

## 論文の内容の要旨

論文題目：Promoter methylation of the *TSLC1* gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines.

和訳：進行肺がん及び種々のがん細胞株におけるがん抑制遺伝子 *TSLC1* のプロモーターメチル化の検討

指導教官：高本 眞一教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名： 深見 武史

要旨：がん抑制遺伝子 *TSLC1* による腫瘍抑制の分子機構の解明を研究課題とした。*TSLC1* は immunoglobulin superfamily に属し、細胞接着に関与する分子である。また、いくつかの非小細胞肺癌細胞株において *TSLC1* の発現の消失はプロモーターメチル化に強く関与している。

そこで 48 例の非小細胞肺癌の手術標本から得た DNA を用い、重亜硫酸処理後 SSCP と重亜硫酸処理後塩基配列決定を用いて、*TSLC1* のプロモーター領域のメチル化の状態を調べた。腫瘍径 3cm より大きな癌で *TSLC1* のプロモーター領域のメチル化が起きており、さらにメチル化している腫瘍では *TSLC1* の発現の消失あるいは低下していることが RT-PCR によって示唆された。非小細胞肺癌以外の細胞株においても、*TSLC1* の発現の欠如とプロモーター領域のメチル化が高頻度に認められた。

目的：ヒトのがんは、複数の遺伝子異常を伴う多段階の変化を経て発生、進展することが知られている。これらの遺伝子のなかで、特に第 11 染色体長腕(11q23)上に存在する非小細胞肺がんのがん抑制遺伝子 *TSLC1* が、国立がんセンター研究所の村上らのグループで同定された。この遺伝子は、肺腺癌細胞 A549 のヌードマウス皮下における腫瘍原性の抑制機能を指標として同定された。その遺伝子産物は NCAM と相同性を示す膜蛋白質で、ほぼすべての組織でその発現を認めるが、非小細胞肺癌を含む様々な培養がん細胞の約半数では遺伝子発現の欠如、ないし著明低下を認める。また、ヒト原発性肺腺癌、肝細胞癌、膵癌等で、ヘテロ接合性の消失と、点突然変異、或いはプロモーター領域のメチル化による 2 ヒットの不活化を認める。11q23 の LOH は他のがんでも認められることから、様々ながんでのプロモーターメチル化の実態を明らかにし、*TSLC1* の不活化の分子機構とがん化における意義を検討した。

材料及び実験方法：

(1) 腫瘍材料および細胞株

48 例の原発性非小細胞肺癌症例より切除され、病理学的に診断された癌部および非癌部より抽出された核酸を検討に用いた。

様々な培養がん細胞株として 10 種の肺小細胞癌、3 種の食道癌、9 種の胃癌、8 種の大腸癌、3 種の乳癌、5 種の卵巣癌、2 種の子宮癌、1 種の平滑筋肉腫、5 種の骨肉腫を使用した。

#### (2) ノーザンプロット解析と RT-PCR

正常ヒトの脳と肺から抽出された poly(A)<sup>+</sup> RNA とヒト  $\beta$  actin の cDNA は Clontech 社より購入した。様々な細胞株および手術症例より得られた標本から poly(A)<sup>+</sup> RNA を抽出した。TSLC1 を同定するために、411-1371 塩基に相当する 961bp の PCR 断片をプローブに用いた。PCR は Advantage Klen Taq DNA polymerase を用い、TSLC1 用プライマーとヒト  $\beta$  actin 用プライマーにて増幅させた。

#### (3) 重亜硫酸処理後塩基配列決定

ゲノム DNA を NaOH(0.3M) にて変性後、pH5.0 の Sodium bisulfite(3.1M) と hydroquinone(0.8mM) にて 55°C20 時間保温した。精製後の修飾 DNA を initial codon のメチオニンとなる最初のアデニンより-458 から-366 塩基上流に相当する 93 塩基 DNA 断片に関して PCR 増幅した。この PCR 産物をサブクローン化し、少なくとも 4 クローン以上の塩基配列決定を行った。

#### (4) 重亜硫酸処理後 SSCP 解析

重亜硫酸処理は同様に行い、PCR 増幅時に Texas-Red にて末端ラベル化されたプライマーを用い、電気泳動は 20°C120 分にて行った。

#### (5) LOH 解析

第 11 染色体長腕 23.2 上の 5 つの遺伝子マーカーである D11S1256, D11S4111, D11S1235, D11S2077, D11S1885 を Texas-Red にて末端ラベルされたプライマーを用いて PCR 増幅し、電気泳動 45°C120 分にて行った。

#### (6) 5-aza-2'-deoxycytidine による TSLC1 発現の回復

$1 \times 10^5$  個の細胞を播き、それから 2, 5, 8 日目に 24 時間 10  $\mu$ M の 5-aza-2'-deoxycytidine を加えた。その後、RNA を回収し RT-PCR を行い、発現の回復を調べた。

### 結果：

#### (1) 重亜硫酸処理 SSCP 解析による TSLC1 のプロモーターメチル化の検出

TSLC1 プロモーター領域の上流に存在する CpG 島内の 6 箇所の CpG 部位の高メチル化が TSLC1 の発現の消失と強く関わっていることは重亜硫酸塩基配列決定にて示されているが、この断片のメチル化の状態を効率的ならびに包括的に検討するため、重亜硫酸処理後の DNA に対し PCR-SSCP 解析を行った。6 箇所の CpG が全てメチル化しているクローンと全て未メチル化のクローンとで明確に分けることができた。また、30 パターン以上の既知の様々なメチ

ル化の状態のクローンも全て未メチル化を示すクローンとは分けることができ、重亜硫酸処理後 SSCP 解析は *TSLC1* プロモーターの包括的なメチル化状態の決定に有用であることが示された。

#### (2) 進行性非小細胞肺癌における *TSLC1* のメチル化

48 症例の癌部ならびに非癌部から採取した DNA を用いて 6 箇所の CpG のメチル化の状態を重亜硫酸処理後 SSCP 解析にて検討した。6 箇所全てがメチル化しているクローンと同等の波形を優位に示したのは 10 例で高メチル化と定義した。また、メチル化クローンの波形とかなりの未メチル化波形が合わさった波形が 11 例で部分メチル化と定義した。48 例中 21 例に *TSLC1* のプロモーターメチル化が起こっており、プロモーターメチル化のある 21 例中 13 例では RT-PCR にて *TSLC1* の発現の消失が認められた。一方メチル化を伴わない腫瘍では *TSLC1* の発現が認められた。これにより原発性非小細胞肺癌の手術症例においても *TSLC1* のプロモーターメチル化はその発現の消失とよく相関することが示された。プロモーターメチル化を示し発現が低下している 13 例中少なくとも 4 例においてヘテロ接合性の保持を認めたため、両アレルのメチル化が起こっている可能性が示唆された。

#### (3) *TSLC1* のプロモーターメチル化を示した腫瘍の病理学的特徴

*TSLC1* のプロモーターメチル化に関し非小細胞肺癌の病理学的特徴と比較した。プロモーターメチル化が認められたのは腺癌 28 例中 13 例、扁平上皮癌 14 例中 7 例、大細胞癌 5 例中 1 例であった。病期分類上の比較では TNM 分類の pT1 期は 15 例中 2 例 (13%) で *TSLC1* のプロモーターメチル化が認められたのみであったが、pT2 から pT4 期では 33 例中 19 例 (58%) と統計学的有意にメチル化の頻度が増加していた。同様に、進行度 IA 期ではメチル化の頻度がそれ以上の進行度に比べ有意に低いことが示された。

また、*TSLC1* のプロモーターメチル化は胸膜浸潤の程度においてもその傾向を示したが統計学的有意差は得られなかった。その他の臨床病理学的パラメーター (腫瘍の分化度、リンパ節転移、年齢、性別など) において *TSLC1* のプロモーターメチル化は関係しなかった。

#### (4) 小細胞肺癌株及び様々ながん細胞株における *TSLC1* の不活化

小細胞肺癌に関してはその症例のほとんどが化学療法による治療となるため、手術標本が手に入らず、がん細胞株での検討となった。ノーザンブロット解析にて 10 例中 2 例 (SBC-3 と SBC-5) に *TSLC1* の発現の欠如が認められた。重亜硫酸処理後 SSCP ならびに塩基配列決定では SBC-3 のみに *TSLC1* のプロモーター高メチル化を認めた。SBC-3 に *TSLC1* 領域のヘテロ接合性の保持を認め、このことから両アレルのメチル化による *TSLC1* の不活化が強く示唆された。

同様に *TSLC1* の発現とアレルの状態、メチル化について 36 例の様々ながん細胞株で調べた。36 例中 18 例で *TSLC1* の発現の欠如を認め、この 18 例中 10 例に重亜硫酸処理後 SSCP およ

び塩基配列決定にてプロモーターの高メチル化を認めた。さらに 10 例中 5 例にヘテロ接合性の消失を認めた。一方残りの 10 例中 4 例にヘテロ接合性の保持を認めたことにより、*TSLC1* の不活化は両アレルのプロモーターメチル化によることが示された。*TSLC1* の発現の消失にプロモーターメチル化が原因的に関与することは *TSLC1* の発現がない細胞株に脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine で処理をすると発現が回復することから確かめられた。

**考察：** CpG 島内で *TSLC1* 遺伝子プロモーター上流に存在する 6 箇所 CpG 部位のメチル化の状態が非小細胞肺癌細胞株ばかりでなく、原発性非小細胞肺癌の腫瘍においても *TSLC1* の発現に強く関与することが示された。*TSLC1* のメチル化の包括的なパターンを同定するために重亜硫酸処理後 SSCP 解析は簡素で鋭敏な方法であることが示された。

この方法を用い、原発性非小細胞肺癌および様々ながん細胞株の 40% 以上において *TSLC1* のプロモーターメチル化が示された。さらにプロモーターメチル化を介した *TSLC1* の不活化が非小細胞肺癌における腫瘍径 3 cm 以上の腫瘍進展に関与していることを示した。*TSLC1* の消失は非小細胞肺癌において 3cm 以上の腫瘍容積の形成もしくは維持に関わっている可能性がある。*TSLC1* は細胞接着分子である immunoglobulin superfamily に属し、直接的に細胞凝集に関わる。また、A549 細胞の脾臓から肝臓への転移を抑えることから *TSLC1* の機能の消失は腫瘍の浸潤や転移に関与することが示唆されている。*TSLC1* のメチル化が腫瘍における胸膜浸潤の程度において比較的その傾向を示したことはこの仮説を裏付けるものとなるが、統計学的には有意差が得られなかった。腫瘍の浸潤や転移における *TSLC1* の変化の意義を説明するのに免疫組織学的解析を含め、さらなる調査が必要となるであろう。

今回の研究では様々ながん細胞株において *TSLC1* の消失を認め、それと同時にメチル化とアレルの状態を検討した。*TSLC1* の不活化の原因はこれまでヘテロ接合性の消失とプロモーターメチル化と考えられていたが、今回の検討でメチル化を認め、さらにヘテロ接合性の保持を示したものが認められた。両アレルのメチル化は比較的稀な現象であり、両アレルでのメチル化による不活化が認められるということは 11q23 領域においてヘテロ接合性の消失をあまり示さない腫瘍においても *TSLC1* の不活化が考えられ、様々なヒトの進行がんにおいて *TSLC1* の不活化を認める可能性がある。