した FFPE 検体からの snqRT-PCR 法では、従来法よりも 10^3 倍高感度となる 10^1 コピー/ μ L から測定可能であり、免疫組織化学による蛋白発現の陽性細胞数とも相関した。肺腺癌では CK7、CK18、TTF-1 mRNA が有意に高発現 ($P < 0.05$) であり、CK6、CK14 mRNA は扁平上皮癌に有意に高発現 ($P < 0.05$) であった。特に進行肺腺癌における CK18 mRNA 高発現群 (342.7 日) は、低発現群 (932.9 日) と比較して有意に予後不良であった ($P = 0.01$, log-rank)。CK18 高発現因子については、肺腺癌のドライバー変異との間に有意な相関は認められなかったが、phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide (PI3K) mRNA 発現との間に有意な相関が示された ($P = 0.01$)。また、ras homolog gene family (Rho) A mRNA 発現との間に単相関の関係が示された。

考察

肺癌の組織型鑑別は治療方針決定のため重要となっている。通常、鑑別困難な場合が多い微小な肺生検からも、snq RT-PCR 法を用いることで肺癌の組織型特異的 mRNA 発現量による鑑別の可能性が示された。特に、進行肺腺癌における CK18 mRNA の高発現は予後因子となることを初めて示した。前癌病変では

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox) 1 による CK18 蛋白質の蓄積が癌への進展に関与している可能性が報告されている。本研究において、CK18 mRNA 高発現因子について検討した結果、PI3K mRNA 発現との相関、RhoA mRNA 発現との単相関が示された。Nox 1 のサブユニットに RhoファミリーG 蛋白質が含まれることから、前癌病変の進展だけではなく、進行肺腺癌においても RhoA の高発現に示唆される Nox1 の亢進が CK18 の高発現を誘導し悪性化に関与している可能性も考えられた。また今回、細胞膜リン脂質のリン酸化に関与する PI3K が CK18 mRNA 高発現に強く関与していたことから、CK18 の高発現は抗癌剤の核への浸透性を阻害する薬剤耐性因子として悪性化に寄与している可能性が示唆された。

結語

本研究により、sqRT-PCR 法は、微小な肺生検から高感度に複数の遺伝子発現定量解析を可能とし、微小な肺生検における肺癌組織型鑑別への有用性が示された。さらに進行肺腺癌における CK18 mRNA 高発現は抗癌剤への耐性化に関与して予後因子となっている可能性が示唆された。