

非小細胞肺癌の生長にともなう DNA ploidy の変化に関する研究

苗村建慈、前倉知典（医学教育研究センター・内科学）、廣瀬真理、後藤渉子、澤谷友香理（医学教育研究センター・病理学）。

【緒言】

Vogelstein B らは、大腸癌の発生において、多段階発生説を提唱したが、どのような癌でも、癌の発生や進展には、遺伝子の変異、癌遺伝子の活性化、癌抑制遺伝子の欠損、転位や欠損などの染色体変化などの多段階の遺伝子や染色体の変化を経て起こるものと考えられている。Vogelstein B らの、大腸癌における多段階発生説では、染色体の変化として、DNA ploidy の異倍体化が癌発生における一つのステップとして挙げられている。肺癌の発生・進展においては、癌の進行とともに、DNA ploidy の異倍体化がみとめられるが、肺癌の発生や進展のどのような段階で、DNA ploidy の異倍体化が起こるのか、また、他の遺伝子の変化と関連して起こるものか、詳細は明らかにされていない。

【目的】

本研究では、肺癌の生長において、DNA ploidy の異倍体化がどのようにして起こり、肺癌の進展にどのように関与しているのか、非小細胞肺癌である肺腺癌と肺扁平上皮癌を対象に、DNA ploidy の異倍体化に、癌抑制遺伝子 p53 の欠損、テロメア長が関連しているかを検討する。

具体的には、癌細胞の P53 遺伝子は免疫抗体法を用いて標識、テロメアについては in situ hybridization 法で標識し、フローサイトメーターを用いて、癌細胞の DNA ploidy とともに、これらの標識した p53 遺伝子産物、テロメアを同時に測定する。これにより、DNA ploidy と DNA ploidy によって示される癌細胞のクローンの変化と、テロメア長、癌抑制遺伝子である P53 遺伝子の変異、との関連が判定できる。

使用する研究手段は、すべて、確立され汎用されている方法と機器で行うことができる。フローサイトメーターについては、東洋医学研究所の研究機器（免疫学教室）を使用する。

【検体と方法】

（検体）

本大学附属病院内で診断され、本病院または他院で手術摘除され、同意の得られている症例を主体とした、ホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック標本（肺腺癌、肺扁平上皮癌の各 25 例）を用いて行う。

（方法）

①肺癌のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック標本から、脱パラフィンを行い、実体顕微鏡下に腫瘍組織を分け取る。腫瘍組織から、蛋白分解酵素による化学的分解とホモジナイザーによる物理的分解により、単離癌細胞を作成する。

②上皮細胞を認識するサイトケラチンに対する抗体を癌細胞に反応させて標識し、癌細胞のみを選別してサンプルとする。

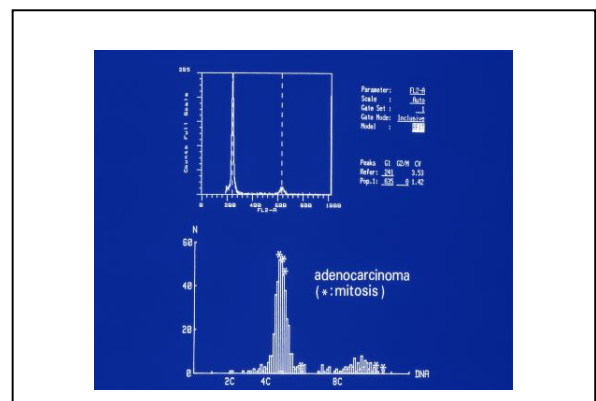
③単離した癌細胞を、上皮細胞の指標であるサイ

トケラチンに対する抗体により、マイクロ・ビーズを用いて選別し、上皮細胞である癌細胞について、PI による核染色、FITC 標識の p53 抗体による免疫染色、テロメアに対する Cy5 標識 PNA プローブによる in situ hybridization、の三重蛍光染色を行い、フローサイトメーターを用いて、DNA ploidy の変化と癌抑制遺伝子 p53 の変異やテロメア長の関係について、解析する。

【研究経過】

1) 癌組織を分離し、細胞単離を行い、PI(Propidium Iodide)による核染色を施し、核 DNA 量を測定する段階まで、施行可能である。

図 1. (肺腺癌の DNA ploidy: Flow cytometry (上) と顕微蛍光測光法 (下) との比較)



Flow cytometry (上のヒストグラム) では、非系上皮細胞を除外しないと、正確な癌細胞（上皮細胞）の DNA ploidy が測定できないことがある。

2) 癌細胞のみを測定するためには、癌細胞を蛍光標識して他の標識された蛍光と同時に測定するか、癌細胞を選別収集することが必要である。測定すべき蛍光の種類をできる限り少なくするため、マイクロ・ビーズ標識の抗ケラチン抗体で癌細胞を標識する方法を採用し、検討を行っている。

3) ホルマリン固定の検体では、癌抑制遺伝子 p53 産物の免疫染色は、PI による核染色と両立する染色条件を確立するため、さらに予備実験が必要である。

4) テロメアを蛍光標識するための in situ hybridization については、安定した結果を得るために、反応条件などについて、さらに、数回の予備実験の実施が必要と考えられる。

5) 参考までに、単離した癌細胞に核染色を行い顕微蛍光測光法により DNA 量を測定した結果については、以下に簡略して記述する。

①肺腺癌 14 例について、DNA ploidy を検索した結果、Diploid stem line の癌細胞集団のみで構成される肺腺癌 (Diploid tumor) は、腫瘍径

が1 cm 以下、1 cm～2 cm 以下、2 cm～3 cm 以下と大きくなると、4 例中 2 例(50%)、6 例中 2 例(33%)、4 例中 0 例(0%)と減少した。

- ②また、Aneuploid stem line の癌細胞集団が併存する症例は、腫瘍径が1 cm 以下、1 cm～2 cm 以下、2 cm～3 cm 以下と大きくなるにともない、4 例中 1 例(25%)、6 例中 4 例(67%)、4 例中 4 例(100%)と増加した。

【論文及び学会発表】
現時点では、なし。