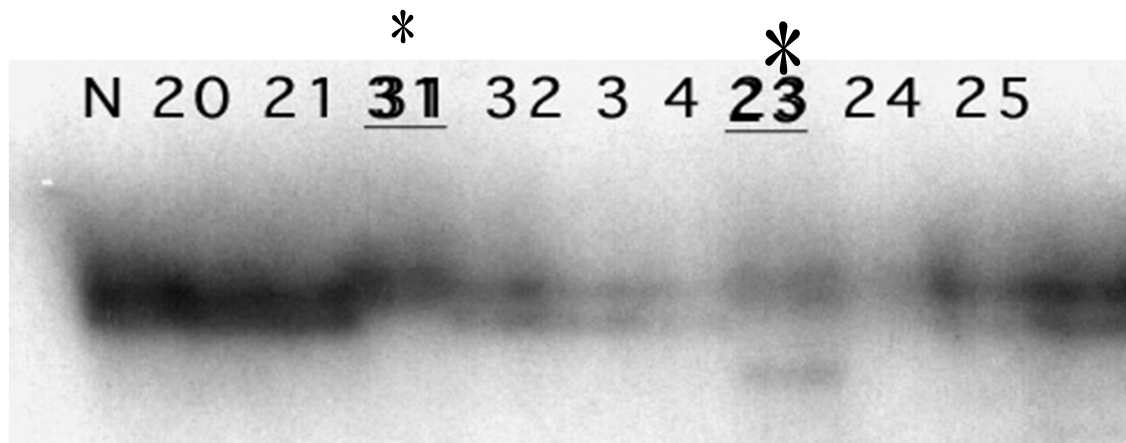


1-a 肺癌の発癌の分子生物学的解明に関する研究 - 吸入発癌物質の発癌過程の解明 -

- 私たちは、今までにクロム酸塩に暴露したクロム工場労働者に発生した肺癌（ヒトクロム肺癌）の遺伝子異常について研究してきた。
- クロム肺癌では、通常の肺癌に多く認められる癌抑制遺伝子p53、癌遺伝子Ki-ras, Ha-rasの遺伝子異常の頻度は少なく(Biochem Biophys Res commun 239: 95-,1997、Am J Ind Med 40:92-,2001)、第3染色体短腕3pのLOHは同程度であった(Mol Carcinogenesis 33:172-,2002)。
- しかし、microsatellite instability (MSI)は高頻度で、MSIの頻度とクロム暴露癌の間に相関を認めた(Mol Carcinogenesis 33:172-,2002)。MSIとDNA修復遺伝子hMLH1蛋白の発現の低下との間に相関を認め、hMLH1蛋白の発現の低下がhMLH1遺伝子のプロモーター領域のメチル化に由来していることを示した(Mol Carcinog 42:150-,2005)。
- クロムの発癌においては、DNA修復遺伝子hMLH1遺伝子のメチル化→蛋白の発現の低下→MSIの増強→癌関連遺伝子の異常、というpathway (hereditary nonpolyposis colon cancer: HNPCCや散发性の大腸癌の約15%の発癌過程)が示唆された。
- クロム肺癌において、癌関連遺伝子(hMLH1, APC, MGMT, p16)のDNAメチル化が多いことを報告した(Mol Carcinog, 50:89-99, 2011)。

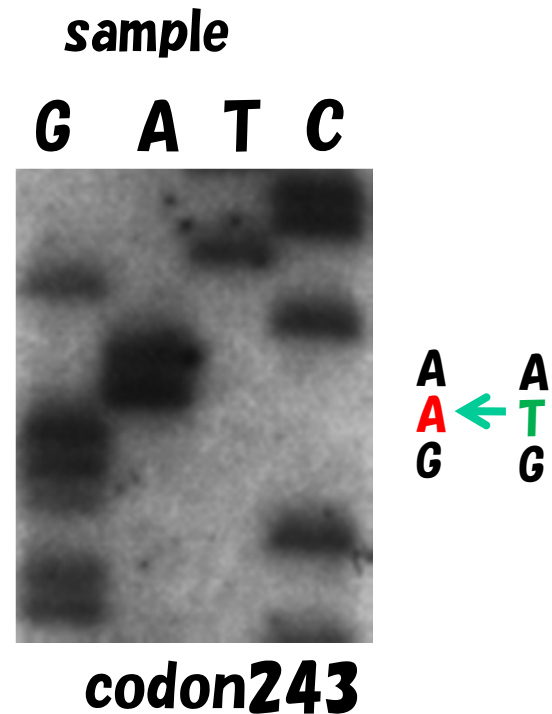
Analysis of PCR-SSCP and Direct sequencing analysis for p53 gene

PCR-SSCP of exon 7 region of p53 gene



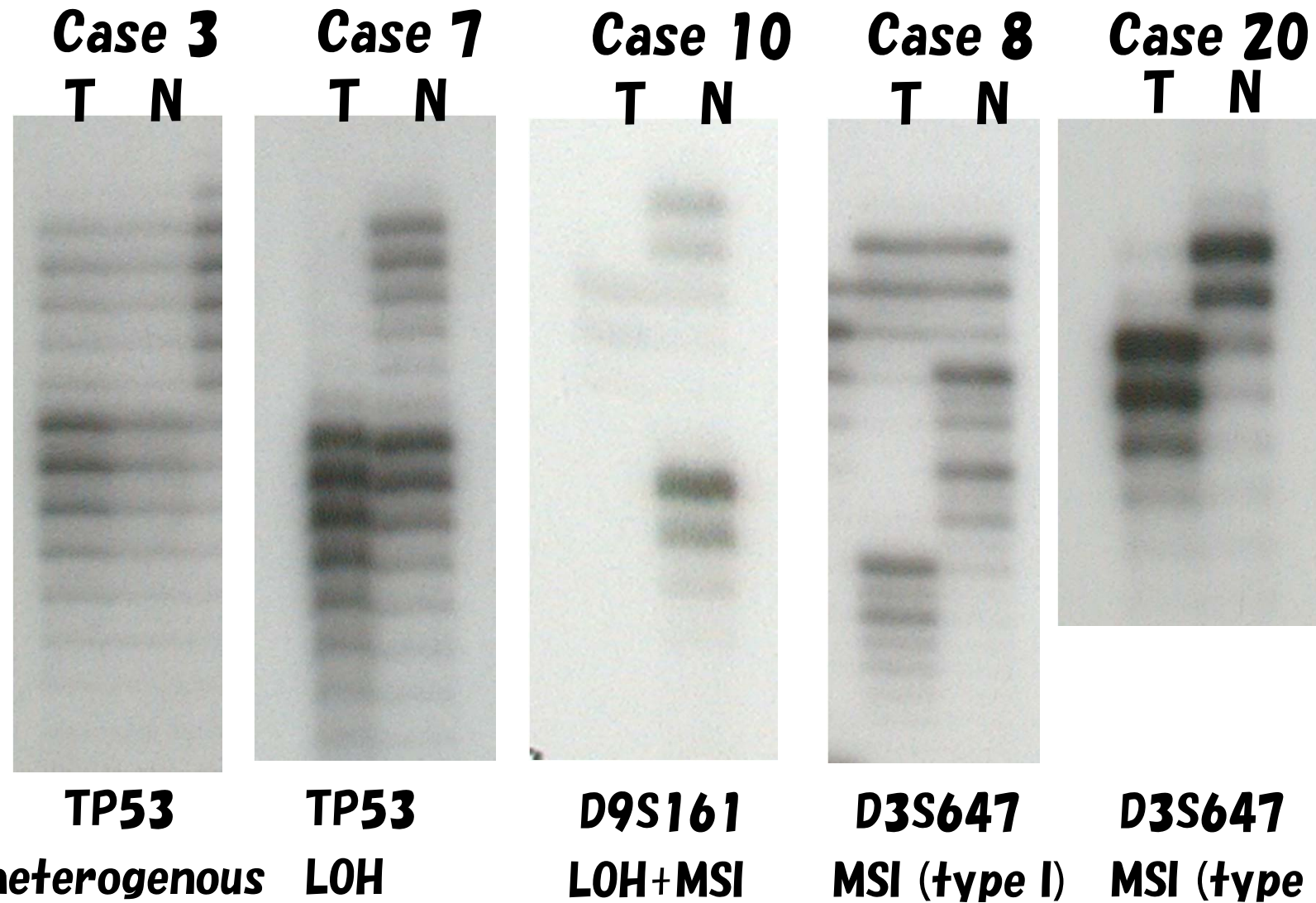
N: normal lung tissue

Direct sequencing of exon 7 in sample 31



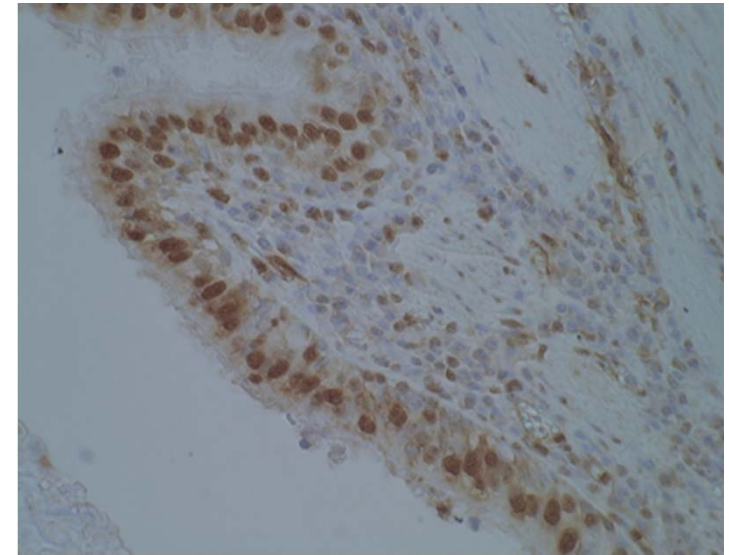
codon243

各腫瘍よりDNAを抽出し、p53遺伝子に特異的なprimerを使用し、PCRにて増幅し、SSCP法にて点突然変異を検索した。SSCP法にて異常の見られた腫瘍に関してはdirect sequencing法にて塩基配列を決定した。サンプル23および31は、SSCP法にて移動度が異なり、サンプル31では、exon 7のcodon243にATG→AAGの点突然変異を認めた。



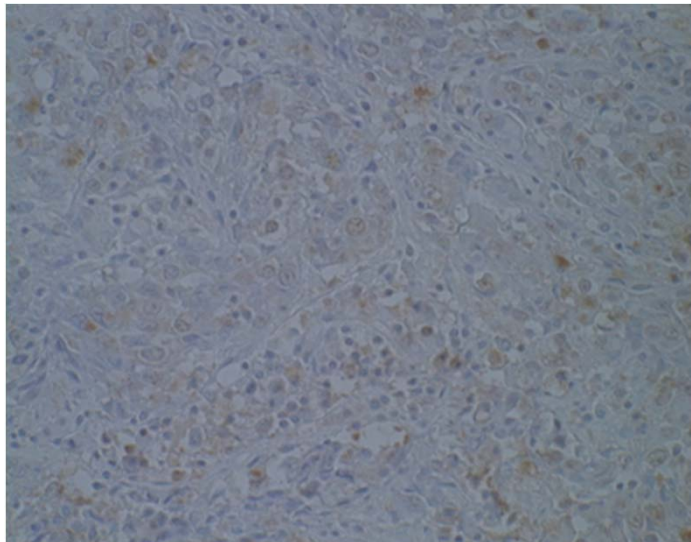
Case 3は正常、case 7は腫瘍(T)の一方のアレルがないため、LOHと判断した。Case 10は、腫瘍の一方のアレルがなく、そのアレルの移動度が正常(N)と異なるため、LOH+MSIとした。Case 8, case 20も腫瘍のアレルの移動度が異なるためMSIと判定した。

Immunohistochemical staining of hMLH1 antibody for normal lungs, chromate lung cancers, and non-chromate lung cancers.

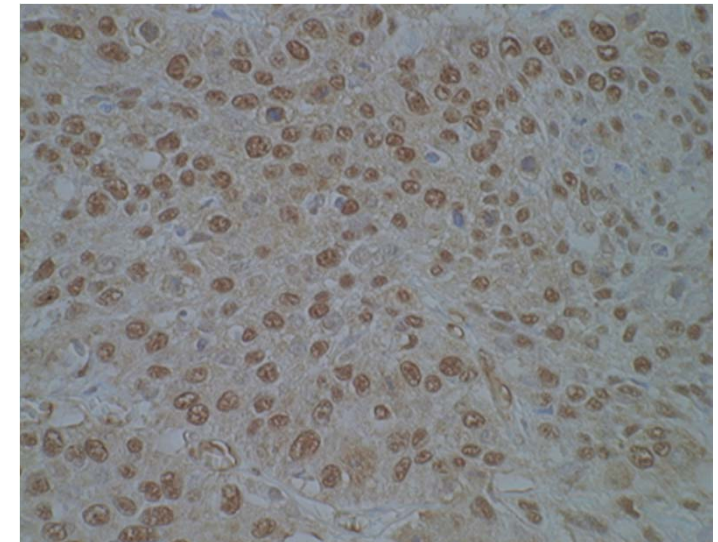


Normal bronchi

chromate lung cancer: scant

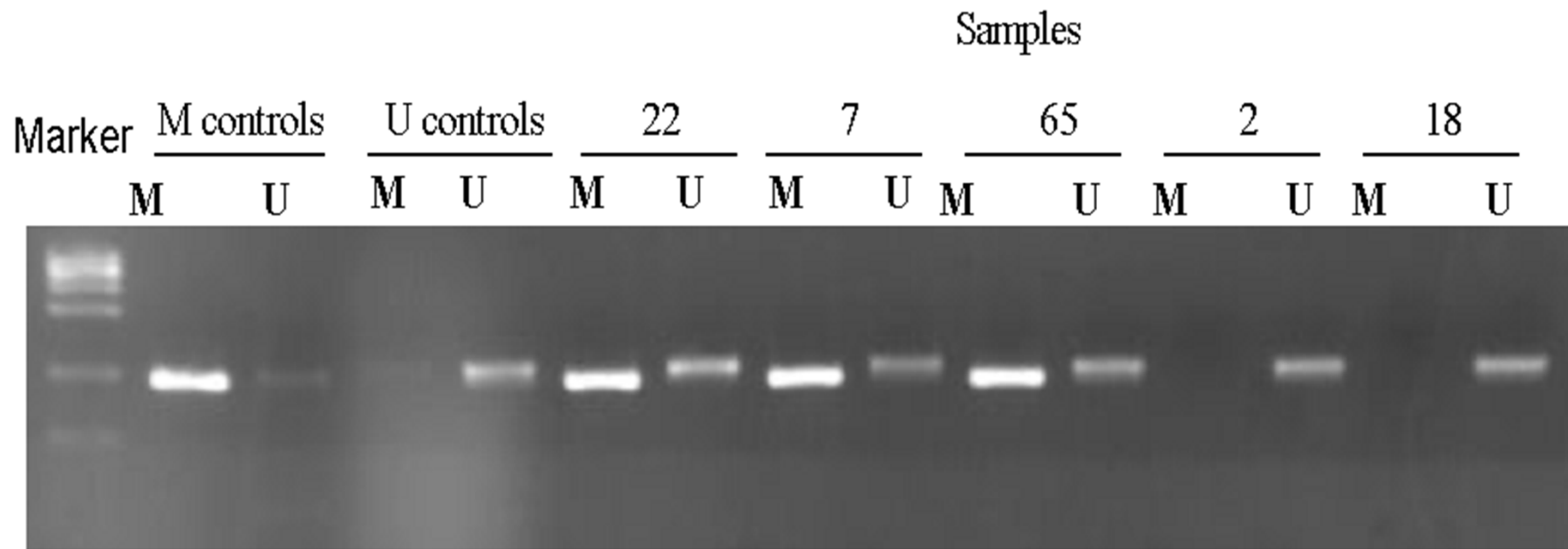


chromate lung cancer: diffuse



RER(replication error)の原因として最も考えられるDNA修復蛋白hMLH1の発現を免疫染色法にて検討した。正常気管支上皮の核はhMLH1が強く発現していた。非クロム肺癌では全例hMLH1の発現をびまん性に強く認めた。クロム肺癌では、hMLH1の発現が低下する症例を認めた。

Representative samples of nested-MSP analysis for hMLH1 gene in chromate lung cancer.



クロム肺癌のDNA修復遺伝子hMLH1のpromoter領域のメチル化を検索した。Bisulfate処理を施行し、first PCR施行し、PCR productを500倍希釈し、2nd PCR施行した。メチル化、非メチル化にそれぞれに特異的なprimerを使用し、PCRを行った。サンプル22, 7, 65はメチル化に特異的なバンドを認め、メチル化ありと判定した。サンプル2, 18はメチル化なしと判定した。

ヒトクロム肺癌の遺伝子変化

クロム肺癌 非クロム肺癌*

• 癌抑制遺伝子p53 (mutation)	20%	50%
• 癌遺伝子K-, H-ras (mutation)	0%	(infrequent)
• 染色体3番短腕欠失 (3p LOH)	61%	70%
• 癌抑制遺伝子Fhit (蛋白低下)	52%	(87%)
• 遺伝子不安定性 (microsatellite instability)	79%	15%
• DNA修復遺伝子hMLH-1 (蛋白低下)	56%	20%
• DNA修復遺伝子hMLH-1 (メチル化)	28%	0%
• P16のメチル化	33%	26%
• MGMTのメチル化	20%	20%
• APCのメチル化	86%	44%

*扁平上皮癌、() 他施設のデータ

Publications

- K. Kondo, et al. Mutations of the p53 gene in human lung cancer from chromate-exposed workers. *Biochem Biophys Res Commun* 239: 95-100, 1997.
- A. A. Ewis, K. Kondo, et al. Occupational cancer genetics: infrequent ras oncogenes point mutations in lung cancer samples from chromate workers. *Am J Ind Med.* 40:92-7, 2001.
- T. Hirose, K. Kondo, et al. Frequent microsatellite instability in lung cancer from chromate-exposed workers. *Mol Carcinog* 33:172-180, 2002.
- Kondo K, et al. Microscopic analysis of chromium accumulation in the bronchi and lung of chromate workers. *Cancer.* 98:2420-9, 2003.
- Y. Takahashi, K. Kondo, et al. Microsatellite instability and protein expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1, of lung cancer in chromate-exposed workers. *Mol Carcinog* 42:150-8, 2005.
- Takahashi Y, Kondo K, et al. Microscopic analysis of the chromium content in the chromium-induced malignant and premalignant bronchial lesions of the rat. *Environ Res.* 99:267-72, 2005.
- K. Kondo, et al. The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer.* 53:295-302, 2006.
- Abdellah Hamed Khalil Ali, K. Kondo, et al. Aberrant DNA Methylation of Some Tumor Suppressor Genes in Lung Cancers from Workers with Chromate Exposure. *Mol Carcinog* 50:89-99, 2011