

検診とゲノム診断

光富徹哉¹

要旨 **目的**．分子生物学を肺癌検診に応用していく試みを整理し問題点を明らかにする．**方法**．肺癌感受性診断，微量肺癌細胞の検出による早期診断などに関する文献を検索した．**結果**．肺癌の感受性診断：疫学的に示される肺癌の弱い遺伝性の実体として，発癌物質代謝酵素，遺伝子修復関連や癌関連遺伝子などの多型などがあり，数倍の肺癌リスク上昇が示されている．このような単塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNPs) を網羅的に同定しその意義を検証する研究が現在進められており，今後の発展が期待される．微量肺癌細胞の検出：喀痰，血清などの癌関連遺伝子の突然変異，メチル化，上皮マーカーの発現などを PCR 法によって増幅し高感度に検出して早期発見に役立てようとする試みである．これにより高感度に癌を発見できると報告されているが，感度と特異度は両立し難く，また再現性にも問題があることが多い．最近ではマスマスプロトメトリーによる血漿蛋白の解析によって癌の早期診断を行う試みがあり検診への応用が期待されている．**結論**．肺癌の集検にこのような方法をすぐ応用していくことは未だ困難である．発展のためには集検時に良質な検体を蓄積していくことが重要であろう．(肺癌．2005;45:157-165)

索引用語 肺癌感受性診断，遺伝子診断，SNP，プロテオミクス

Mass Screening and Molecular Diagnosis for Lung Cancer

Tetsuya Mitsudomi¹

ABSTRACT **Objective.** To identify recent efforts to apply molecular biology of lung cancer to early detection, and to discuss problems to be overcome for practical application. **Methods.** We searched literature dealing with lung cancer susceptibility and early diagnosis by detecting minute amounts of cancer cells. **Results.** Lung cancer susceptibility: Epidemiologic studies have revealed that there is an increased familial risk of lung cancer. The basis of this inheritance can be partly attributed to polymorphism of drug metabolizing enzymes, enzymes related to the DNA repair system, or cancer-related genes. However, many studies were able to show odds ratio of only less than five. The project for extensive comprehensive analysis of such polymorphisms (SNPs) based on 300000 individuals are currently under way, and this will identify people at an increased risk of lung cancer with a high degree of reliability. Detection of minute amounts of lung cancer cells: There have been numerous efforts to detect lung cancer cells with high sensitivity in clinical specimens such as sputum and blood by use of mutations or methylation of cancer-related genes or expression of epithelial markers. High sensitivity has been reported, however, high sensitivity and high specificity often do not go together. Furthermore, it is sometimes problematic to obtain results reproducibly. Recently, there have been reports on early diagnosis of cancer by analyzing serum protein by mass spectrometry with a high resolution. This technique is expected to be utilized as a powerful tool for mass screening of cancer in the near future. **Conclusion.** It is hard at present to use the above-mentioned methods for mass screening of lung cancer. For further development, it is absolutely necessary to accumulate clinical specimens with good quality together with corresponding clinical information. (*JJLC*. 2005;45:157-165)

KEY WORDS Lung cancer susceptibility, Molecular diagnosis, SNP, Proteomics

¹愛知県がんセンター病院胸部外科．

別刷請求先：光富徹哉，愛知県がんセンター病院胸部外科，〒464-8681 愛知県名古屋市千種区鹿子殿 1-1 (e-mail: mitsudom@aichi-cc.jp) ．

¹Department of Thoracic Surgery, Aichi Cancer Center Hospital,

Japan.

Reprints: Tetsuya Mitsudomi, Department of Thoracic Surgery, Aichi Cancer Center Hospital, 1-1 Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya 464-8681, Japan (e-mail: mitsudom@aichi-cc.jp)

© 2005 The Japan Lung Cancer Society

はじめに

肺癌感受性が高い人を効率よく同定し、検診をこのような人に限って行うことができれば、その医療経済的な効果は大きいものがある。また、低線量 CT といえど毎年ということになれば、その被曝量は健康被害上無視できないものがある。分子生物学の進歩に伴って、ヒトの癌が種々の癌関連遺伝子異常の蓄積によって、発生、進展することが明らかとなった(図1)。これらの知見を肺癌検診に応用しハイリスクグループを同定していく試みとしては、1) 肺癌の感受性診断、2) 微量肺癌細胞の検出による早期診断などがある(表1)。本稿ではこれらの点に関し、これまでの試みを総括して、問題点を明らかにしていきたい。

肺癌の感受性診断(一次予防)

疫学的な解析によると肺癌には家族集積性があり、肺癌患者の家族には2~3倍肺癌リスクが高くなると報告されている。表2にそのような研究の結果をあげた。例えば、Tokuhataらは270例の肺癌患者の一度近親者(両親、兄弟)110名と、270例の対照の近親者1995名における、肺癌リスクを調査し、肺癌患者における肺癌リスクは2.6倍となると報告している²。また、より遺伝的な影響が強いと考えられる非喫煙者においてはそのリスクが3.8倍になるという²。また、他の疫学的な解析では、メンデル遺伝に従う常染色体上の共優勢遺伝子が喫煙との関連において、若年発症肺癌に寄与していると報告されており、この仮想的な遺伝子の単離がまたれる。双生児は疾患の遺伝的要素をみるために用いられる疫学的手法のひとつであるが、北欧のこのような研究では、肺癌発症のうち遺伝的要素によるものが26%であると報告されている³。ちなみに、胃癌、大腸癌、乳癌、子宮頸癌ではそれぞれ、遺伝的要素が28%、35%、27%、0%で

あった³。一方、米軍の15294組の双生児の研究では、双生児の片方が肺癌であるのは一卵性262組、二卵性357組、両方とも肺癌であるのは一卵性10組、二卵性21組であった。一方、年齢、性、喫煙習慣から計算される肺癌発生の期待値は一卵性3.35、二卵性5.27で、観察値/期待値は一卵性2.98、二卵性3.99であり、この値が1より高いことは家族性の影響を示唆した⁴。しかし、この値は二卵性の方が高く、一卵性の片方が肺癌であるときに、もう片方も肺癌となるリスクは、二卵性の場合より高くないという結果が出されている⁴。これらの報告から、一般に肺癌という病気に対する遺伝的素因はあるものの、リスクはそれほど高くないことが窺われ、喫煙をはじめとする外因が大きな影響をもっていることが窺われる。

家族性腫瘍症候群では、germ lineの腫瘍抑制遺伝子(まれに癌遺伝子)の異常が親から子へ遺伝されることで、癌の家族集積性がもたらされることが明らかとなっている。例えば、Li-Fraumeni症候群(Li-Fraumeni syndrome: LFS)、遺伝性非ポリポージス大腸癌(hereditary non-polyposis colon cancer: HNPCC)や家族性腺腫性ポリポージス(familial adenomatous polyposis: FAP)はそれぞれ、p53遺伝子、ミスマッチ修復酵素遺伝子、APC遺伝子の異常によることが知られている(表3)。このような疾患では、癌の発症前診断が高い精度で可能であり、説明と同意、プライバシーや、差別、偏見などの問題に対しては十分な配慮が必要であるものの、早期発見にとっては理想的な戦略となり得る。しかし、cancer family syndromeで肺癌を主要な構成腫瘍とするものは現在まで報告されていない。肺癌におけるp53遺伝子異常の頻度は約50%と高いにもかかわらず、LFSで肺癌の頻度は高くない。また、HNPCCでは大腸癌の他に卵巣癌、胃癌などの頻度が高いことも知られているが、肺癌はむしろこの家系のヒトでは頻度が少ないと報告されている。Peutz-Jeghers症候群(Peutz-Jeghers syndrome: PJS)

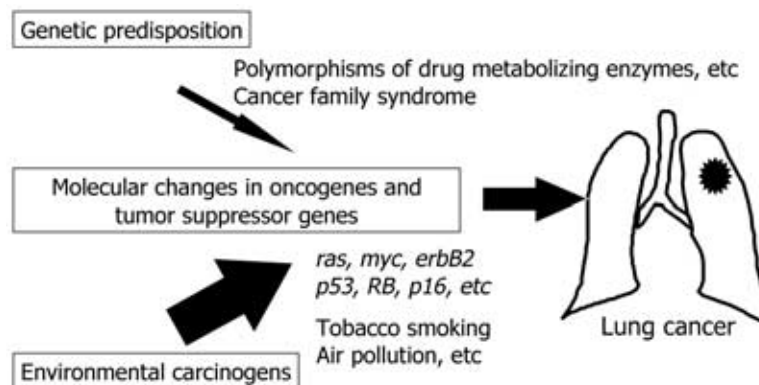


Figure 1. Schematic presentation of lung carcinogenesis.

は過誤腫性の大腸ポリープと口唇部の色素斑を特徴とする症候群で種々の群を多発することが知られている。この症候群の全癌の相対危険比は15.8であり、肺癌では17であると報告されている⁵。従って、PJSは家族性腫瘍症候群のうちで肺癌を構成腫瘍とする例外的なものではあるものの、疾患の頻度を考えた場合、見逃しを少なくする、すなわち感度を高く肺癌の高危険群を同定するにはこのアプローチからは困難であると考えられる。

Table 1. Early Diagnosis of Lung Cancer and Molecular Biology

Identification of patients at high risk
Familial segregation
Germ line mutation
Genetic polymorphism
Diagnosis with high sensitivity
Molecular detection of cancer cells
Serum proteomics

肺癌発生の主な環境要因は喫煙である。しかし同じように曝露されたヒトが均一に肺癌になるのではない。従ってもし、遺伝的な感受性を分子生物学的に調べて、ハイリスクグループを特定できれば、CT検診などの画像診断でより効率的に肺癌患者を検出できることが期待される。タバコに含まれる発癌物質代謝に関連する酵素の遺伝子多型によって肺癌発生リスクの差が説明できるという可能性が検討されてきた。一般に発癌物質はphase I酵素により活性化され、phase II酵素により解毒される。例えば、CYP1A1遺伝子(phase I酵素)のコードン462のvaline型、glutathione-S-transferase(GSTM1)(phase II酵素)の欠損型は数倍程度の肺癌発症リスクに関連していることが示唆されている(図2)。このほかに8-oxoguanine glycosidase I(OGGI)やX-ray cross complementing group 1(XRCC1)など遺伝子修復に関連する遺伝子多型、p53やH-rasなど癌関連遺伝子の多型などについても、肺癌リスクとの関連について多くの検討があるが、その寄与の程度については人種の差の要因などもあり、研究者間での意見が一致しているわけではない

Table 2. Epidemiologic Studies on Familial Segregation of Lung Cancer

Author	Year	Cases and control	Familial risk
Tokuhata	1963	2110 1° relatives of 270 cases	2.6
		1995 1° relatives of 270 controls	3.8 (non-smoker) 2.3 (smoker)
Ooi	1986	2720 1° relatives of 336 cases	2.4 (all relatives)
		2230 1° relatives of 307 controls	4.4 (parents)
Schwartz	1996	2252 1° relatives of 257 non-smoking cases	1.3 (all relatives)
		2408 1° relatives of 277 non-smoking controls	6.1 (relatives of cases age 40-59)
Schwartz	2000	1502 1° relatives of 236 cases under 45	2.1 (all relatives)
		2172 1° relatives of 354 controls under 45	

Schwartz AG, *Lung Cancer*, 2000.

Table 3. Familial Cancer Syndrome

Syndrome	Gene
ASCO group I (Genetic diagnosis is clearly effective)	
Familial adenomatous coli	APC
Multiple endocrine neoplasia 2a	RET
Retinoblastoma	RB1
Von Hippel Lindau disease	VHL
Neurofibromatosis 1	NF1
Neurofibromatosis 2	NF2
ASCO group (Genetic test is not 100% predictive)	
Hereditary non-polyposis colon cancer	MSH2, MLH1, PMS1, PMS2, MSH6
Hereditary breast and ovarian cancer	BRCA1, 2
Li Fraumeni syndrome	p53
Familial melanoma	CDKN2, CDK4

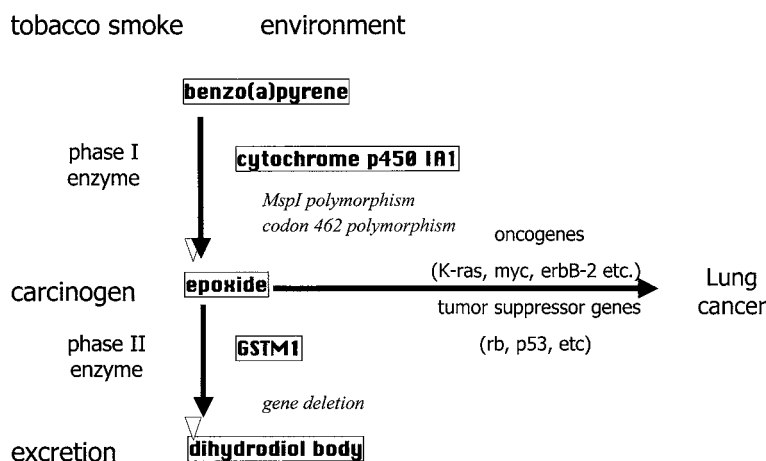


Figure 2. Lung cancer susceptibility and polymorphisms involved in xenobiotic metabolism.

Table 4. Genetic Polymorphism With Possible Association With Lung Cancer

Polymorphisms of genes that are related to metabolism of tobacco carcinogens AhR, CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, CYP2A6, CYP1B1, CYP2C9, GSTM1, GSTpi, GSTT1, MEH, MPO, NQO1, NAT1, NAT2, SULT1A1
Polymorphisms of genes that are related to DNA repair DNA ligase I, ERCC2, OGG1, XRCC1, MnSOD, PADRP
Polymorphisms of cancer-related genes p53, H-ras, L-myc
Miscellaneous polymorphisms DRD2, MMP-1, MTHFR, surfactant protein B

Ref: Ito H, et al. *Gendai-iryō*. 2003; 35: 86-92.

Table 5. Genetic Susceptibility of Lung Cancer and Selected Genetic Polymorphism

Gene	Function	Polymorphism	Odds ratio
CYP1A1	carcinogen activation	Ile462Val	3 (homozygote)
GSTM1	carcinogen detoxification	deletion	1.14 (meta-analysis)
OGG1	8-OHG excision repair	Ser326Cys	3.0 (homozygote)
XRCC1	DNA repair	Arg399Gln	3.26 (homozygote)
MnSOD	superoxide scavenger	Ala16Val	1.67 (homozygote)
H-ras 1	oncogene	VNTR	1.69 (meta-analysis)
L-myc	oncogene	S/S	3.2

Ref: Ito H, et al. *Gendai-iryō*. 2003; 35: 86-92.

(表4, 5). このような研究の嚆矢となったのは, 1984年のAyeshらのdebrisoquine 4-hydroxylationに個人差があり extensive metabolizer と poor metabolizer があって, extensive metabolizer では肺癌のリスクが高いとし

た研究である⁶ この個人差は後にCYP2D6多型によることが示されている.

このようなヒトの単塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNPs) はゲノム全体で数百万であると推定され

- At a rate of 1/1000 bases, there are polymorphisms in DNA sequences among individuals; e.g., 3×10^6 polymorphisms / 3×10^9 bases (genome).
- Basis for disease susceptibility, inter-individual difference in adverse effects of drugs, etc.

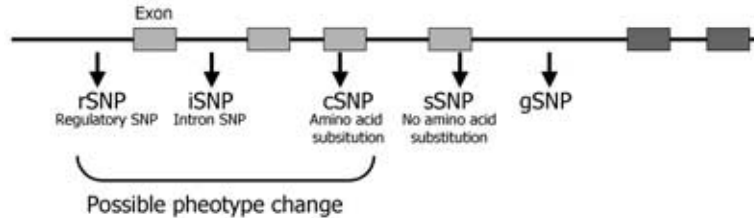


Figure 3. SNPs (single nucleotide polymorphisms)

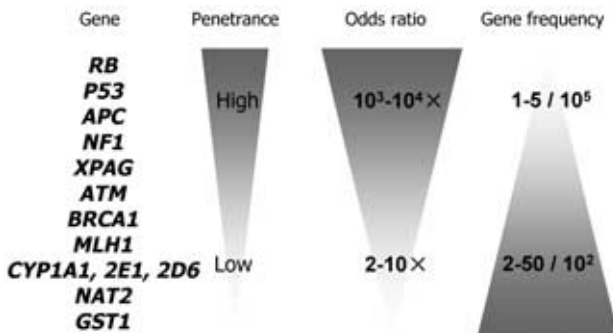


Figure 4. Penetrance, odds ratio and gene frequency in genes related to lung cancer susceptibility.

ており、これらを網羅的に同定しその意義を検証するプロジェクトが現在精力的に進められており、これによって個人レベルでの肺癌リスクがさらに正確に推定できることが期待されている(図3)。ただし、SNPのような多型は集団内での頻度は高いが浸透性(penetrance)が低いために一般にそのオッズ比は数倍程度であり高くない。一方、家族性腫瘍症候群では penetrance は高いが、遺伝子頻度は非常に低くなる。このため、予防医学上への応用には困難が伴うと考えられる(図4)。⁷

微量肺癌細胞の検出

臨床検体中の癌細胞の遺伝子変化を検出して早期発見に役立てようとする試みである。PCRによる遺伝子増幅を行い、従来の検査を凌駕する感度を期待するものである。

肺癌の早期発見を目指して研究に用いられた検体は喀痰、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF), ブラッシング、血液の有核細胞などがある。ま

た、血清や血漿中の可溶性のフリーのDNAは正常者にくらべて癌患者で高濃度であることがもともと知られていたが、これを検体として癌特異的な変化を検出しようとする試みも多くみられる。用いられた遺伝子は、癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子の突然変異、メチル化、過剰発現、LOH、ミトコンドリア遺伝子変異、上皮マーカー、サーファクタント遺伝子の発現、マイクロサテライト不安定性、テロメラーゼ活性などである(表6)。

Sidranskyらは初め、膀胱癌患者の尿中や大腸癌患者の糞便中の ras や p53 遺伝子異常を検出できることを示し注目を集めた。^{8,9} これに続いて、肺癌においては喀痰や気管支肺胞洗浄液などを検体として、遺伝子変異の検出方法に様々な工夫が加えられて同様のアプローチが試みられた。まず、Maoらは、K-ras や p53 遺伝子の点突然変異をもつ肺癌患者において、細胞診のために採取されていた喀痰を retrospective に解析した結果、喀痰内の遺伝子異常は、臨床的に肺癌と診断されるよりも1~13ヶ月前から検出されると報告している(図5)。¹⁰ しかし彼らは、喀痰より抽出したDNAの遺伝子ライブラリーを、切除された腫瘍で検出された突然変異に特異的なオリゴヌクレオチドプローブでハイブリダイズする方法を用いているので、あくまで retrospective な解析であり、この方法をそのまま早期発見に応用することはできない。

Millsらは野生型のK-rasのみを切断する制限酵素処理することで、変異型のK-rasアレルを濃縮する工夫をした enriched PCR法を用いた。¹¹ BALFを検体として検討したところ、52例中の肺癌のBALF中16例でras変異が検出され、これらでは原発巣のras変異と一致しており、30例の非小細胞肺癌以外のBALFでは変異が検出されなかったと述べ、この方法の臨床的有用性を示唆している。¹¹

Table 6. Selected Molecular Markers for Early Detection of Lung Cancer Cells

Specimens	
Sputum, blood (serum soluble DNA, circulating tumor cells) bone marrow aspirate	
Marker genes	
Cancer-related genes	ras, p53, APC, p16, DAPK, etc
Mitochondrial gene	
Epithelial marker	cytokeratin, CEA
Differentiation marker	surfactant apoprotein
Other	telomerase
Genetic change (Over)expression, point mutation, methylation, microsatellite instability	

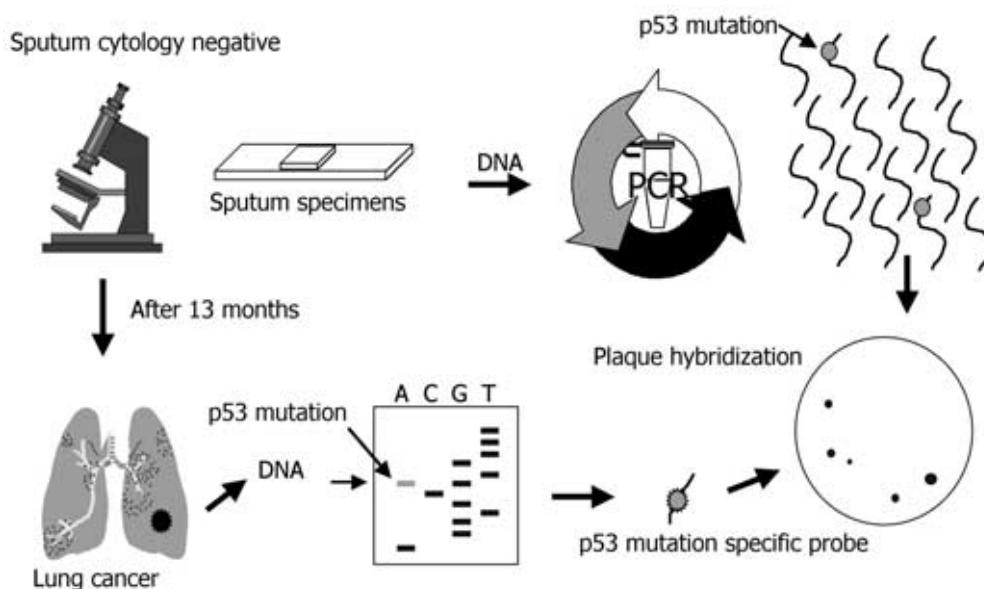


Figure 5. Detection of p53 mutation in sputum preceded clinical detection of lung cancer by as long as 13 months. Ref: Mao L, et. al. *Cancer Res.* 1994; 54: 1634-1637.

マイクロサテライト不安定性(MI)はDNA mismatches修復系の異常であり、通常ゲノム中のCAやGAGなどといった、2~5塩基程度の繰り返し配列の繰り返し回数の異常として検出される。このような異常はmismatch修復系の遺伝子の変異の結果としておこることが多く、この遺伝子の germ line における変異が非ポリポーシスの遺伝性大腸癌の原因であるが、肺癌はこの症候群ではむしろ頻度が少ないことは前述した。マイクロサテライト不安定性の肺癌における頻度は報告者によってまちまちで、従ってその臨床的有用性についても慎重な追試が望まれる。しかし、一部の研究者はこれを、微量な肺癌細胞のマーカーとして利用できると報告している。Miozzoらは5例の小細胞癌を含む51例の肺癌患者の血

清中25例(49%)にMIを検出し、原発巣にMIを認めた5例の症例の術前喀痰標本中3例にもMIが証明できたとしている。¹²

染色体のメチル化は腫瘍抑制遺伝子の不活性化のひとつのメカニズムとして知られている。Estellerらは22例の非小細胞肺癌患者の血清において、p16, death associated protein kinase, glutathione S-transferase P1, O6-methylguanine DNA methyltransferaseのメチル化をメチル化特異的PCR法によって検索した。少なくともひとつの遺伝子のメチル化は15/22(68%)で検出された。また、原発腫瘍にメチル化が認められた15例では11例(73%)に血清DNAのメチル化が検出されたと報告している。¹³ただ、われわれの経験ではメチル化特異的PCR

Table 7. Reports on Detection of Minute Amounts of Lung Cancer Cells in Clinical Specimens

gene	change	specimens	methods	author, year	references
p53	Mut	sputum	PH	Mao, 1994	Cancer Res 54: 1634-1637
	Mut	sputum	Enriched SSCP	Marchetti, 1997	Diagn Molec Pathol 6: 185-191
	Mut	brushing	Enriched PCR	Behn, 1998	Clin Cancer Res 4: 361-371
	Mut	lymph node	PH	Ahrendt, 1997	Clin Cancer Res 3: 1207-1214
	Mut	lymph node	PH	Ahrendt, 2002	J Thorac Cardiovasc Surg 123: 466-474
	Mut	sputum, BALF, brushing	Enriched PCR	Friedl, 2000	J Clin Oncol 18: 3221-3229
	Mut	BALF	PH	Ahrendt, 1999	J Natl Cancer Inst 91: 332-339
	Mut	BALF	DGGE	Ferretti, 2000	Clin Cancer Res 6: 2393-2400
	Exp	lymph node	IHC	Dobashi, 1997	J Thorac Cardiovasc Surg 114: 339-346
K-ras	Mut	sputum	PH	Mao, 1994	Cancer Res 54: 1634-1637
	Mut	sputum	Point EXACCT	Somers, 1998	J Clin Oncol 16: 1061-3068
	Mut	BALF	Enriched PCR	Mills, 1995	J Natl Cancer Inst 87: 1056-1060
	Mut	brushing	Enriched PCR	Behn, 1998	Clin Cancer Res 4: 361-371
	Mut	sputum	Enriched PCR	Yakubovskaya, 1995	Int J Cancer 63: 810-814, 1995
	Mut	lymph node	MLA	Ahrendt, 1997	Clin Cancer Res 3: 1207-1214
	Mut	BALF	DGGE	Ferretti, 2000	Clin Cancer Res 6: 2393-2400
	Mut	sputum, BALF, brushing	Enriched PCR	Friedl, 2000	J Clin Oncol 18: 3221-3229
	Mut	BALF	Enriched PCR	Oshita, 1999	Clin Cancer Res 5: 617-620, 1999
	Mut	lymph node	MLA	Ahrendt, 2002	J Thorac Cardiovasc Surg 123: 466-474
	Mut	BALF	MLA	Ahrendt, 1999	J Natl Cancer Inst 91: 332-339
Mitochondrial DNA (D-loop etc.)	Mut	BALF	PH, MLA	Fliss, 2000	Science 287: 2017-2019
3p25, 13q14.3, p53	LOH	plasma		Allan, 2001	Int J Cancer 91: 359-365
p16	Met	serum	MS-PCR	Esteller, 1999	Cancer Res 59: 67-70
	Met	plasma	MS-PCR	Bearzatto, 2002	Clin Cancer Res 8: 3782-3787
	Met	sputum	MS-PCR	Palmisano, 2000	Cancer Res 60: 5954-5958
	Met	sputum, BALF, brushing	MS-PCR	Friedl, 2000	J Clin Oncol 18: 3221-3229
	Met	BALF	MS-PCR	Ahrendt, 1999	J Natl Cancer Inst 91: 332-339
DAPK	Met	serum	MS-PCR	Esteller, 1999	Cancer Res 59: 67-70
GSTP1	Met	serum	MS-PCR	Esteller, 1999	Cancer Res 59: 67-70
MGMT	Met	sputum	MS-PCR	Palmisano, 2000	Cancer Res 60: 5954-5958
	Met	serum	MS-PCR	Esteller, 1999	Cancer Res 59: 67-70
APC	Met	serum, plasma	MS-PCR	Usadel, 2002	Cancer Res 62: 371-375
EGFR	Exp	blood cell	RT-PCR	DeLuca, 2000	Clin Cancer Res 6: 1439-1444
Telomerase	activity	pleural effusion	TRAP	Yang, 1998	J Clin Oncol 16: 567-573
		BALF	TRAP	Yahata, 1998	J Natl Cancer Inst 90: 684-690
		lymph node	TRAP	Ahrendt, 1997	Clin Cancer Res 3: 1207-1214
Microsatellite instability		sputum		Miozzo, 1996	Cancer Res 56: 2285-2288
		plasma		Chen, 1996	Nature Med 2: 1033-1037
		plasma		Sozzi, 2001	Cancer Res 61: 4675-4678
		BALF		Field, 1999	Cancer Res 59: 2690-2695
		BALF		Liloglou, 2001	Cancer Res 61: 1624-1628
		BALF		Ahrendt, 1999	J Natl Cancer Inst 91: 332-339
Cytokeratin	Exp	bone marrow aspirates	IHC	Pantel, 1996	Lancet 347: 649-653
		bone marrow aspirates	IHC	Cote, 1995	Ann Surg 222: 415-425
		bone marrow aspirates	IHC	Ohgami, 1997	Ann Thorac Surg 64: 363-367
		bone marrow aspirates	IHC	Osaki, 2002	J Clin Oncol 20: 2930-2936

Cytokeratin		blood cell lymph node lymph node lymph node lymph node lymph node lymph node	RT-PCR IHC IHC IHC IHC IHC IHC	Krisman, 1995 Chen, 1993 Passlick, 1996 Izbicki, 1996 Passlick, 1994 Maruyama, 1997 Osaki, 2002	J Clin Oncol 13: 2769-2775 J Natl Cancer Inst 85: 493-498 Ann Thorac Surg 61: 177-183 J Thorac Cardiovasc Surg 112: 623-630 J Clin Oncol 12: 1827-1832 J Thorac Cardiovasc Surg 114: 535-543 J Clin Oncol 20: 2930-2936
Surfactant apoprotein	Exp	lymph node	RT-PCR	Betz, 1995	Cancer Res 55: 4283-4286
CEA	Exp	blood cell	RT-PCR + dot blot	Castaldo, 1997	J Clin Oncol 15: 3388-3393
	Exp	blood cell	RT-PCR	Kurusu, 1998	J Thorac Cardiovasc Surg 116: 107-113
	Exp	blood cell	RT-PCR	Yamashita, 2000	J Thorac Cardiovasc Surg 119: 899-905
	Exp	blood cell	RT-PCR	Yamashita, 2002	J Thorac Cardiovasc Surg 124: 299-305
	Exp	lymph node	RT-PCR	D Cunha, 2002	J Thorac Cardiovasc Surg 123: 484-491
hnRNP	Exp	sputum	IHC	Mulshine, 2000	Cancer 89 (Suppl) 2465-2467

PM: point mutation, Met: methylation, Exp: expression, PH: Plaque hybridization, MLA: mismatch ligation assay, DGGE: Denaturant gradient gel electrophoresis, IHC: Immunohistochemistry, Point EXACCT: point mutation detection using exonuclease amplification coupled capture technique, MS=PCR: methylation specific PCR, TRAP: telomeric repeat amplification protocol, BALF: bronchoalveolar lavage fluid.

はプライマーの設定や PCR の条件によっては非特異的なバンドでもやすく、さらなる検討が必要と思われる。

これまで、肺癌の遺伝子診断を目的として検討されてきた検体と遺伝子異常についての代表的な研究を表 7 にまとめた。これらの研究で明らかとなったことは以下の項目に集約することができる。1) 分子生物学的手法、特に PCR による遺伝子増幅法を用いると、細胞学的あるいは組織学的には癌細胞を検出できない検体から高感度に癌を発見でき、早期診断や高精度な病期診断が可能であり、これを反映した臨床的相関が認められる。2) しかし、いずれの場合も感度が高くなれば偽陽性率が高くなる可能性がある。画像診断の進歩などとリンクしていなければ遺伝子異常を検出するのみでは具体的な治療計画がたてにくい。3) また、臨床的病理学的に癌とは診断できない前癌病変やあるいは曝露された正常細胞にも癌と同様な遺伝子変化がすでにおこっていることも報告されており^{14,15} 遺伝子変化の検出のみで癌と診断できない可能性がある。4) また、免疫染色はともかく、核酸を検出する系では一般臨床に持ち込むには手間がかかりすぎると思われる。

プロテオミクス研究の診断への応用

最近では血漿蛋白のマスマスペクトロメトリーによる包括的解析による癌の診断の研究が行われるようになった。例えば卵巣癌で高い感度や特異度が報告されている。まず training 検体(卵巣癌 50 例と 50 例の対照)をもちいて癌を鑑別するプロテオミックパターンを得た。これを別の 116 例の検体(50 例の卵巣癌と 66 例の良性卵巣疾患)にあてはめ癌の診断がどの程度可能かが調べられた。

その結果、50 例の卵巣癌患者の血清はすべて癌と診断され、66 例の良性卵巣疾患患者の血清のうち 60 例は非癌と診断された。すなわち、感度 100%、特異度 95%、陽性的中率 94% という驚異的な結果であった¹⁶。血清の保存状態によるパターンの差、機械が異なった場合の再現性などまだ問題は多かるうが、今後の発展が期待される手法であろう。

おわりに

ヒトゲノムプロジェクトに伴い遺伝子に関する情報が飛躍的に増加し、一度に数万という遺伝子やタンパク質を高分解能で解析できる技術革新もおこり、現在の肺癌に対するアプローチは劇的に変化する局面を迎えているといえるであろう。しかし、このような知見を集検の効率化に結びつけるには、検診所見と生活習慣などの疫学データと良質な検体を蓄積していくことがなによりも重要であろう。検診に携わる人々と基礎研究室との緊密な協力体制の下、新しい知見の有用性を批判に耐える形で最終的に臨床試験という形で検証していくことが重要であろう。

REFERENCES

1. Schwartz AG. Genetic susceptibility to lung cancer. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, et al. *Lung cancer*. 2nd eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000;389-397.
2. Tokuhata GK, Lilienfeld AM. Familial aggregation of lung cancer in humans. *J Natl Cancer Inst*. 1963;30:289-312.
3. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer

- analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000;343:78-85.
- 4 . Braun MM, Caporaso NE, Page WF, et al. Genetic component of lung cancer: cohort study of twins. *Lancet*. 1994; 344:440-443.
 - 5 . Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*. 2000;119:1447-1453.
 - 6 . Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, et al. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature*. 1984;312:169-170.
 - 7 . Shields PG, Harris CC. Cancer risk and low-penetrance susceptibility genes in gene-environment interactions. *J Clin Oncol*. 2000;18:2309-2315.
 - 8 . Sidransky D, Eschenbach AV, Tsai YC, et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*. 1991;252:706-709.
 - 9 . Sidransky D, Tokino T, Hamilton S, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science*. 1992;256:102-105.
 - 10 . Mao L, Hruban RH, Boyle JO, et al. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res*. 1994;54:1634-1637.
 - 11 . Mills NE, Fishman CL, Scholes J, et al. Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer diagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1056-1060.
 - 12 . Miozzo M, Sozzi G, Musso K, et al. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res*. 1996;56:2285-2288.
 - 13 . Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients [published erratum appears in Cancer Res. 1999;59:3853] *Cancer Res*. 1999;59:67-70.
 - 14 . Mao L, Lee JS, Kurie JM, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:857-862.
 - 15 . Wistuba II, Lam S, Behrens C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:1366-1373.
 - 16 . Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*. 2002;359:572-577.