

## 論文審査の結果の要旨

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—

審査委員：(主査) 教授 石原寿光

(副査) 教授 榎島誠 教授 國分眞一郎

教授 高橋悟

近年、新たに開発が進んでいる非小細胞肺癌に対する分子標的薬剤の適応決定には、それらの薬剤のターゲットとなる変異分子を発現する細胞が主に腺癌であることから、扁平上皮癌と非扁平上皮癌の鑑別が非常に重要である。そして、手術適応のない進行肺癌患者でのこの鑑別は、小さな肺生検標本に頼らざるを得ない。そこで、中西陽子氏は、初めて、ホルマリン固定パラフィン包埋切片からレーザーマイクロダ イセクション法により得られる微小検体に Semi-Nested 定量 RT-PCR (SnqRT-PCR) 法を応用した。この方法は、標的転写産物の遺伝子配列を定量する際に、あらかじめ RT-PCR を行い、続いて同一の primer で定量 PCR を行うものである。

第一に、SnqRT-PCR により得られたサイトケラチン (CK) 5/6, CK7, CK14, CK18 の mRNA 発現量が、免疫組織化学染色法により得られたそれらの産物である蛋白の陽性細胞割合と相関することを示し、この方法が妥当なものであることを、検証した。また、本方法を用いることにより、従来法にくらべ、1000 分の 1 のコピー数の転写産物を測定可能であることを見出した。次に、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、正常組織の生検微小検体から、SnqRT-PCR 法により CK6, CK7, CK14, CK18、甲状腺転写因子 (TTF) -1 遺伝子の転写産物を定量し、肺腺癌において、CK7, CK18, TTF-1 mRNA の発現が高く、肺扁平上皮癌では、CK6, CK14 の発現が高いことを見出した。このうち、肺腺癌においては CK18 mRNA 発現量が、また肺扁平上皮癌においては、CK6 mRNA 発現量が、予後と相関を示すことを見出した。

さらに、肺腺癌のドライバー遺伝子として重要である EGFR 遺伝子変異、KRAS 遺伝子変異、BRAF 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子の有無と CK18 mRNA の発現量との相関を解析した。それぞれの遺伝子変異の有無については、生検検体から得られた genomic DNA から direct sequence により検討した。また、EGFR シグナル伝達の下流で発現する遺伝子の転写産物の定量を SnqRT-PCR 法により行った。その結果、いずれの遺伝子異常についても、その有無により CK18 mRNA の発現量に違いが生じるということは観察されなかった。しかし、EGFR の下流で活性化されると考えられる PI3K の mRNA 発現量は、CK18 mRNA の発現量が高い群で有意に増加していることを見出された。

これらの知見は、増え続ける肺癌患者の診断・治療法選択のための重要な方法論を提案するものであり、さらに、将来の個別化治療の実現のための重要な情報を提供するものである。

よって本論文は、博士（医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

平成27年 9月 9日