

肺・気管支の前がん病変、早期病変に関する研究

所属機関 自治医科大学医学部
研究者名 齋藤 建

《研究の概要》

前癌病変である異型腺腫様過形成 (Atypical adenomatous hyperplasia, AAH)、肺腺癌の進展に関する研究を行った。まず、肺腺癌をとりあげ、AAH 合併、非合併症例について臨床病理学的比較を行った。AAH 合併群では重複癌の頻度が高く、AAH の発生には何らかの体質的素因が関与していることが示唆された。また AAH 合併群では、喫煙が腺癌の発生をより促進し、肺内における癌多発を引き起こしている可能性が見出された。さらに、AAH のメチル化異常、細胞周期関連蛋白発現異常に関して検討した。APC、RASSF1A、p16、MGMT、DAP-K、GSTP1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、AAH では非浸潤性の細気管支肺胞上皮癌とほぼ同じ頻度で起こっていることが判明した。同時に、AAH と癌との間には形態、生物学的挙動の違いが存在していることから、両者の間には、メチル化以外の遺伝子あるいは遺伝子発現異常が存在していることを示している。実際、細胞周期関連蛋白の発現を検討すると、正常上皮から AAH を経て肺腺癌が発生する場合には、P27 発現の低下と、それに伴う細胞増殖能の上昇が関与していることが明らかになった。その背景としては、P27 の分解充進に関与する Skp2 および Jab1 の発現上昇が関与している可能性がある。

肺腺癌の進展を検討するためには、肺腺癌中心部に形成される瘢痕が重要である。今回、我々は瘢痕病変内における腺癌の挙動を解析するための実験的モデルとして低酸素環境下における細胞培養を試み、実際に浸潤能が充進することを明らかにした。さらに、浸潤能を獲得するため重要と考えられる遺伝子群を同定した。実際の腫瘍を分析するには、腫瘍辺縁と瘢痕形成部から各々選択的組織採取を行い、微小組織片から遺伝子発現の網羅的解析をする必要があるが、今回の結果はそれを補完するものと考えられる。また、今回同定された候補遺伝子について RNAi を用いたノックダウンなどにより、肺腺癌浸潤能を制御しうる可能性もあり、今後の研究の進展が期待される。

肺扁平上皮癌の遺伝子発現を網羅的に解析し、肺扁平上皮癌に特異的に高発現している遺伝子を見出した。その中の AKR1B10 に対する特異抗体を用いた検索により、口腔から食道にかけて正常扁平上皮粘膜には発現がみられず、肺線維症扁平上皮化生、扁平上皮癌に特異的な発現が確認された。肺線維症は高癌化状態として知られているが、線維化病変における扁平上皮化生の意義を確認した結果であると考えられる。さらに、AKR1B10 特異抗体を細胞診スクリーニングに応用すれば、肺扁平上皮の高危険群を同定できる可能性を示したものであり、現在具体化を目指した研究が進行中である。

研究者氏名及び所属機関

研究代表者	森永 正二郎	自治医科大学 (平成 13 年度)	異型肺胞上皮過形成の病理 病理学教授
	斎藤 建	自治医科大学 (平成 14、15 年度)	異型肺胞上皮過形成の病理 病理学教授
共同研究者	深山 正久	東京大学大学院医学系研究科 人体病理学分野教授	異型肺胞上皮過形成の病理
	石川 雄一	(財) 癌研究会癌研究所 病理部主任研究員	気道上皮異形成の病理

研究報告

I. 研究の目的

肺がん発生の初期過程の遺伝子異常、遺伝子発現異常の解明：

肺がんは日本人男性のがん死の中で第一位を占めており、その発生・進展過程を明らかにすることは極めて重要である。本研究では従来から前がん病変として注目されている気管支扁平上皮化生、異型腺腫様過形成 (Atypical adenomatous hyperplasia, AAH) に加え、癌周囲の気管支、肺組織の遺伝子異常、遺伝子発現異常を解析し、肺がん発生の初期過程におこる遺伝子異常、遺伝子発現異常を解明する。さらに、2つの高癌化状態、即ち、クロム酸塩製造に従事したクロム作業員 (気管支に扁平上皮化生や異形成が多発する) の肺、ならびに特発性間質性肺炎を対象とした研究との比較を行うことにより、肺がん発生初期過程の解明を目指す。

遺伝子発現の網羅的解析による肺癌の解析：

最近の DNAchip 或いはマイクロアレイの技術的進歩によって、一個の腫瘍検体に関して、ほぼすべての遺伝子の発現を一挙に解析でき、種々の細胞、臓器のデータベースと比較することが可能となった。本研究においても、肺腺癌、扁平上皮癌の進展過程において重要な役割を果たす遺伝子産物について網羅的な解析を行った。腺癌細胞株と気管支上皮細胞との比較、腺癌浸潤モデルでの検討によって、肺腺癌の発生・進展過程において重要な役割を果たすと思われる候補遺伝子を選び出した。また、肺扁平上皮癌においても同様の解析を行い、扁平上皮化生、扁平上皮癌に比較的特異的な候補遺伝子が見出された。

新たなスクリーニング法、研究手技の開発：

従来の肺がん研究においては、扁平上皮がんについては気管支扁平上皮化生、末梢腺がんについては AAH が前癌病変として注目されてきたが、最近、形態学的変化を伴わない遺伝子異常が、肺・気管支系に集積している可能性が指摘されている。しかし、これらの遺伝子異常がどの程度特異的で、どの程度の範囲に分布するのか、そして遺伝子異常集積がどのように形態学的な前癌病変、癌病変とつながるのか、全く不明である。一方、前癌病変特異的に充進する遺伝子発現を見出すことができれば、特異的抗体を用い、免疫組織化

学を喀痰細胞診あるいは気管支ブラッシング検体に応用することができ、肺がん発生の高危険度群を同定する簡便なスクリーニング法を確立できる可能性がある。

がん研究に必須な研究手技の開発：

本研究においては、従来から注目されている扁平上皮化生、AAH、さらに周囲の肺・気管支組織について、in situ で遺伝子異常の解析を行うことのできる技術についても検討を行った。組織切片上の微小病変を対象に、直接、遺伝子異常・遺伝子発現異常を解析することは、病理学の最も先端的な技術である。さらに、高感度 in situ hybridization、免疫組織化学によって、組織切片上の微小病変における遺伝子発現の違いを同定するというのも、病理学の最も特異とするところである。これらの技術は、ポストシーケンス時代におけるがん研究に必須であり、今後の研究の展開に資するところが大きいものと思われる。

II. 研究計画および材料と方法

異型腺腫様過形成 AAH と腺癌の進展に関して：

AAH の臨床病理学的検討：AAH の臨床的意義を明らかにするため、肺腺癌症例（123 例）を対象に、AAH 合併群（16 例）、非合併群（107 例）について、喫煙歴、多発癌、重複癌などの臨床的特徴について比較、検討した。また、病変について形態計測を行うとともに免疫組織化学的に p53-LI を求めた。

メチル化異常の検討：種々の癌で癌関連遺伝子のプロモーター領域に高率にメチル化が生じ、遺伝子発現が抑制されていることが報告されている。AAH 単発例 43 病変（男性 19 例、女性 24 例、 61.2 ± 1.7 歳）に関してプロモーター領域メチル化の異常について検討した。さらに長径 3cm 以下の、AAH 非合併の粘液非産生型細気管支肺胞上皮癌 30 例についても比較検討を行った。なお、AAH 症例のうち、13 例に喫煙瘻を認め、喫煙指数は 1436 ± 358 であった。

メチル化異常の検討のために、ホルマリン固定パラフィン包埋切片（ $4 \mu\text{m}$ ）上の病変部から、PixCell LCM microscope (Arcturus Engineering, Mountain View, CA) を用いマイクロダイセクションを行い、選択的に上皮細胞を採取した。抽出した DNA の質については c-Ki-ras 遺伝子の PCR で確認した。検討した癌関連遺伝子は、APC、Ras effector homologue (RASSF1A)、06-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT)、death-associated protein kinase (DAP-K)、glutathione S-transferase P1 (GSTP1)、p16 の 6 種類の遺伝子であり、methylation specific PCR 法を用いてプロモーター領域のメチル化の有無について検討した。

細胞周期関連蛋白の検討：癌における P27 の発現低下は、P27 のユビキチン化とそれに引き続くプロテアソームでの分解充進によるとされる。なかでも近年、ユビキチンリガーゼ Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2)、ならびに、P27 の核外輸送に関わる Jab1 の役割が注目されている。肺腺癌、AAH について免疫組織化学的に各々の蛋白発現の検討を行った。対象は、肺腺癌 110 病変、AAH 10 病変。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用い、P27、Skp2、Jab1、Ki67 (Mib1) 免疫組織化学を施行し、各病変における Labeling Index (LI) を算定。P27 については 20%、Skp2 10%、Jab1 30%、Ki67 は 30%を各々Cut-

Off 値とし、高発現と低発現に分類した。

肺腺癌の進展に関して：

肺腺癌の進展に伴い、中心部に瘢痕が形成される。さらに、炎症、線維化に重要な分子が、腺癌進展に重要な役割を果たすことが明らかにされてきている。肺腺癌瘢痕部での癌細胞の挙動を探る手がかりとして、低酸素ストレスによって誘導される肺腺癌細胞の生物学的挙動の変化、遺伝子発現変化について検討した。

扁平上皮化生と扁平上皮癌の進展に関して：

特発性間質性肺炎のメチル化異常：間質性肺炎部における 5 種類 (p16, MGMT, DAP-kinase, GSTP1, RASSF1A) の遺伝子のメチル化の有無について、一般肺癌および肺癌正常部と比較検討した。対象は特発性間質性肺炎 44 例、一般肺癌 40 例。方法は、AAH のメチル化異常の検討に準じて行った。

クロム肺癌：腫瘍の発生・増殖に重要な役割を演じている細胞周期調節蛋白 p14ARF-MDM2-p53-p21 および p16-cyclinD1-Rb cascade の発現を一般肺癌と比較、検討した。対象はクロム扁平上皮癌 7 例。対照として年齢・性・喫煙指数を一致させた扁平上皮癌切除 10 例。それぞれ、p53, MDM2 および Rb, CyclinD1 について免疫組織染色を行った。

扁平上皮癌の進展：対象は、肺扁平上皮癌、分化型腺癌、および異なる患者の正常肺組織、おのおの 54、9、30 例を用いた。扁平上皮癌 54 例の病理病期別内訳は IA: IB: IIA: IIB: IIIA: IIIB: IV=4: 24: 3: 9: 11: 2: 1、AC の分化度は高分化: 中分化=4: 5 で、全例手術例である。bulk の新鮮凍結組織片 0.05-0.2g を用いて、total RNA を抽出した。Microarray は 40,386 個の cDNA をスポットした microarray (Virtanen et al. Proc Natl Acad Sci USA 99:12357-62, 2002) を用いた。遺伝子の filtering の後、階層 clustering を用いてデータを解析し、系統樹を作成した。標準試料としては、正常肺 80%、肺癌腫瘍細胞株 10 種類の混合物 20% を混合して用いた。

扁平上皮化生、扁平上皮癌における遺伝子発現異常：扁平上皮癌で高発現している遺伝子として、aldo-keto reductase family 1 (タバコ由来発がん因子の代謝に関連) B10 (AKR1B10) が注目されている。肺線維症における扁平上皮化生巣、肺線維症に合併した扁平上皮癌で、AKRB10 特異抗体 (先端研油谷教授供与) を用い、遺伝子発現について検討した。対象は、肺線維症 13 例の扁平上皮化生巣 56 病変、肺線維症合併扁平上皮癌 9 症例 9 病変。

技術開発に関して：

マイクロダイセクション資料 DNA chip 解析のための技術的問題：マイクロダイセクション試料を DNA chip 解析するためには、可及的に試料の回収を短時間に行うことが必要である。このための基礎的研究を行った。各過程でどれだけ RNA integrity が失われるか、マウス肝臓を対象に検証した。

Expression Imbalance Map (EIM)：肺腺癌のゲノムの増幅、欠失を同定することは、肺腺癌の診断、治療上で極めて重要であるが、現在のところゲノムの増幅、欠失を真に網羅的に、しかも高解像度で調べる手段はない。そこで現在網羅的に解析可能な transcriptome の情報からゲノムの欠失、増幅等の癌の原因となり得る構造異常を予測するプログラムを

開発した。

Ⅲ. 研究成果

異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia, AAH) と腺癌の進展に関して :

AAH の臨床病理学的特徴の解明 : 肺腺癌症例 123 例 (AAH 合併 16 例、非合併群 107 例) を対象に AAH の臨床病理学的特徴を検討した。他臓器癌の合併は、AAH 合併群では 37.5% (6/16) であり、非合併群 12.5% (13/107) に比し、有意に高頻度であった ($p < 0.01$)。肺癌多発は AAH 合併群で非合併群より高い傾向にあったが、統計学的に有意ではなかった。しかし、多発癌症例 8 例は全例喫煙者であり、AAH 群喫煙者 8 例中 3 例に癌が多発しており、非合併群喫煙者 69 例中 5 例に比し、有意に高率であった ($p = 0.04$)。また、形態計測と免疫組織化学的検討の結果、両者はともに非粘液産生性細気管支肺腺癌とは明瞭に区別される病変であり、最大径では 9mm に境界があった。また、多発 AAH にはより大きな病変が含まれ、p53-LI が高い傾向にあった。

AAH のメチル化異常 : AAH 病変の大きさは 3.2 ± 0.4 mm であり、肺癌に合併したものは 32 病変 (腺癌 30 病変) であった。6 種類の遺伝子 (p16、APC、RASSF1A、MGMT、DAP-kinase、GSTP1) のプロモーター領域のメチル化の頻度は、AAH では 19、30、21、19、33、7% であった。一方、AAH 合併 BAC では、23、30、23、34、30、7% であり、いずれの遺伝子においても頻度に有意な差は認められなかった。AAH 病変のメチル化の頻度に関して、肺癌の合併の有無による差は見られなかった。また、最大径について、平均値 3.2mm を基準に検討したが、有意差は認められなかった。しかし、HRCT で認識可能と考えられる 5mm 以上の AAH 7 病変中 6 病変では、少なくとも 1 遺伝子以上のメチル化が生じていた。

AAH の細胞周期関連遺伝子発現異常 : P27LI は肺正常細気管支上皮、AAH、腺癌の順に、 40 ± 4 、 31 ± 1 、 $14 \pm 1\%$ と、それぞれ有意差をもって低下していた。一方、Ki67LI は逆に 0.4 ± 0.2 、 0.6 ± 0.3 、 $16.3 \pm 1.7\%$ と有意差をもって上昇していた。Skp2 高発現例は、腺癌で AAH、正常細気管支上皮よりも高頻度にみられた。一方、Jab1 高発現例は、腺癌および AAH で正常細気管支上皮よりも高頻度であった。肺腺癌において、Skp2 発現と臨床病理学的因子との関連をみると、静脈およびリンパ管侵襲像と有意な関連を有しており、かつ Skp2 高発現例は低発現例に比べ予後不良であった。これに対し、Jab1 発現に関しては、検討した各因子との相関は確認できず、予後との関係も明らかではなかった。

肺腺癌の発現プロファイルの解析 : 外科切除された肺腺癌 12 例より抽出した RNA をプールし、非癌肺組織の RNA とともに、約 39,000 transcript を固相化した U-133 Affymetrix GeneChip oligonucleotide microarray を用いて解析を行った。先端研 油谷研究室で開発されたインターラクティブなシステムを用い、肺腺癌特異的な新規性の高い 90 遺伝子を選出した。現在、有望な候補遺伝子に関して cDNA 全長のクローニングを行い、大腸菌発現用ベクター、哺乳類細胞発現用ベクターを作成し、抗体作成、機能解析を進めている。肺腺癌癒痕部での癌細胞の挙動を探る手がかりとして、低酸素ストレスによって誘導される肺腺癌細胞の生物学的挙動の変化、遺伝子発現変化について検討した。A549 肺腺癌細胞株は低酸素状態では、増殖抑制、細胞接着の低下、紡錘状形態変化を示す一方、運動能の亢進がみられた。低酸素下 24 時間、48 時間後の遺伝子変化を網羅的に解析したところ、hexokinase 2 (glycolysis の rate limiting enzyme)、VEGF、LOX、LOX like 2 などの遺

伝子において発現増強がみられた。一方、遺伝子機能 database (Gene Ontology) を用いた解析により、発現が低下している遺伝子群には、DNA 修復に関連するものが含まれていることが判明した。

扁平上皮化生と扁平上皮癌の進展に関して：

特発性間質性肺炎におけるメチル化異常：メチル化の頻度は、特発性間質性肺炎では p16 0%、MGMT 18%、DAP-kinase 16%、GSTP1 0%、RASSF1A 20%であった。一方、一般肺癌では p16 30%、MGMT 20%、DAP-kinase 40%、GSTP1 18%、RASSF1A 28%、肺癌正常部では p16 0%、MGMT 0%、DAP-kinase 13%、GSTP1 0%、RASSF1A 0%であった。特発性間質性肺炎部では、既に MGMT および RASSF1A 遺伝子のメチル化が生じていた。

クロム肺癌：クロム従事者と一般集団における肺癌において、細胞周期関連蛋白の発現異常の頻度を検討した。クロム肺癌で p53、MDM2 が各々71%、43%、Rb、CyclinD1 は各々0%、29%であった。一方、対照例の発現異常の頻度は p53、MDM2 で各々80%、40%、また Rb、CyclinD1 で各々20%、30%で、統計学的有意差は認められなかった。クロム従事者と一般集団における肺癌では、p53 pathway、p16 pathway の関与に違いは認められなかった。

扁平上皮癌の遺伝子発現の網羅的解析：Student ANOVA 法 (Bonferoni correction $p=0.05$) を用いて、4万個の遺伝子から、扁平上皮癌、腺癌、正常肺の3群間で発現が異なる3,676遺伝子を抽出した。50%にあたる1,848個は既知の遺伝子であった。この3676遺伝子を用いて階層 clustering を行なったところ、扁平上皮癌 (n=39) のみからなる群 (SCC 群) と、他の群に分かれたが、後者には、腺癌全例と扁平上皮癌4例の群 (AC 群) と正常組織を含む群とに分かれた。正常組織を含む群はさらに、正常組織 (N 群) と扁平上皮癌10例を含む群 (SCC-N 群) に分かれた。

全扁平上皮癌で高発現している306遺伝子の中には、bullous pemphigoid antigen、数種の keratin、drosophila FAT 腫瘍抑制遺伝子、PRKY (Y-linked protein kinase、cell migration と関係) などが見られた。また、SCC 群でのみ高発現している遺伝子としては、BAZ1B (bromodomain 転写因子 family)、BAF53 (c-myc の transformation に関与)、aldoketo reductase family 1 (AKR1、タバコ由来発がん因子の代謝に関連) の2つなどがあった。

扁平上皮化生、扁平上皮癌における AKR1B10 発現異常：扁平上皮癌で高発現している遺伝子として AKR1B10 が注目されている。肺線維症における扁平上皮化生巣、肺線維症に合併した扁平上皮癌で、AKR1B10 特異抗体 (先端研 油谷教授供与) を用い、遺伝子発現について検討した。通常の口腔、食道粘膜の扁平上皮では、AKR1B10 の発現はなく、正常気管支にもみられない。肺線維症扁平上皮化生巣では56病変中23病変で陽性、他の化生上皮は陰性であった。一方、肺線維症合併扁平上皮癌では9病変中6病変が陽性所見を示した。

技術開発に関して：

マイクロダイセクション資料 DNA chip 解析のための技術的問題：微小組織片からの RNA を用いた DNACHIP 解析の基礎的研究を行った。その結果、染色等の水相の過程が多いほど RNA integrity が低下し、その低下は on ice で行っても (28s/18s 比 0.45)、Rnase inhibitor を加えても (28s/18s 比 0.41) 大きく変化しなかった。また、同じ quality の RNA からで

も、開始量を少なくすると (10nanogram total RNA、LCM 1,000 cell 相当)、増幅産物の quality が大きく落ちることが判明した。

IV. 考察

異型腺腫様過形成 (atypical adenomatous hyperplasia, AAH) と腺癌の進展に関して：

AAH は手術肺切除組織あるいは剖検肺に偶発的に発見される病変として、古くから知られており、特に肺腺癌には 8.8-34.5% とかなりの幅があるものの、肺切除例全体よりも高い頻度で合併するとされている。本研究では、肺腺癌をとりあげ、AAH 合併、非合併症例について臨床病理学的比較を行った。その結果、AAH 合併群では重複癌の頻度が高く、AAH の発生には何らかの体質的素因が関与していることが示唆された。また AAH 合併群では、喫煙が腺癌の発生をより促進し、肺内における癌多発を引き起こしている可能性が見出された。

肺腺癌前癌病変としての意義を検討する目的で、AAH における癌関連遺伝子プロモーター領域のメチル化異常について検討した。検索した 6 種類の遺伝子のうち、APC、RASSF1A、p16 は腫瘍抑制遺伝子とみなされている。また、MGMT は DNA 修復に働き、DAP-K は細胞のアポトーシスに関与している。さらに GSTP1 は発癌性芳香族炭化水素の代謝・解毒に関与している。本研究では、これら重要な働きをしている遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、AAH では非浸潤性の細気管支肺胞上皮癌とほぼ同じ頻度で起こっていることが判明した。この結果は AAH の腫瘍としての性格を示すものであるが、一方で、AAH と癌との間には形態、生物学的挙動の違いが存在していることから、両者の間には、メチル化以外の遺伝子あるいは遺伝子発現異常が存在していることを示している。

一方、細胞周期蛋白発現の検討から、正常上皮から AAH を経て肺腺癌が発生する場合には、P27 発現の低下と、それに伴う細胞増殖能の上昇が関与していることが明らかになった。その背景として P27 の分解亢進に関与する Skp2 および Jab1 の発現上昇が関与している可能性がある。さらに、肺腺癌では Skp2 発現が Jab1 発現よりも生物学的悪性度に、より関与している可能性が示された。とくに、本研究からは静脈およびリンパ管侵襲能と Skp2 高発現との関連が示されており、Skp2 高発現と腫瘍の浸潤能亢進とのかわりが推測される。P27 の発現低下と腫瘍浸潤能の亢進の関連性については現在まで指摘されていないことから、P27 発現とは別個に Skp2 発現自身が、腫瘍浸潤能亢進に関与している可能性も示された。

肺腺癌の進展に関する検討から、腫瘍細胞自身の細胞学的性質以外に、間質細胞との関わりが重要になっていることが示されている。今回、我々は癒痕病変内における腺癌の挙動を解析するための実験的モデルとして低酸素環境下における細胞培養を試み、実際に浸潤能が亢進することを明らかにした。さらに、浸潤能を獲得するため重要と考えられる遺伝子群を同定した。実際の腫瘍を分析するには、腫瘍辺縁と癒痕形成部から各々選択的組織採取を行い、微小组織片から遺伝子発現の網羅的解析をする必要があるが、今回の結果はそれを補完するものと考えられる。また、今回同定された候補遺伝子について RNAi を用いたノックダウンなどにより、肺腺癌浸潤能を制御しうる可能性もあり、今後の研究の進展が期待される。

扁平上皮化生と扁平上皮癌の進展に関して：

扁平上皮癌の発生過程を検討するため、肺線維症におけるメチル化異常、クロム肺癌における細胞周期蛋白発現異常に関する研究を行った。肺線維症では、非腫瘍部においても既に MGMT および RASSF1A 遺伝子のメチル化が生じていた。今後、改変気腔における扁平上皮化生をマイクロダイセクションし、微小組織片で異常を跡付けるなど、より詳細な研究が必要である。

扁平上皮癌の進展過程を明らかにする目的で、手術切除された扁平上皮癌を対象に、遺伝子発現プロファイルの網羅的解析を行った。その結果、扁平上皮癌には形態的な特徴とは別個に遺伝子発現の上から亜群の存在が推定された。また、扁平上皮癌で高発現している遺伝子の中には、発がん自体に関与している転写因子の他に、タバコ関連の発がん因子代謝酵素 *aldo-keto reductase family 1* がみられ、扁平上皮癌と喫煙との関連を改めて示す結果となった。とくに、その中の候補遺伝子 AKR1B10 に対する特異抗体を用いた検索により、口腔から食道にかけた正常扁平上皮粘膜には発現がみられず、肺線維症扁平上皮化生、扁平上皮癌に特異的な発現が確認された。肺線維症の線維化病変における扁平上皮化生の意義を確認した結果であると考えられる。さらに、AKR1B10 特異抗体を細胞診スクリーニングに応用すれば、肺扁平上皮の高危険群を同定できる可能性を示したものであり、現在具体化を目指した研究が進行中である。

技術開発に関して：

肺腺癌、扁平上皮癌、それぞれの発生過程の分析に、マイクロダイセクションによる試料の解析が必須である。そこで、現在、基礎的検討が進行中であるが、組織固定法を考案、あるいは従来のものを改良するなど、技術的検討をさらに加える課題が残された。

V. 研究成果の発表

1. Ishikawa Y, Furuta R, Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E. Loss of heterozygosity and the smoking index increase with decrease in differentiation of lung adenocarcinomas: etiologic implications. *Cancer Lett.* 187: 47-51, 2002.
2. Virtanen C, Ishikawa Y, Honjoh D, Kimura M, Shimane M, Miyoshi M, Nomura H, Jones MH. Integrated classification of lung tumors and cell lines by expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12357-62, 2002.
3. Meguro S, Atsumi Y, Matsuoka K, Ishikawa Y, Sugimoto M, Goto M. Werner syndrome in a Korean man. *Diabetes Care*, 25: 1483-4, 2002.
4. Satoh Y, Hoshi R, Tsuzuku M, Horai T, Ishikawa Y, Asami H, Komatsu H. Cytologic characteristics of large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Acta Cytol* 46 (suppl), 224, 2002.
5. Nishida K, Kobayashi Y, Ishikawa Y, Satoh Y, Okumura S, Nishimura H, Nakagawa K, Nakamura K, Koike M, Tsuchiya E. Sarcomatoid adenocarcinoma of the lung: clinicopathological, immunohistochemical and molecular analyses. *Anticancer Res* 22:3477-3483, 2002.

6. Niki T, Kohno T, Iba S, Moriya Y, Takahashi Y, Saito M, Maeshima A, Yamada T, Matsuno Y, Fukayama M, Yokota J, Hirohashi S. Frequent co-localization of cox-2 and laminin-5 g2 chain at the invasive front of early-stage lung adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 160:1129-1141, 2002.
7. Hippo Y, Taniguchi H, Tsutsumi S, Machida N, Chong JM, Fukayama M, Kodama T, Aburatani H. Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res.* 62:233-240, 2002
8. Osawa T, Chong J-M, Sudo M, Sakuma K, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Fukayama M. Reduced expression and promotor mehtylation of p16 gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 93: 1195-1200, 2002
9. Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Osawa T, Ohara E, Uozaki H, Shibahara J, Kuroiwa K, Tominaga S, Hippo Y, Aburatani H, Funata N, Fukayama M. Interleukin-1beta expression in human gastric carcinoma with Epstein-Barr virus infection. *J Virol.* 76: 6825-6831, 2002.
10. Yoshizawa K, Nagai H, Sakurai S, Hironaka M, Morinaga S, Saitoh K, Fukayama M. Clonality and K-ras mutation analyses of epithelia in intraductal papillary mucinous tumor and mucinous cystic tumor of the pancreas. *Virchows Arch.* 441:437-443, 2002
11. Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Shirakusa T, Tsuchiya E, Ishikawa Y. Early-stage lung adenocarcinomas with a micropapillary pattern, a distinct pathological marker for a significantly poor prognosis. *Am J Surg Pathol* 27: 101-109, 2003.
12. Nakamura Y, Shimizu T, Ishikawa Y, Matsumoto T, Sugimoto M, Goto M, Yoshimura Y, Wakitani S, Takaoka K. Triple primary sarcoma in Werner syndrome with a novel mutation. *Rheumatology (Oxford)* 42: 798-800, 2003
13. Satoh Y, Ishikawa Y, Miyoshi T, Mukai H, Okumura S, Nakagawa K. Pulmonary Metastases from a low-grade endometrial stromal sarcoma confirmed by chromosome aberration and FISH approaches: A case of recurrence thirteen years after hysterectomy. *Virchows Arch* 442: 173-8, 2003.
14. Satoh Y, Ishikawa Y, Furuta N, Tsuzuku M. Difficulty of cytodiagnostic approaches to pulmonary metastases from a case of low grade endometrial stromal sarcoma. *Acta Cytol* 47: 1140-1, 2003.
15. Honda S, Hayashi M, Kobayashi Y, Ishikawa Y, Nakagawa Kand Tsuchiya E. A role for the pituitary tumor-transforming gene in the genesis and progression of non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res.* 23: 3775-3782, 2003.
16. Kashima T, Nakamura K, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis AE. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer.* 104:147-154, 2003.
17. Kitagawa H, Goto A, Niki T, Hironaka M, Nakajima J, Fukayama M. Lung

- adenocarcinoma associated with atypical adenomatous hyperplasia. A clinicopathological study with special reference to smoking and cancer multiplicity. *Pathol Int.* 53 (12): 823-7. 2003
18. Kitagawa H, Goto A, Minami M, Nakajima J, Niki T, Fukayama M. Sclerosing hemangioma of the lung with cystic appearance. *Jpn J Clin Oncol.* 33 (7): 360-3. 2003
 19. Chong J-M, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, Nagai H, Funata N, Taniguchi H, Aburatani H, Fukayama M. Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Sci.* 94:76-80, 2003
 20. Hoshimoto K, Yamauchi N, Takazawa Y, Onda T, Taketani Y, Fukayama M. CD44 variant 6 in endometrioid carcinoma of the uterus: its expression in the adenocarcinoma component is an independent prognostic marker. *Pathol Res Pract.* 199(2) :71-7, 2003
 21. Zhang SC, Miyamoto S, Kamijo T, Hayashi R, Hasebe T, Ishii G, Fukayama M, Ochiai A. Intratumor microvessel density in biopsy specimens predicts local response of hypopharyngeal cancer to radiotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 33: 613-9. 2003
 22. Kobayashi K, Tokuchi Y, Hashimoto T, Hayashi M, Nishimura H, Ishikawa Y, Nakagawa K, Sato Y, Takahashi A and Tsuchiya E. Molecular markers for reinforcement of histological subclassification of neuroendocrine lung tumors. *Cancer Sci.* 95:334-41, 2004
 23. Jones MH, Virtanen C, Honjoh D, Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nomura H, Ishikawa Y. Two prognostically significant subtypes of high-grade lung neuroendocrine tumours independent of small-cell and large-cell neuroendocrine carcinomas identified by gene expression profiles. *Lancet* 363: 775-81, 2004.
 24. Hoshi R, Satoh Y, Tsuzuku M, Horai T, Y Ishikawa. Fine needle aspiration cytology of fibrous histiocytomas of the lung. *Acta Cytol* 48: 290-292, 2004.
 25. Kobayashi K, Tokuchi Y, Hashimoto T, Hayashi M, Nishimura H, Ishikawa Y, Nakagawa K, Sato Y, Takahashi A and Tsuchiya E. Molecular markers for reinforcement of histological subclassification of neuroendocrine lung tumors. *Cancer Sci.* 95: 334-341, 2004.
 26. Hoshi R, Tsuzuku M, Horai T, Ishikawa Y, Satoh Y. Micropapillary clusters in early-stage lung adenocarcinomas: a distinct cytologic sign of significantly poor prognosis. *Cancer.* 102:81-6, 2004
 27. Liu D, Wada I, Tateno H, Ogino D, Suzuki M, Li L, Lu W, Kojiro M, Fukayama M, Okabe H, Fukumoto M. Allelotypic characteristics of thorotrast-induced intrahepatic cholangiocarcinoma: comparison to liver cancers not associated with thorotrast. *Radiat Res.* 161: 235-43, 2004

28. Sudo M, Chong JM, Sakuma K, Ushiku T, Uozaki H, Nagai H, Funata N, Matsumoto Y, Fukayama M. Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 109: 194-9, 2004
29. Dobashi Y, Goto A, Fukayama M, Abe A, Ooi A: Overexpression of cdk4/cyclin D1, a possible mediator of apoptosis and an indicator of prognosis in human primary lung carcinoma. *Int J Cancer*. 110 (4): 532-41. 2004
30. Shibahara J, Goto A, Niki T, Tanaka M, Nakajima J, Fukayama M. Primary pulmonary paraganglioma: report of a functioning case with immunohistochemical and ultrastructural study. *Am J Surg Pathol*. 28 (6): 825-829, 2004
31. Goto A, Niki T, Moriyama S, Funata N, Moriyama H, Nishimura Y, Tsuchida R, Kato J, Fukayama M. Immunohistochemical study of Skp2 and Jab1, two key-molecules in the degradation of P27, in lung adenocarcinoma. *Pathol Int*. in press
32. Sakuma K, Chong JM, Sudo M, Ushiku T, Inoue Y, Shibahara J, Uozaki H, Nagai H, Fukayama M. High-Density Methylation of *p14^{ARF}* and *p16^{INK4A}* in Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma. *Int J Cancer* in press
33. Goto A, Niki T, Terado Y, Fukushima J, Fukayama M. Prevalence of CD99 protein expression in pancreatic endocrine tumors (PETs) submitted
34. Goto A, Nakajima J, Hara K, Niki T, Fukayama M. Lung Adenocarcinoma Associated with Familial Adenomatous Polyposis. Clear Cell Carcinoma with β -Catenin Accumulation Accompanied by Atypical Adenomatous Hyperplasia. Submitted
35. Fukumoto S, Yamauchi N, Moriguchi H, Hippo Y, Watanabe A, Taniguchi H, Ishikawa S, Ito H, Yamamoto S, Iwanari H, Kodama T, Nishimura M, Fukayama M, Dosaka-Akita H, Aburatani H. Aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is frequently overexpressed in squamous cell lung carcinoma and lung adenocarcinoma of heavy smokers. submitted
36. Jones MH, Virtanen C, Shimane M, Inamura K, Miyoshi T, Nakagawa K, Nomura H, Ishikawa Y. Class identification and survival prediction in lung squamous cell carcinoma by gene expression profiling. (in preparation)
37. Hironaka M, Sakurai S, Oguni S, Fukayama M, and Saitoh K. Aberrant promoter hypermethylation in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. Comparative study with non-mucinous bronchioloalveolar carcinoma less than 3cm in diameter. (in preparation)