

# 非小細胞肺癌における血清 DNA を用いた マイクロサテライト変異の検討

花岡孝臣<sup>1)\*</sup> 青木孝學<sup>1)</sup> 牧内明子<sup>1)</sup>  
沼波宏樹<sup>1)</sup> 近藤竜一<sup>1)</sup> 高砂敬一郎<sup>1)</sup>  
町田恵美<sup>1)</sup> 宮澤正久<sup>1)</sup> 金子和彦<sup>1)</sup>  
矢満田 健<sup>1)</sup> 羽生田正行<sup>1)</sup> 藤森 実<sup>1)</sup>  
福嶋義光<sup>2)</sup> 天野 純<sup>1)</sup>  
1) 信州大学医学部第2外科学教室  
2) 信州大学医学部衛生学教室

## Infrequent Detection of Microsatellite Alterations in Serum DNA of Non-Small Cell Lung Cancer Patients

Takaomi HANAOKA<sup>1)</sup>, Takahisa AOKI<sup>1)</sup>, Akiko MAKIUCHI<sup>1)</sup>  
Hiroki NUMANAMI<sup>1)</sup>, Ryoichi KONDO<sup>1)</sup>, Kei-ichiro TAKASUNA<sup>1)</sup>  
Emi MACHIDA<sup>1)</sup>, Masahisa MIYAZAWA<sup>1)</sup>, Kazuhiko KANEKO<sup>1)</sup>  
Takeshi YAMANDA<sup>1)</sup>, Masayuki HANIUDA<sup>1)</sup> Minoru FUJIMORI<sup>1)</sup>  
Yoshimitsu FUKUSHIMA<sup>2)</sup> and Jun AMANO<sup>1)</sup>

1) *Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine*

2) *Department of Hygiene and Genetics, Shinshu University School of Medicine*

Recent studies indicate that soluble tumor DNA and microsatellite alterations have been identified in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. There is a possibility that these might be useful for preoperative diagnosis, deciding on treatment strategy and postoperative evaluation as a new biomarker to detect genetic alterations originating from primary cancerous lesions in the peripheral blood of non-small cell lung cancer patients. The purpose of this study was to determine whether genetic alterations in resected cancer tissue could be identified in the preoperative peripheral serum by microsatellite DNA analysis. Our preliminary data, however, showed that no microsatellite alterations in tumor DNA could be found in the preoperative serum DNA of non-small cell lung cancer patients. *Shinshu Med J 47: 489-495, 1999*

(Received for publication June 14, 1999; accepted in revised form July 12, 1999)

**Key words** : non-small cell lung cancer, serum DNA, microsatellite DNA analysis, PCR, LOH

非小細胞肺癌, 血清 DNA, マイクロサテライト DNA 分析, ポリメラーゼ連鎖反応, ヘテロ接合性の消失

### I はじめに

肺癌を含む悪性腫瘍は、遺伝子異常の蓄積によって多段階的に発生進展すること(癌の多段階発癌説)が明らかにされてきた<sup>1,2)</sup>。肺癌における遺伝子異常に関

しては、染色体 3p, 9q, 13q, 17p 領域のヘテロ接合性の消失 (LOH: loss of heterozygosity) や, Rb, p16, p53, K-ras 遺伝子の異常が報告されている<sup>3)</sup>。これらの肺癌の遺伝子異常を、術前に明らかにすることができれば、肺癌の発見や生物学的悪性度の分子生物学的指標として臨床的に役立つことが期待される。

従来から、担癌患者血清中に、血清 DNA 総量が増

\* 別刷請求先: 花岡 孝臣 〒390-8621  
松本市旭 3-1-1 信州大学医学部第2外科

加しており<sup>3)</sup>, 癌細胞由来の遊離 DNA を含んでいることが示唆されていた<sup>4)</sup>。肺癌担癌状態においても血清 DNA 総量は増加し, 血中 CEA (carcinoembryonic antigen) 濃度と正の相関関係を示すことから, 血清 DNA 量は, 腫瘍マーカーとしての意義があることが指摘されていた<sup>5)</sup>。最近になり, 肺小細胞癌患者の血清 DNA 中に, 正常細胞にはない癌と同一のマイクロサテライト変異を検出しようとの報告<sup>6)</sup>がなされた。マイクロサテライトとは, ヒトゲノム DNA 全塩基配列の約25%を占め散在する short tandem repeat (STR) 領域<sup>7)</sup>のうち, (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GTAT)<sub>n</sub>などの1塩基から数塩基単位の配列が, 数回から数十回繰り返された部分であり, その長さは, 非常に多型性に富んでいる<sup>8)</sup>。この領域の PCR (DNA polymerase chain reaction) により, 注目するゲノム DNA 領域の癌化に伴う変化を, 比較的簡便に検出できる利点を有している<sup>9)10)</sup>。その後, 手術症例の大部分をなす非小細胞肺癌についても, 一部の症例に血清 DNA を用いた癌の遺伝子診断が可能であるとする報告<sup>11)</sup>がなされたことから, 末梢血を検体とした遺伝子検査で, 肺癌の診断ができる可能性がでてきたのである。

今回我々は, 非小細胞肺癌手術症例において, マイクロサテライト DNA 分析法による LOH や RER (replication error) の検索で, 肺癌組織と同一のマイクロサテライト変異を, 術前の末梢血血清 DNA を用いて検出しようか否かを検討したので報告する。

## II 材料と方法

### A 材料

1995年10月から1997年3月までに, インフォームド・コンセントの後, 当科で切除された原発性肺癌手術症例57例(扁平上皮癌23例, 腺癌33例, 大細胞癌1例)の術前血清と, 摘出標本の癌部組織, および非癌部肺組織を材料とした。非癌部肺組織は, 摘出標本内の同一肺葉内で癌組織から最も遠い部分を切除し, -80°Cで凍結保存した。術前血清は, 肘静脈より7ml採血し, 4°Cで静置後, 3,000回転, 15分, 4°Cで遠沈し, その最上層を2ml分取し, -80°Cで凍結保存した。

### B 方法

#### 1 ゲノム DNA の調整<sup>12)</sup>

凍結組織標本を, 液体窒素下に乳鉢ですりつぶし粉末化した後, トリス緩衝液に溶解した。プロテナーズ K 処理, フェノール/クロロホルムにて除蛋白後, エタノール沈殿で DNA を精製回収した。回収した

DNA は, 0.8%アガロースゲル電気泳動にて確認定量し, 100ng/μl の濃度に調整した。

#### 2 末梢血血清 DNA の調整<sup>9)</sup>

凍結保存された血清 1ml から, QIAamp Blood Kit (QIAGEN) を用いて末梢血血清 DNA を精製した。

#### 3 PCR

マイクロサテライトは, 肺癌において高頻度の LOH が報告されている次の4つの STR 領域を指標とした(括弧内は, Genome Data Base の accession number を示す)。

①染色体3p12の D3S1284 [Z16804]<sup>13)14)</sup>, ②染色体3p21.1の FHIT (fragile histidine triad) 遺伝子内にある D3S1300 [Z17006]<sup>13)14)</sup>, ③染色体17p13.1の p53 遺伝子近傍にある HSCARP 53L [X61505]<sup>15)</sup>, ④肺小細胞癌や頭頸部扁平上皮癌において血清 DNA 中に癌組織由来のマイクロサテライト変異の存在が報告された染色体21q22.2の D21S1245 [L16332]<sup>9)16)</sup>。

PCR に用いたプライマーは, ① forward: 5'-GCCTTGGGGGTTAAATACTCT-3', reverse: 5'-GGAATTACAGGCCACTGCTC-3', ② forward: 5'-GCTCACATTCTAGTCAGCCT-3', reverse: 5'-CATGACGTTCCTTTGTAGTGT-3', ③ forward: 5'-AATTCCCCTGCCCCTCTT-3', reverse: 5'-GATACTATTCAGCCCCGAGGT-3', ④ forward: 5'-GTCAGTATTACCCTGTTACCA-3', reverse: 5'-GTTGAGGATTTTGCATCAGT-3'であった。

各プライマーの5'末端を, Texas-Red Labelling Kit (Amersham) で, 蛍光標識した。

PCR 反応は, ゲノム DNA 100ng, 上記プライマー, PCR premixture kit (サフディー・テクノロジー) からなる50μl の反応液で, DNA MiniCycler (MJ RESEARCH) により, 95°C 1分・55°C 1分・70°C 1分を35サイクル行った。

#### 4 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

各 PCR 産物を, Hitachi SQ5500 DNA sequencer (日立) により, 5%ポリアクリルアミド/6M 尿素/50%ホルムアミド変性ゲル上で電気泳動し, 同一症例の非癌部肺組織を比較対照として, LOH と Shift を検索した。バンドの信号強度が50%以上減少した場合を LOH 陽性と判定し, 非癌部肺組織とは長さの異なるバンドが出現した場合を Shift (RER 陽性の可能性あり) と判定した。腫瘍本体のゲノム DNA が LOH 陽性または Shift 陽性であった症例の血清 DNA に関しては, さらに3回以上の PCR と電気泳動を行

表 1 非小細胞肺癌におけるマイクロサテライト分析

扁平上皮癌

| ID | 年齢 | 性別 | 組織型              | TNM 分類 | 病理病期 | D3S1284 | D3S1300 | HSCARP53L | D21S1245 | Brinkman | 術 後 転 帰           |
|----|----|----|------------------|--------|------|---------|---------|-----------|----------|----------|-------------------|
|    |    |    |                  |        |      | 腫瘍/血清   | 腫瘍/血清   | 腫瘍/血清     | 腫瘍/血清    |          |                   |
| 1  | 53 | 男  | 中分化型             | 200    | IB   | R/      | R/      | -/        | -/       | 500      | 33ヵ月担癌生存中 (脳転移)   |
| 2  | 69 | 男  | 中分化型             | 100    | IA   | LOH/R   | -/      | LOH/R     | -/       | 980      | 40ヵ月無再発生存中        |
| 3  | 37 | 男  | 中分化型             | 420    | IIIB | -/      | R/      | R/        | -/       | 680      | 33ヵ月癌死            |
| 4  | 66 | 男  | 中分化型             | 300    | IIIA | LOH/R   | -/      | R/        | -/       | 1750     | 4ヵ月癌死             |
| 5  | 73 | 男  | 中分化型             | 100    | IA   | R/      | -/      | R/        | -/       | 500      | 25ヵ月他病死 (呼吸不全)    |
| 6  | 54 | 男  | 高分化型             | 220    | IIIA | R/      | -/      | R/        | -/       | 1700     | 15ヵ月生存            |
| 7  | 70 | 男  | 中分化型             | 100    | IA   | LOH/R   | -/      | LOH/R     | -/       | 400      | 27ヵ月無再発生存中        |
| 8  | 76 | 男  | 中分化型             | 100    | IA   | LOH/R   | LOH/R   | R/        | -/       | 2320     | 38ヵ月無再発生存中        |
| 9  | 76 | 男  | 中分化型<br>(同時性多発癌) | 300    | IIB  | R/      | LOH/R   | LOH/R     | -/       | 1120     | 25ヵ月無再発生存中        |
| 10 | 79 | 女  | 低分化型             | 100    | IA   | LOH/R   | Shift/R | R/        | R/       | 890      | 25ヵ月無再発生存中        |
| 11 | 74 | 男  | 中分化型             | 201    | IV   | LOH/R   | -/      | R/        | -/       | 不詳       | 3ヵ月癌死             |
| 12 | 74 | 男  | 中分化型             | 200    | IB   | -/      | -/      | R/        | -/       | 1000     | 25ヵ月無再発生存中        |
| 13 | 58 | 女  | 中分化型             | 200    | IB   | R/      | R/      | R/        | -/       | 1050     | 29ヵ月無再発生存中        |
| 14 | 78 | 男  | 中分化型             | 100    | IA   | LOH/R   | R/      | LOH/R     | -/       | 不詳       | 18ヵ月他病死 (心不全)     |
| 15 | 68 | 男  | 中分化型             | 300    | IIB  | R/      | -/      | R/        | -/       | 1470     | 31ヵ月無再発生存中        |
| 16 | 73 | 男  | 高+中分化型           | 401    | IV   | -/      | -/      | -/        | -/       | 765      | 不詳                |
| 17 | 76 | 男  | 低分化型             | 200    | IB   | LOH/R   | R/      | R/        | -/       | 570      | 癌死 (胃癌手術先行, 期間不詳) |
| 18 | 47 | 男  | 中分化型             | 100    | IA   | R/      | R/      | -/        | -/       | 560      | 31ヵ月無再発生存中        |
| 19 | 69 | 男  | 中分化型             | 120    | IIIA | R/      | -/      | -/        | -/       | 980      | 10ヵ月他病死 (呼吸不全)    |
| 20 | 68 | 男  | 中分化型             | 100    | IA   | R/      | R/      | R/        | -/       | 1920     | 31ヵ月無再発生存中        |
| 21 | 69 | 男  | 低分化型             | 220    | IIIA | LOH/R   | R/      | -/        | -/       | 220      | 19ヵ月生存            |
| 22 | 70 | 女  | 低分化型             | 220    | IIIA | R/      | R/      | -/        | -/       | 不詳       | 6ヵ月死亡 (原因不詳)      |
| 23 | 79 | 男  | 中分化型             | 200    | IB   | LOH/R   | -/      | LOH/R     | -/       | 1400     | 19ヵ月無再発生存中        |

腺癌

| ID | 年齢 | 性別 | 組織型              | TNM 分類 | 病理病期 | D3S1284 | D3S1300 | HSCARP53L | D21S1245 | Brinkman | 術 後 転 帰          |
|----|----|----|------------------|--------|------|---------|---------|-----------|----------|----------|------------------|
|    |    |    |                  |        |      | 腫瘍/血清   | 腫瘍/血清   | 腫瘍/血清     | 腫瘍/血清    |          |                  |
| 1  | 73 | 男  | 低分化型             | 100    | IA   | LOH/R   | -/      | LOH/R     | -/       | 1000     | 38ヵ月無再発生存中       |
| 2  | 72 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | -/      | R/      | -/        | -/       | 0        | 27ヵ月他病死 (心筋梗塞)   |
| 3  | 60 | 女  | 高分化型<br>(同時性多発癌) | 320    | IIIA | R/      | R/      | -/        | -/       | 0        | 不詳               |
| 4  | 74 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | -/      | R/      | R/        | -/       | 0        | 41ヵ月無再発生存中       |
| 5  | 69 | 男  | 中分化型             | 300    | IIB  | R/      | R/      | -/        | -/       | 900      | 41ヵ月無再発生存中       |
| 6  | 77 | 女  | 高分化型             | 220    | IIIA | -/      | R/      | -/        | -/       | 0        | 24ヵ月生存           |
| 7  | 61 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | -/      | R/      | R/        | -/       | 0        | 41ヵ月無再発生存中       |
| 8  | 68 | 女  | 中+低分化型           | 4×0    | IIIB | R/      | -/      | R/        | -/       | 0        | 21ヵ月癌死           |
| 10 | 75 | 男  | 中+低分化型           | 200    | IB   | R/      | -/      | R/        | -/       | 400      | 30ヵ月無再発生存中       |
| 11 | 43 | 女  | 低分化型             | 100    | IA   | -/      | R/      | -/        | -/       | 0        | 37ヵ月無再発生存中       |
| 12 | 60 | 女  | 高分化型             | 200    | IB   | R/      | R/      | -/        | -/       | 0        | 37ヵ月無再発生存中       |
| 13 | 58 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | R/      | -/      | -/        | -/       | 0        | 29ヵ月無再発生存中       |
| 14 | 63 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | LOH/R   | -/      | -/        | -/       | 0        | 37ヵ月無再発生存中       |
| 15 | 61 | 女  | 中分化型             | 100    | IA   | -/      | R/      | R/        | -/       | 140      | 36ヵ月無再発生存中       |
| 16 | 76 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | R/      | R/      | -/        | -/       | 0        | 33ヵ月無再発生存中       |
| 17 | 59 | 女  | 中分化型             | 1×0    | IA   | R/      | R/      | R/        | -/       | 0        | 27ヵ月無再発生存中       |
| 19 | 74 | 男  | 中+低分化型           | 100    | IA   | R/      | -/      | -/        | -/       | 0        | 34ヵ月無再発生存中       |
| 20 | 68 | 男  | 中分化型             | 200    | IB   | R/      | R/      | R/        | -/       | 620      | 37ヵ月無再発生存中       |
| 21 | 67 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | R/      | R/      | R/        | -/       | 0        | 34ヵ月無再発生存中       |
| 23 | 66 | 男  | 高分化型             | 100    | IA   | R/      | R/      | -/        | -/       | 600      | 33ヵ月無再発生存中       |
| 24 | 53 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | R/      | R/      | -/        | -/       | 0        | 34ヵ月無再発生存中       |
| 25 | 57 | 男  | 低分化型             | 421    | IV   | R/      | -/      | -/        | -/       | 1200     | 2ヵ月癌死            |
| 26 | 59 | 男  | 高分化型             | 200    | IB   | R/      | LOH/R   | -/        | -/       | 200      | 28ヵ月無再発生存中       |
| 27 | 72 | 男  | 高分化型             | 420    | IIIB | R/      | -/      | R/        | -/       | 不詳       | 20ヵ月担癌生存 (多発肺転移) |
| 28 | 75 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | -/      | R/      | R/        | -/       | 0        | 30ヵ月無再発生存中       |
| 29 | 69 | 男  | 高分化型             | 200    | IB   | R/      | R/      | R/        | -/       | 1080     | 27ヵ月無再発生存中       |
| 30 | 70 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | -/      | -/      | R/        | -/       | 0        | 19ヵ月無再発生存        |
| 32 | 71 | 女  | 高分化型             | 200    | IB   | -/      | R/      | R/        | -/       | 0        | 29ヵ月無再発生存中       |
| 33 | 64 | 男  | 高分化型             | 100    | IA   | -/      | R/      | R/        | -/       | 0        | 27ヵ月無再発生存中       |
| 34 | 75 | 女  | 高分化型             | 100    | IA   | R/      | R/      | R/        | -/       | 0        | 26ヵ月無再発生存中       |
| 35 | 72 | 女  | 中分化型             | 100    | IA   | -/      | -/      | R/        | -/       | 0        | 25ヵ月無再発生存中       |
| 36 | 45 | 男  | 低分化型             | 400    | IIIB | R/      | R/      | -/        | -/       | 500      | 28ヵ月担癌生存 (脳転移)   |
| 37 | 73 | 男  | 低分化型             | 100    | IA   | R/      | R/      | R/        | -/       | 1000     | 27ヵ月無再発生存中       |

大細胞癌

| ID | 年齢 | 性別 | 組織型 | TNM 分類 | 病理病期 | D3S1284 | D3S1300 | HSCARP53L | D21S1245 | Brinkman | 術 後 転 帰          |
|----|----|----|-----|--------|------|---------|---------|-----------|----------|----------|------------------|
|    |    |    |     |        |      | 腫瘍/血清   | 腫瘍/血清   | 腫瘍/血清     | 腫瘍/血清    |          |                  |
| 22 | 64 | 男  |     | 210    | IIB  | -/      | R/      | R/        | -/       | 1260     | 4ヵ月他病死 (気管支癌・肺炎) |

LOH: ヘテロ接合性の消失, R: LOH のないヘテロ接合体 (Retention), -: ホモ接合体 (not informative).

空欄は, PCR 未施行もしくは不能例。

病理病期は, 日本肺癌学会臨床病期分類および TNM 分類委員会からの報告 (1997年12月) に従った。

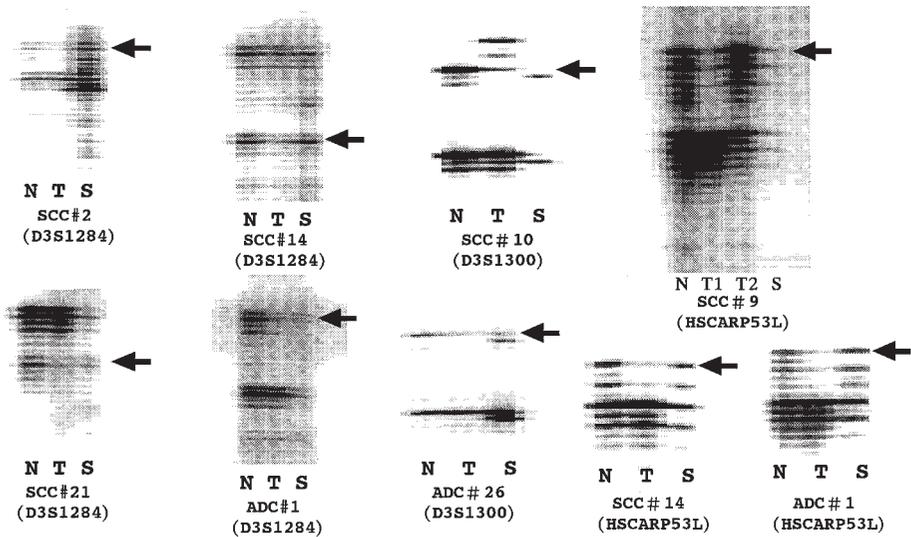


図1 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動図

矢印は、癌組織で欠失しているアレルの位置を示す。各レーンの下に、PCRに用いた鋳型DNAの由来（N：正常肺組織，T：肺癌組織，S：血清，SCC：扁平上皮癌，ADC：腺癌）と症例番号を、括弧内にマイクロサテライトマーカーを示す。SCC#9のT1とT2は、同時性重複癌である。SCC#10（D3S1300）の癌組織だけが、Shift bandを示した。

い、血清DNA中のLOHとShiftを検索し、結果の再現性を確認した。

### III 結果

各症例の臨床病理学的因子と、腫瘍本体および術前血清DNAのマイクロサテライト分析の結果を表1にまとめた。病理病期は、日本肺癌学会臨床病期分類およびTNM分類委員会からの報告（1997年12月）に従った。

LOH陽性ないしShift陽性の頻度は、D3S1284，D3S1300，HSCARP53L，D21S1245の順に、扁平上皮癌ではそれぞれ53%（19例中10例），18%（11例中2例），29%（17例中5例），評価できず（1例中0例）であった。腺癌では、それぞれ9%（22例中2例），4%（23例中1例），6%（18例中1例），評価できず（全例ホモ接合体）であった。大細胞癌の1例には、D3S1300とHSCARP53Lの領域にLOHやShiftを認めなかった。少なくとも、1つのマイクロサテライト領域について、LOH陽性ないしShift陽性の頻度は、扁平上皮癌で50%（22例中11例），腺癌で9%（33例中3例）であり、腺癌と比べ、扁平上皮癌に高頻度のLOH陽性例を認めた。

臨床病理学的因子と腫瘍本体のLOH陽性率との関

係については、喫煙者のLOH陽性率が35%（31例中11例）であるのに対して、非喫煙者のLOH陽性率が5%（20例中1例）にすぎないことから、喫煙とLOHの発生に直接の因果関係のあることが推測された。病理病期とLOH陽性率との関係については、症例数が少ないため評価はできないが、各病期ごとのLOH陽性率をまとめるとI期26%（39例中10例），II期25%（4例中1例），III期18%（11例中2例），IV期50%（2例中1例）という結果であった。

次に、腫瘍本体がLOH陽性の症例の血清DNAについて、マイクロサテライト変異を検討した変性アクリルアミドゲル電気泳動図を図1に示す。LOH陽性例のいずれの症例においても血清DNA中に、肺癌組織と同一のLOHやShiftを見出すことはできなかった（表1）。

検索されたすべての肺癌症例の内、扁平上皮癌の症例10においてのみ、FHIT遺伝子内にあるD3S1300領域でShiftを認め、RER陽性例であることが示唆された。しかし、その末梢血血清DNA中においても、腫瘍本体と同一のShiftは認められなかった（図1）。

### IV 考 察

今回我々が用いたマイクロサテライトDNA分析法

では、肺扁平上皮癌の染色体3p 領域の LOH が高頻度である上に、さらに LOH と喫煙量との関連性を認めた。マイクロサテライト不安定性を示唆する Shift は、57例中 1例に認められただけであり、非小細胞肺癌において、DNA 修復異常<sup>17)</sup>の関与は非常に稀と思われた。また、同時性多発癌 2例のうち、扁平上皮癌症例 9では、D3S1300と HSCARP53L の 2つのマーカーで、腫瘍間の clonarity の違いを鑑別でき、病理組織診断が同一であっても、同時性重複癌である可能性が示唆され、マイクロサテライト分析法が、病理組織学的に同一である多発癌において個々の腫瘍の分子生物学的独立性の判定に役立つことを示すものであった。以上の今回得られた結果は、いずれの点においても他施設からの報告<sup>14)17)</sup>と一致するものである。つまり、今回用いたマイクロサテライト分析法が、肺癌の腫瘍本体の遺伝子変異を検索する方法として、妥当であったことを示すものといえる。

今回検討された染色体21q の D21S1245<sup>6)16)</sup>の検索では、ヘテロ接合性を示す症例が稀であったことから、日本人では、D21S1245は、polymorphism の頻度が低い領域であると考えられた。

以上の点から、今回の検討において血清 DNA 中に腫瘍本体のマイクロサテライト変異を見出し得なかった理由は、分析方法によるものではなく、血清 DNA そのものに起因するものと思われ、特に、症例数の70%が腫瘍量の少ない Stage I であったことを考えると、血清 DNA 中の癌由来の DNA 濃度が低く、本法の検出限界以下であったことによるものと推測するのである。また、肺小細胞癌は、非小細胞肺癌とは異なり、神経内分泌腫瘍の性質をもち、異常遺伝子の頻度は高く、未治療の場合、短期間のうちに急激に増大し早期に胸腔内播種や遠隔転移を起こすことや、初期の放射線化学療法に対する反応性は良好であるが、再発は必至で、5年生存率は約5%と極めて予後不良であることから、全肺癌の中で最も臨床的悪性度が高い<sup>2)</sup>。さらに、組織学的に高頻度の分裂像と広範なネクロシスを伴う<sup>18)</sup>ことから、腫瘍量の急激な増大と共に、細胞死の後、多量の小細胞癌由来の DNA 断片が、血中へ流入することが予想される。これらの生物学的悪性度の違いにより、血清中の癌細胞由来の DNA 量に大きな差を生じるため、癌細胞由来のマイクロサテライト変異を、肺小細胞癌では検出しやすく、非小細胞肺癌では検出できなかったものとする。

他施設におけるマイクロサテライト領域を指標とし

た血清 DNA 診断の結果<sup>11)</sup>は、染色体3p の4種のマーカー (D3S1038, D3S1611, D3S1067, D3S1284) について、22例の非小細胞肺癌を調べ、I期扁平上皮癌の2例とIV期腺癌の1例に腫瘍本体と同一の LOH を血清 DNA 中に見出している。しかし、それ以外の4例に、腫瘍本体にはない LOH や Shift を血清 DNA 中に検出した (偽陽性)。偽陽性例の存在は、小細胞肺癌<sup>6)</sup>、頭頸部扁平上皮癌<sup>16)</sup> やメラノーマ<sup>19)</sup> においても、問題視されており、その原因は、腫瘍本体が異質なクローンからなることによるものと解釈されている。しかしながら、非小細胞肺癌において、真陽性例よりも多い偽陽性例の事実<sup>11)</sup>は、癌の存在診断の特異度を下げ、本法の実用化を妨げるものと思われる。このことから、非小細胞肺癌では、今回用いた血清 DNA のマイクロサテライト変異の検出法は、肺癌治療の支援技術として成り立ちにくいといえる。今後は、非小細胞肺癌においては、末梢血を検体とした時、マイクロサテライト以外の分子指標や検出手段を模索せざるをえない。

肺癌関連遺伝子のエクソン領域の遺伝子変異を指標とした場合、血清 DNA 中の K-ras 遺伝子の検索が、大腸癌<sup>20)–22)</sup> と膀胱癌<sup>23)–25)</sup> に関して行われているが、非小細胞肺癌では、腫瘍本体の K-ras 遺伝子の変異が約10%<sup>26)27)</sup>と低頻度であるため、K-ras 遺伝子を標的にした血清 DNA のマススクリーニングへの応用は、困難といえよう。

最近の興味深い報告としては、4種の肺癌関連遺伝子 (p16, death-associated protein kinase, glutathione S-transferase P1, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase) のプロモーターの異常高メチル化領域を指標にした、メチル化特異的 PCR 法による血清 DNA の分析<sup>28)</sup>がある。それによれば、非小細胞肺癌の68%の腫瘍が陽性で、そのうちの73%に血清 DNA の陽性例を認め、非常に高感度である点、今後の発展が期待できる。

末梢血中の mRNA (messenger RNA) の利用も考えられ、すでにサイトケラチン19に対する nested RT (reverse transcriptase)-PCR による半定量法により、有核血液細胞10<sup>7</sup>個中の1個の肺癌細胞を検出可能であるとする報告<sup>29)</sup>がある。この方法によれば、非小細胞肺癌症例の約40%の末梢血に陽性例を認め、高い感度と特異度を有する方法であるとされている。しかし、mRNA 自体が DNA と比べ半減期の短い不安定分子であることから、採血から検体処理にいたるまでの不

特定期間、普遍的に存在する RNase から血中 mRNA を迅速に安定に保つ細やかな工夫が臨床現場で必要になるものと思われる。

したがって、末梢血を用いた肺癌の遺伝子診断のためには、PCR 法そのものに検出限界があることを念頭に置きつつ、注目する染色体やマイクロサテライト領域の数を拡大し、より多重的に検出感度や特異度をあげるか、あるいは、分子標的を、マイクロサテライト領域とは異なる別の新たな DNA 領域や、肺癌関連遺伝子の mRNA を対象にする必要があるものと思われる。

## V 結 語

今回の検討からは、非小細胞肺癌に認められた同一

のマイクロサテライト変異を、術前の末梢血血清 DNA 中に検出しえなかった。

## 謝 辞

本研究の要旨は、第38回日本肺癌学会総会（1997年11月仙台）にて発表した。

本研究費の一部は、文部省科学研究費基盤研究B（課題番号09470246）および科学技術庁振興調整費・開放的融合研究推進制度採択課題「リポゾーム工学の構築と生物の潜在能力の開発」によった。

御指導賜りました理化学研究所分子腫瘍学研究室佐藤孝明主任研究員、凍結組織材料の提供に御協力を賜った当院中央検査部本田孝行博士、および実験をお手伝いいただいた奥山英理子さんに深謝いたします。

## 文 献

- 1) 秋田弘俊：肺癌. 川上義和, 谷口直之, 木田厚瑞 (編), 呼吸器疾患の分子生物学, pp 2-7, 医学書院, 東京, 1998
- 2) Mabry M, Nelkin BD, Baylin SB: Lung cancer. In: Vogelstein B, Kinzler KW(eds), The genetic basis of human cancer, pp 671-679, McGraw-Hill, New York, 1998
- 3) Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL: Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 67-71, 1994
- 4) Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M: Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 46: 318-322, 1989
- 5) 前防昭男：原発性肺癌マーカーとしての血中 DNA の意義. *日胸疾会誌* 28: 1085-1091, 1990
- 6) Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P: Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 2: 1033-1035, 1996
- 7) 佐々木雅広, 塩野 寛: STR 解析法 (マイクロサテライト). 川上義和, 谷口直之, 木田厚瑞 (編), 呼吸器疾患の分子生物学, pp 327-329, 医学書院, 東京, 1998
- 8) 堀井 明: ヒト癌とマイクロサテライト不安定性. *Surgery Frontier* 5: 48-54, 1998
- 9) Boland CR: Setting microsatellites free. *Nat Med* 2: 972-974, 1996
- 10) Sidransky D: Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* 278: 1054-1058, 1997
- 11) Sanchez-Cespedes M, Monzo M, Rosell R, Pifarre A, Calvo R, Lopez-Cabrero MP, Astudillo J: Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients. *J Ann Oncol* 9: 113-116, 1998
- 12) Yokoyama S, Yamakawa K, Tsuchiya E, Murata M, Sakiyama S, Nakamura Y: Deletion mapping on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 52: 873-877, 1992
- 13) Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, Gregorio LD, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM: The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85: 17-26, 1996
- 14) Sozzi G, Sard L, De Gregorio L, Marchetti A, Musso K, Buttitta F, Tornielli S, Pellegrini S, Veronese ML, Manenti G, Incarbone M, Chella A, Angeletti CA, Pastorino U, Huebner K, Bevilacqua G, Pilotti S, Croce CM, Pierotti MA: Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung

- cancer. *Cancer Res* 57 : 2121-2123, 1997
- 15) Jones MH, Nakamura Y : Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chromosomes Cancer* 5 : 89-90, 1992
  - 16) Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D : Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* 2 : 1035-1037, 1996
  - 17) Thibodeau SN : Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260 : 816-819, 1993
  - 18) Travis WD, Linder J, Mackay B : Classification, histology, cytology, and electron microscopy. In : Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT (eds), *Lung cancer : principles and practice*, pp 361-395, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998
  - 19) Fujiwara Y, Chi DDJ, Wang H, Keleman P, Morton DL, Turner R, Hoon DSB : Plasma DNA microsatellites as tumor-specific markers and indicators of tumor progression in melanoma patients. *Cancer Res* 59 : 1567-1571, 1999
  - 20) Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcahy HE, Farthing MJ : K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 112 : 1114-1120, 1997
  - 21) de Kok JB, van Solinge WW, Ruers TJ, Roelofs RW, van Muijen GN, Willems JL, Swinkels DW : Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 57 : 601-604, 1997
  - 22) Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, Gocke CD : Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 76 : 1293-1299, 1997
  - 23) Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, qi Chen X, Anker P, Alstead EM, Ballinger A, Farthing MJ, Stroun M : A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 4 : 271-275, 1998
  - 24) Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N, Sugimoto K, Akagi K, Fujiwara Y, Nishisho I, Sakon M, Gotoh M, Monden M : Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma : correlation with clinico-pathological features. *Clin Cancer Res* 4 : 1527-1532, 1998
  - 25) Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, Sole M, Capella G, Lluís F, Fernandez-Cruz L, Navarro S, Farre A : K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma : diagnostic utility and prognostic significance. *J Clin Oncol* 17 : 578-584, 1999
  - 26) Huang CL, Taki T, Adachi M, Konishi T, Higashiyama M, Kinoshita M, Hadama T, Miyake M : Mutations of p53 and K-ras genes as prognostic factors for non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 12 : 553-563, 1998
  - 27) Sekine I, Takami S, Guang SG, Yokose T, Kodama T, Nishiwaki Y, Kinoshita M, Matsumoto H, Ogura T, Nagai K : Role of epidermal growth factor receptor overexpression, K-ras point mutation and c-myc amplification in the carcinogenesis of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 5 : 351-354, 1998
  - 28) Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG : Detection of aberrant promoter hyper-methylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 59 : 67-70, 1999
  - 29) Peck K, Sher Y-P, Shih J-Y, Roffler SR, Wu C-W, Yang P-C : Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res* 58 : 2761-2765, 1998

(H 11. 6. 14 受稿 ; H 11. 7. 12 受理)