

氏名(本籍)	臺 勇 一 (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2406号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Application of <i>p53</i> and <i>K-ras</i> Gene Mutation Patterns for Cytological Diagnosis of Recurrent Lung Carcinomas. ...Combined Analysis with Microdissection and PCR-SSCP... (<i>P53</i> 及び <i>K-ras</i> 遺伝子変異パターンの肺癌再発細胞診断への応用—マイクロダイセクション法とPCR-SSCPの組み合わせ分析—)
主査	筑波大学教授 医学博士 三輪 正直
副査	筑波大学教授 医学博士 大塚 藤 男
副査	筑波大学助教授 医学博士 西田 正 人
副査	筑波大学助教授 医学博士 大塚 盛 男
副査	筑波大学講師 医学博士 鳥居 徹

論文の内容の要旨

(目的)

悪性腫瘍の存在診断あるいは悪性度診断は病理標本を用いて行われるが、近年ホルマリン固定組織標本から採取したDNAを用いた遺伝子異常解析による補助診断法(遺伝子診断法)が数多く報告されている。一方、細胞診断は癌のスクリーニングや再発の早期発見などに広く応用されている。細胞診標本はアルコールで固定され、核酸の保存が良く、薄切されることがないので核内DNAが全量採取できる利点がある。そこで肺癌切除後再発時の胸水などの細胞診材料を用いて、非小細胞肺癌で変異の報告が多い癌遺伝子*K-ras*(約30%)、癌抑制遺伝子*p53*(約50%)の異常解析をがん再発の早期診断法に応用するための検討を行った。

(材料と方法)

1. 細胞診標本でのPCRに必要な細胞数の検討

細胞診材料でPCR解析の可能な最小細胞数を決定するために、肺癌捺印細胞診標本及び不活化肝癌細胞株PH5Tを用いて検討した。

2. 肺癌切除標本でのP53蛋白免疫染色と遺伝子異常解析

1988年から1996年までの筑波大学附属病院肺癌切除例で術後悪性胸水が確認された非小細胞癌14症例16検体(腺癌9例、扁平上皮癌6例、腺扁平上皮癌1例)の切除標本ホルマリン固定材料、術後細胞診標本を用いた。はじめに切除されたホルマリン固定薄切標本についてP53蛋白の免疫染色を行った。次いでそれぞれの薄切標本をHE染色し、腫瘍部分と正常部分の組織を掻き取りproteinase K処理によりDNAを抽出した。代表的な癌抑制遺伝子である*p53*遺伝子の変異をexon 4, 5, 6, 7, 8についてPCR-SSCP法を用いて検出し、肺癌の代表的癌遺伝子である*K-ras*遺伝子のexon1についても同様に変異の検出を行った。

3. 細胞診標本での遺伝子異常解析

異常を発見した症例について、これらの変異の検出を細胞診標本を用いて同様に試みた。マイクロマニピュ

レーター法及びLCM装置 (LCM, laser captured microdissection, ARCTRUS, CA) を用い、1個から100個の細胞を細胞診標本から採取し、ポイリング法などでDNAを抽出したのち、精製せずにそのままPCR-SSCP法での変異の検出を行った。PCR-SSCP法で検出された異常バンドについては、そこからDNAを抽出し、サイクルシーケンス法による核酸配列決定を行った。

(結果)

1. 細胞診標本でのPCRに必要な細胞数の検討

細胞診標本には、異常細胞の他に正常細胞も多く存在し、標本全体からDNAを抽出するとその混入が避けられない。より多くの異常細胞のみを選択的に採取するためにはマイクロマニピュレーター法および組織細胞マイクロダイセクション法が用いられる。そこでまず捺印細胞診標本から腫瘍細胞を掻き取り、どのくらいの数の細胞から採取したDNAでPCRをかけることが可能かを検討した。その結果必要な細胞数は10個程度と推測された。この際、細胞数10個でPCRが可能なことに加え、細胞数1個でもバンドが検出される場合があることも分かった。

2. 肺癌切除標本でのP53蛋白免疫染色と遺伝子異常解析

P53蛋白の免疫染色を行うと肺癌切除15症例17検体中の13検体でP53蛋白の免疫染色が陽性であった。PCR-SSCP法による解析で*p53*遺伝子exonの変異は6例(exon 4, 5, 7それぞれ1, 1, 4例)、*K-ras*遺伝子exonの変異はexon1で1例で検出された。P53蛋白免疫染色の結果と*p53*遺伝子の変異との間には相関はなかった。

3. 細胞診標本での遺伝子異常解析

遺伝子異常の確認された症例について、術後再発時の細胞診標本から腫瘍細胞と判定された異型細胞群をマイクロマニピュレーター法、あるいは組織細胞マイクロダイセクション法を用いて採取し、同様な方法で*p53*遺伝子と*K-ras*遺伝子についてその異常を解析した。その結果、7例中5例で細胞診標本内の異型細胞から切除された腫瘍と同様な遺伝子の変異が見つかり、癌の再発が確認できた。検出には細胞数1個で可能だったものが2例あり、それらでは正常なアレルが欠失し、同遺伝子部位にLOHを来していることも分かった。配列決定では4つ検出された*p53*遺伝子の異常バンドからはそれぞれミスセンス変異が、1つ検出された。*K-ras*の異常バンドからはサイレント変異とイントロン内の2ヵ所の変異が見つかった。

(考察)

切除組織材料を用いた検討で発見された遺伝子異常を細胞診標本で検出できなかった例については重複癌(2次癌)であった可能性、また反応性中皮細胞などを採取した可能性、さらには癌細胞が複数の異なるクローンから成り立っていた可能性などが考えられた。作成後10年を経過した細胞診標本を用いても遺伝子異常の解析可能なことがわかり、また細胞数1個でもPCR法での検索が可能であることが判明した。マイクロダイセクション法を用いることで正常細胞の混入の多い細胞診標本から正確に異常細胞を採取でき、分子病理学的診断を効率よく行えることが確認できた。マイクロダイセクション法とPCR-SSCP法を組み合わせることで、術後胸水細胞診などから再発の早期診断が可能になることが示された。またこの方法論を応用すれば、肺癌スクリーニング中に出現するclass IIIとしか判定できない細胞についても遺伝子異常の解析が可能となり、形態学的診断の補助診断として肺癌の早期発見に有用であると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

癌のスクリーニングや再発の早期発見などに広く応用されている細胞診断においては、形態的な診断法に加え、近年遺伝子異常解析による補助診断法(遺伝子診断法)が注目されてきた。本論文は、非小細胞肺癌切除後再発

時の胸水などの細胞診材料を用いて、癌遺伝子*K-ras*と癌抑制遺伝子*p53*の異常解析を行い、がん再発の早期診断法としての可能性を検討したものである。

その結果、臨床的に再発が確認された16例中7例では、切除された腫瘍で*K-ras*又は*p53*遺伝子変異が検出されており、その内の5例で再発時の胸水細胞診標本からもとの腫瘍と同一の遺伝子変異が検出できている。特に、正常細胞と癌細胞が混ざった場合にも、マイクロダイセクション法を併用することにより遺伝子変化の検出感度は、著しく向上することを示している。今後、術後胸水細胞診からの再発の早期診断や、異形細胞についての遺伝子異常の解析により、形態学的診断の補助として肺癌の早期発見にも有用になることが期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。