

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト肺癌で過剰なメチル化を受ける遺伝子の
ゲノムワイドスキャンによる同定

指導教官 森田 寛 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 高井 大哉

脊椎動物において、CpG 配列のシトシンは可逆的にメチル化、脱メチル化が行われ、転写調節領域の CpG 配列に富んだ部分 (CpG アイランド) のメチル化が行われる事により、多くの遺伝子が発現の制御を受けていると考えられている。ヒトの約 10 万の遺伝子のうち、その約半数は CpG アイランドを伴っており、それらの発現は CpG アイランドのメチル化によって調節されている。

以前よりヒトの癌において、ゲノム全体ではメチル化シトシンの量が減る一方、いくつかの遺伝子では正常組織では認められない異常なメチル化を示し、その発現が抑制されていることが知られていた。最近になり *p16*, *RB* といった癌抑制遺伝子のメチル化による不活化が多くの腫瘍で観察され、これらのエピジェネティックな変化は癌化の一部分を担っていることが明らかにされた。

今日までに 20 を超える遺伝子でそのメチル化による不活化がヒトの様々な臓器の癌で報告されている。これらの研究は既知の遺伝子に対して行われているが、未だ癌における遺伝子変化がすべて解明されたとは言い難い。申請者の所属した研究室では、癌化に関連する遺伝子で、メチル化による不活化を受けている遺伝子がまださらに存在すると考え、以前メチル感受性制限酵素を用いてゲノムのサブトラクションを行う、*methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)* 法を開発し、報告した。今回申請者は、より多くの CpG アイランドを同定できるように改良した MS-RDA 法を、ヒト正常気管上皮初代培養細胞 (NHBE) およびヒト扁平上皮肺癌細胞株に対して用いることで、ヒト肺癌で過剰にメチル化される CpG アイランド由来の領域を同定し、2つの遺伝子がヒト肺癌で過剰にメチル化を受け、その発現が低下していることを報告する。

方法は、NHBE およびヒト扁平上皮肺癌細胞株 EBC-1 および LK-2 よりゲノムを抽出し、メチル感受性制限酵素 *HpaII* で消化後、*reverse electrophoresis* で NHBE は 100-500bp を分画、肺癌細胞株は 50-600bp を分画、*universal adaptor* をライゲーションした後、PCR により増幅し、これらの PCR 産物の間で 2 回のサブ

表 1 ヒト肺癌で過剰なメチル化を受ける CpG クローン

	Length	%(G+C)	CpG score	CpG island	Repeat sequence	Database	Locus
†A6	338	55.9	0.7	Yes		cDNA clone / NCI CGAP synovial sarcoma(AA601089)	
†A11	363	54.0	0.6	Yes		cDNA clone / NCI CGAP gastric tumor(AA594171)	
§B1	391	41.7	1.1	partial		Human genome clone(AC005631)	
†B2	447	51.7	0.5	partial	LINE2	cDNA clone / NCI CGAP breast tumor(AA505260)	
†B3	414	54.1	0.4	partial		<i>Endothelin-1</i> /Exon2	6p24
C9	427	50.8	0.6	Yes		no homology	
†D3	439	46.7	0.6	partial		<i>Protocadherinγ-a12</i> /Exon1	5q31
§E10	412	51.5	0.9	Yes		Human genome clone(AC002407)	X
E11	341	47.2	0.6	partial		no homology	
§F2	476	43.5	0.5	partial		Human genome clone(AL034451)	6q23.2-24.2
F6	439	42.6	0.9	partial		no homology	
§F8	452	46.2	0.6	partial	LINE2/MER63	Human genome clone(AQ020128)	
†F12	457	38.3	0.5	partial		<i>MEIS1</i> /Exon	2p14
†G4	484	53.5	0.5	partial		<i>Collagen12-α1</i> /Exon2	6q12-13
G8	421	48.5	0.5	partial		no homology	
§H6	388	51.6	0.6	Yes		Human genome clone(AL049595)	6q13-14.3
§H10	430	47.4	0.9	partial		Human genome clone(AQ209736)	

34 の DNA 断片中, 200bp について, G:C コンテント, CpG スコアについて計算し, 17 のクローンが CpG アイランドの条件を満たした, あるいは近傍に CpG アイランドが存在した. データベースサーチの結果, 7つのクローンの一部は4つの既知の遺伝子および cDNA に一致し(†), 6つのクローンはヒトゲノムのクローンに一致した(§).

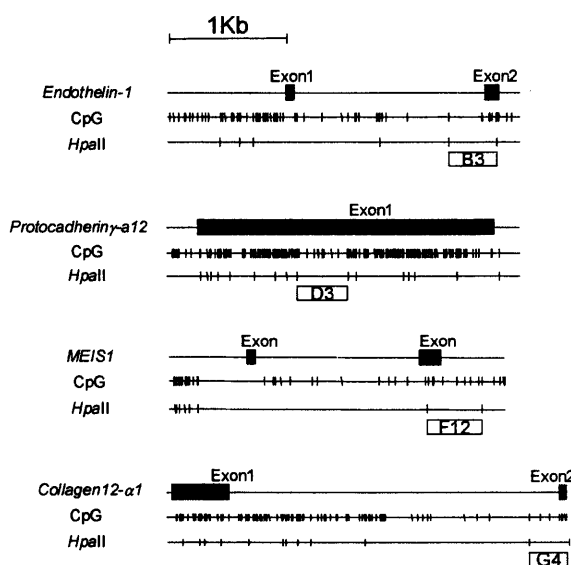


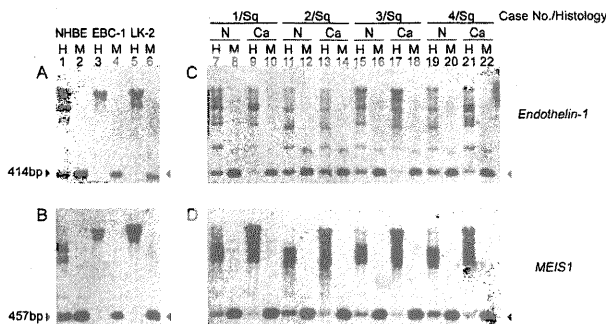
図 1 MS-RDA で同定された肺癌細胞で過剰にメチル化される DNA 断片 (白い長方形) と, 遺伝子 (exon を黒い長方形で示した) の物理地図. CpG, *HpaII* の短い縦線はそれぞれ CpG 配列, *HpaII* 認識配列を示す.

トラクションを行った. サブトラクション後の PCR 産物をプラスミドにサブクローニングし, コンピテントセルにトランスフォーメーションし, プラスミドのマルチプルクローニングサイトをはさむ PCR によりインサートを確認, これらのクローンの独立性を検討し, 肺癌細胞株で過剰にメチル化される 59 個の DNA 断片を同定した. ヒト扁平上皮肺癌 5 例について癌と周辺の非癌部でこれらの DNA 断片のメチル化の状態を検討した結果, 5 例中 2 例以上で癌で過剰なメチル化を受ける断片が 34 個同定された. これらの DNA 断片について塩基配列を決定し, CpG アイランドの条件である GC 含有量, CpG スコアを求めた. 17 の DNA 断片が, CpG アイランドの条件を満たす, あるいは近傍に CpG アイランドが存在することが GenBank のデータベースサーチにより明らかになった(表 1). またこれらの DNA 断片には, 4 つの既知の遺伝子すなわち, *MEIS1* (the

human homolog of a murine leukemogenic homeobox gene), *endothelin-1*, *collagen12- α 1* および *protocadherin- γ -a12*, 3 つの cDNA が含まれることが明らかになった(図 1).

原発性肺癌 25 例(扁平上皮癌 13 例, 腺癌 12 例)についてこれらの4つの遺伝子について, その領域のゲノムのメチル化および発現について検討したところ, *endothelin-1* では 25 例中 13 例で, *MEIS1* は 25 例中

図 2 *Endothelin-1* および *MEIS1* のメチル化の状態. NHBE および肺癌細胞株(A, B), 肺癌(Ca)および周辺非癌部(N)について, ゲノム DNA を *HpaII*(H)および *MspI*(M)で消化した後, *Endothelin-1* に対しては, B3(414bp)を *MEIS1* については F12(457bp)をプローブとしてハイブリダイズした. Sq: squamous cell carcinoma



21 例で, 周辺非癌部と比較して, 癌において過剰なメチル化および発現の低下が認められた(図 2, 図 3, 表 2). *Collagen12- α 1* および *protocadherin-12* については, 腫瘍および周辺非癌部との間でメチル化および発現の明らかな違いは認めなかった.

扁平上皮肺癌細胞株 LK-2 では, *Endothelin-1* はメチル化により, 完全に発現は抑制されていたので, 5 μ M の脱メチル化剤 5-*aza-2'*-dC で細胞を処理, メチル化の状態, および発現について検討を行ったところ, *endothelin-1* のメチル化の低下に伴って発現が認められた(図 4).

Endothelin-1 については市販の抗体が利用可能であったため, *endothelin-1* の過剰なメチル化および RT-PCR で発現の低下がみられ, 比較的時間質の量が少なかった 3 例で *endothelin-1* の発現を免疫染色でも検討した. 3 例いずれも気管支上皮, 肺胞上皮, マクロファージ, そして血管内皮に *endothelin-1* の発現を認めたが, 腫瘍では発現が認められないか, 著明に低下していた(図 5).

Endothelin-1 は血管収縮物質として発見されたが, 近年までに様々な生理作用を有することが報告されている. ヒトメラノーマ細胞株 A375 では *endothelin-1* によりアポトーシスが誘導されることが報告されている. また, ヒト前立腺癌では *endothelin* 受容体 B の発現が低下していることが報告されていたが, それはプロモーター領域の過剰なメチル化によるものであることが新たに報告された. このように *endothelin-1* は受容体 B を介して, 細胞増殖の抑制やアポトーシスを一部の細胞には誘導することが報告されており, *endothelin-1* のメチル化による発現低下は癌にとっては細胞増殖の調節・アポトーシスからの逸脱という意味では合目的であるとも考えられる.

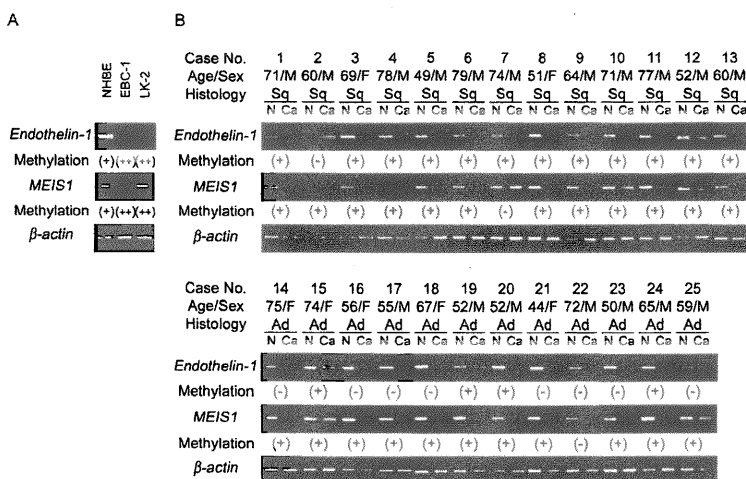


図 3 NHBE と肺癌細胞株(A)と, 肺癌臨床例 25 例(B)での周辺非癌部(N)および癌(Ca)における *endothelin-1* および *MEIS1* の発現. β -actin をコントロールに RT-PCR 法にて発現をみた. *Endothelin-1* は過剰なメチル化を認めた 16 例中 13 例で, *MEIS1* は過剰なメチル化を認めた 23 例中 21 例で発現の低下を認めた. Sq: squamous cell carcinoma, Ad: adenocarcinoma.

表 2 ヒト肺癌における *endothelin-1* および *MEIS1* のメチル化の状態および発現レベル。

Case No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
Histology	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Sq	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad	Ad		
Age	71	60	69	78	49	79	74	51	64	71	77	52	60	75	74	56	55	67	52	52	44	72	50	65	59		
Sex	M	M	F	M	M	M	M	F	M	M	M	M	M	F	F	F	M	F	M	M	F	M	M	M	M		
<i>Endothelin-1</i>	Aberrant methylation	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	
	Repression	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>MEIS1</i>	Aberrant methylation	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	Repression	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sq: squamous carcinoma, Ad: adenocarcinoma.

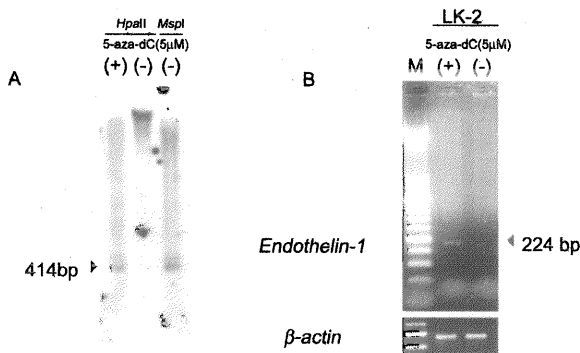
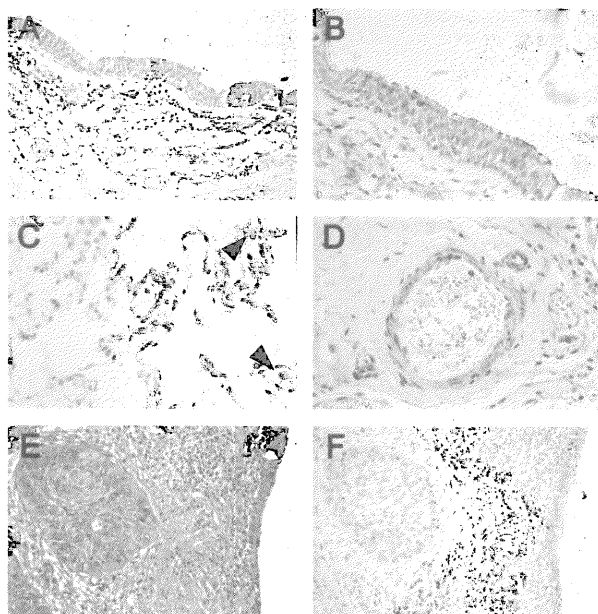


図 4 5-aza-dC による *endothelin-1* 遺伝子の脱メチル化と再発現. (A)ゲノム DNA のサザンブロットによる解析. 5-aza-dC 処理により 414bp のバンドの出現が認められる. (B)RT-PCR による発現の確認. 5-aza-dC 処理により *endothelin-1* の再発現を認める. コントロールとして β -actin を用いた.

この一方で *MEIS1* は TALE (three amino acid loop extension) ファミリーに属するホメオボックス遺伝子として発見された遺伝子で, *PBX2*あるいは *HOXA9*というほかのホメオボックス遺伝子産物と骨髄系の細胞においてヘテロダイマーを形成することが知られている. これまでのところ, ヒトを含めて肺においてその機能は不明である. 興味深いことに, ほかのメチル感受性のゲノムワイドスキャンでも同様にホメオボックスのメチル化についても報告している. ホメオボックス蛋白が細胞の分化に果たす働きと考え合わせると, メチル化によりホメオボックス遺伝子が不活化されることにより, 細胞の分化の状態が変わることが, 様々な臓

器における癌化について何らかの関与をしている可能性がある.

以上のように申請者は改良 MS-RDA 法により, ヒト正常気管上皮初代培養細胞および扁平上皮肺癌細胞



株から, ヒト肺癌において過剰にメチル化を受ける 17 の DNA 断片を単離した. これらの断片がオーバーラップした遺伝子のうち, *endothelin-1* および *MEIS1* は, ヒト原発性肺癌 25 例の検討でそれぞれ 13 例, 21 例で過剰なメチル化および発現の低下を認めた.

図 5 免疫組織染色法による *endothelin-1* の腫瘍組織による発現低下. パラフィン切片を anti-*endothelin-1* モノクローナル抗体を用いて, ABC 法にて染色. 正常気管支上皮(A, 200x, B, 400x)の刷子縁に強い染色性を認める. 肺胞上皮(C, 400x), マクロファージ(C, 矢頭)および肺動脈の血管内皮細胞(D, 400x)にいずれも染色性を認める. これに対して扁平上皮癌(連続切片, E:HE 染色, F: 免疫組織染色いずれも 200x)では正常気管支上皮に対して非常に弱い染色性しか認めない.