

氏 名（本籍）	いし やま ただ し 石 山 直 史（神奈川県）		
学 位 の 種 類	博 士（医 学）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4411 号		
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	ヒト肺腺癌の悪性化に関与する遺伝子の分子病理学的解析		
主 査	筑波大学教授	医学博士	加 藤 光 保
副 査	筑波大学教授	医学博士	大 塚 盛 男
副 査	筑波大学助教授	医学博士	鬼 塚 正 孝
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	石 川 成 美

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

目的：

上皮内肺腺癌（type A）と初期浸潤肺腺癌（type C）の発現遺伝子を比較し、初期浸潤癌で高発現している遺伝子群を同定し、上皮内癌から浸潤癌への悪性化に関与する分子機構を明らかにすることを目的とした。

対象と方法：

1997 年から 2005 年までの間に切除された筑波大学付属病院と国立がんセンター中央病院の肺腺癌症例を対象として解析を行った。また、サブトラクションと遺伝子発現定量解析では合計 20 症例（上皮内癌；type A と B：11 例，初期浸潤癌；type C：9 例）の凍結材料を用いた。*in situ* hybridization と臨床病理学的検討には、adenocarcinoma mixed subtype with BAC component と診断された 56 症例の 10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。まず、典型的な組織像を示す上皮内癌（type A）と初期肺腺癌（type C）の凍結材料を症例 1 例ずつ用いて、それぞれの組織から組織マイクロダイセクション法により腫瘍細胞のみを分取した。そして Total RNA を抽出後、TALPAT 法により RNA の増幅を行った。次に、増幅した RNA から合成した cDNA を用いて Suppression Subtractive Hybridization (SSH) を行い、初期浸潤癌で高発現している遺伝子の cDNA ライブラリーを作製した。得られたサブトラクションライブラリーから無作為に 1056 個のクローンを選択し、Differential Screening (DS) 法および Virtual reverse northern (VRN) 法によって、上皮内癌と比較して初期肺腺癌（type C）で高発現しているクローンを半定量的に選択した。そして、シークエンシングと Blast search により遺伝子配列を特定した。次に、同定した遺伝子群から、キメラ遺伝子、GAPDH 発現比 20% 以下の遺伝子、既知の癌関連遺伝子、代謝関連遺伝子を除外した。残った遺伝子について、腺癌 10 症例（type A+B；5 症例，type C；5 症例）を用いて、各遺伝子の *in situ* hybridization 法による組織中での発現分布を解析した。その結果、上皮内癌（type A+B）と比較して初期浸潤癌（Type C）で高頻度に発現が認められ、かつ正常肺組織（Ⅰ型およびⅡ型肺胞上皮細胞や血管内皮細胞）と比較して、腫瘍組織で特に陽性所見を認める遺伝子を選択した。選択した遺伝子について、正常

肺5例と小型肺腺癌28症例を対象に、定量PCR法による発現解析を行い、上皮内癌（type A, B）と比較して、初期浸潤癌（type C）で有意に高発現している遺伝子をさらに絞り込んだ。その結果、選択された遺伝子について、adenocarcinoma mixed subtype with BAC componentと診断された肺腺癌56症例を対象として、*in situ* hybridization法を用いて、遺伝子発現と臨床病理学的因子との相関を検証した。

また、SSH法により得られた1対のtype A, type Cでそれぞれ高発現する遺伝子のcDNAライブラリーを用いて、Human Whole Genome Bioarrays (Amersham Bioscience)による発現解析を行った。これにより、Type Aと比較してType Cでシグナル値の高い遺伝子を選択し、SSH-DS-VRN法に同定された遺伝子群との比較を行った。

#### 結果：

type Cに高発現する遺伝子（サブトラクション）ライブラリーから無作為に選択された1056個のクローンから、Differential Screening法およびVirtual reverse northern法により、上皮内癌と比較して初期肺腺癌（type C）でより高発現しているクローンが62個得られた。この62クローンから、キメラ遺伝子、GAPDH発現比20%以下の遺伝子、既知の癌関連・代謝関連遺伝子を除外したところ、5遺伝子（TncRNA, OCIAD2, ANXA2, TMED4, LGALS4）が残った。

さらに、肺腺癌10症例を用いて組織中での発現分布を解析したところ、OCIAD2とLGALS4のみがtype Aと比較してtype Cの腫瘍部で、特徴的に発現していることがわかった。このうちOCIAD2のみが上皮内癌（type A, B）と比較して、初期浸潤癌（type C）で有意に（ $p=0.026$ ）高発現していることが定量PCR法により明らかになった。さらに、adenocarcinoma mixed subtype with BAC componentと診断された肺腺癌56症例を対象として、OCIAD2発現と臨床病理学的因子との相関を検証した。その結果、OCIAD2発現を伴う症例は、発現を伴わない症例と比較して予後良好であり、リンパ管浸潤、血管浸潤、リンパ節転移を起こさない傾向にあることが分かった。

一方、SSHライブラリーをcDNA microarrayを用いてスクリーニングし、type C/Aのシグナル比が1.0倍以上のものを選択した結果、30,208遺伝子が該当した。この中には、SSH-DS-VRN法により選択された23遺伝子のうち21遺伝子（91.3%）が含まれていた。

#### 考察：

正常肺組織や上皮内癌と比較して初期浸潤癌で高発現している遺伝子としてOCIA domain containing 2 (OCIAD2)を同定した。肺腺癌（adenocarcinoma mixed subtype with BAC）において、OCIAD2発現は、予後良好、リンパ管浸潤・血管浸潤・リンパ節転移の無い症例で有意に認められた。このことから、OCIAD2はBACを伴う腺癌から予後不良の集団と予後良好の集団を識別するマーカーの候補と考えられる。また、subtraction libraryのスクリーニング法としてcDNA microarrayを用いる方法は、differential screeningと比較して短時間で同程度のスクリーニング結果が期待できることが分かった。

#### 結論：

1. OCIAD2遺伝子は肺腺癌の上皮内癌から初期浸潤がんへ悪性化する過程で発現する。
2. OCIAD2遺伝子の発現はadenocarcinoma mixed subtype with BAC component症例において、予後良好、リンパ管浸潤なし・血管浸潤なし・リンパ節転移なし、と相関する。
3. OCIAD2遺伝子の発現は、adenocarcinoma mixed subtype with BAC component症例に含まれる予後不良の集団と予後良好の集団を識別するマーカーであることが示唆された。
4. Suppression subtractive hybridization法により得られた差次的発現遺伝子ライブラリーのスクリーニン

グ手法として、従来の differential screening 法と比較して、cDNA microarray を用いる手法は時間・量ともに優れており、特に差次的遺伝子群に含まれる低発現遺伝子のスクリーニングに有用であることが示唆された。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、組織マイクロダイセクション法によって分取した癌細胞の RNA を材料に用いて、Suppression Subtractive Hybridization 法や Differential Screening 法などによって遺伝子の発現レベルを解析し、肺胞置換型増殖を示す上皮内肺腺癌に比べ、初期浸潤肺腺癌では、OCIAD2 の発現レベルが亢進していることを示した。また、肺腺癌症例 56 例を対象として臨床病理学的解析を加え、OCAID2 を発現している症例は発現陰性の症例に比べ予後が良いことも示している。本研究は、限られた臨床材料からの RNA を増幅して定量的に解析できる新しい解析法を用い、肺腺癌の進展に伴って発現が亢進する遺伝子を新規に同定している点で、オリジナリティーの高い成果をあげていると評価される。今後は、このような方法で同定した遺伝子産物の機能の解析も加えていくことによって、肺癌の進展の機序の解明に大きく貢献すると期待される。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。