

審査の結果の要旨

氏名 深見 武史

本研究はヒト非小細胞肺癌の新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* の不活化の分子機構とがん化における意義を検討するため、48 例の原発性非小細胞肺癌症例と 46 株の様々ながん細胞株において重亜硫酸処理後の SSCP 解析を用いたプロモーターメチル化の検討、*TSLC1* 遺伝子の発現、LOH 解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

(1) *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 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、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) 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標本においても *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、手術検体が手に入らず、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。

以上、本論文は新規がん抑制遺伝子 *TSLC1* において、重亜硫酸処理後の SSCP 解析によるプロモーターメチル化の包括的な検討を簡素化して行い、T 因子とプロモーターメチル化の関係より *TSLC1* の発現が腫瘍の浸潤・転移に関与することを示唆した。また、様々ながん細胞株を用いて *TSLC1* の発現、LOH、プロモーターメチル化を検討することにより、両アレルのプロモーターメチル化が *TSLC1* の発現を不活化することを示唆した。本研究は新規がん抑制遺伝子として同定された *TSLC1* 遺伝子のがん抑制機能を解明するために重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。