

## 論文の内容の要旨

論文題目 胃癌においてサイレンシングされる遺伝子 9 個の同定

指導教官 上西紀夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 金田篤志

## 序論

遺伝子 5'領域 CpG アイランドのメチル化はその下流遺伝子の発現を抑制（サイレンシング）し、突然変異・欠失と並び、癌抑制遺伝子不活化の重要なメカニズムとなっている。胃癌における遺伝子異常の代表は *p53* 遺伝子であり、その突然変異は 37%-43%と高頻度に認められる。しかし、*K-RAS*、*APC* など他の癌関連遺伝子の突然変異は稀であり、むしろ *p16<sup>INK4A</sup>*、*hMLH1*、*RUNX3*、*E-cadherin* など多くの遺伝子において 5'領域の DNA メチル化がその不活化に密接に関わっている。今研究では、ゲノム解析法 methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA)に改良を加え、遺伝子 5'領域 CpG アイランドの異常メチル化をゲノム包括的に探索し、新規胃癌関連遺伝子の同定を行った。

## 方法

MS-RDA は、4 塩基認識メチル化感受性酵素 *HpaII* によるゲノム消化と、消化された DNA 断片の選択的増幅により、二つのゲノムでメチル化状態が異なる領域を抽出する。MS-RDA によるコントロール DNA の増幅をサザンブロット法で測定し、MS-RDA のメチル化異常に対する感度を解析した。また、6 塩基認識酵素 *SacII*・*NarI* 用の新しいアダプター・プライマーを作成し、MS-RDA

を *HpaII* と合わせ計 3 シリーズ施行した。正常ゲノムとして手術材料から採取した正常胃粘膜サンプル 21N を、胃癌ゲノムとして胃癌細胞株 MKN28 と MKN74 を用いた。

得られた DNA 断片の塩基配列を解読し、ゲノムデータベース検索を行った。遺伝子 5'領域 CpG アイランドに由来する DNA 断片について、その CpG アイランドのメチル化状態を Bisulfite sequencing 法で解析した。Bisulfite sequencing の結果、5'領域 CpG アイランドが 2 つの胃癌細胞株で異常にメチル化されている遺伝子について、その他の胃癌細胞株と 41 例の胃癌手術材料における異常メチル化を methylation-specific PCR (MSP)法で解析した。

各遺伝子発現は定量的 RT-PCR 法で解析し、*PCNA* 遺伝子の発現量で補正した。胃癌細胞株 MKN28 と MKN74 を 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)を用いて脱メチル化し、2 つの胃癌細胞株におけるメチル化による遺伝子不活化と脱メチル化による発現回復を解析した。

## 結果

MS-RDA によりコントロール DNA は、100%メチル化されている場合 2300 倍に濃縮されたが、75%・50%のメチル化状態では、0%のメチル化状態と同様、濃縮されなかった。これは、MS-RDA はほぼ完全にメチル化された領域のみ選択的に増幅し、それゆえ、メチル化状態が異なる間質由来の細胞が混入する癌組織ではなく、メチル化状態がより均一な癌細胞株を材料として用いることが望ましいことを示している。

胃癌細胞株 MKN28 と MKN74 におけるメチル化異常を、*HpaII* と、新たに *SacII*・*NarI* を用いた MS-RDA 計 3 シリーズにより解析し、それぞれ 96 個ずつのクローンの塩基配列を解読した。ゲノムデータベースで解析した結果、それぞれ 3、7、6 個のクローンが遺伝子 5'領域 CpG アイランドに由来していた。

これら 16 個の遺伝子 5'領域 CpG アイランドについて、正常サンプル 21N・胃癌細胞株 MKN28 及び MKN74 のメチル化状態を解析した。その結果、16 個中 9 個の遺伝子 (*LOX*、*HRASLS*、*ba305P22.2.3*、*FLNc*、*HAND1*、a homologue of *RIKEN 2210016F16*、*FLJ32130*、*PGAR*、*Thrombomodulin*) の 5'領域 CpG アイラ

ンドが、正常サンプル 21N がメチル化されていないのに対し、胃癌細胞株 MKN28 及び MKN74 は完全にメチル化されていた。

これら 9 個の遺伝子の発現は、メチル化されていない胃癌細胞株では、正常サンプルと比較して発現が保たれていた。それに対し、MKN28 及び MKN74 においては、発現はほとんど完全に消失していた。両胃癌細胞株を 5-aza-dC 処理すると、9 個の遺伝子とも脱メチル化に伴い発現の回復が認められた。

41 例の手術材料を用いて、胃癌組織におけるこれら 9 個の遺伝子及び既知のサイレンシング遺伝子である *p16*・*hMLH1* のメチル化状態を解析した。9 個の遺伝子のうち 5 個 (*FLNC*、*TM*、*HRASLS*、*HAND1*、*LOX*) は、胃癌細胞株だけでなく手術材料の胃癌サンプルにおいても高頻度 (29% - 41%) にメチル化を認めた。他の 4 個の遺伝子のメチル化は低頻度 (0% - 7%) にとどまった。発現解析の結果、異常メチル化に相関して発現が低下しているのを認めた。

個々の胃癌サンプルにおける 9 個の 5'領域 CpG アイランドの異常メチル化頻度を調べると、9 個中 4 個以上の CpG アイランドで異常メチル化を認める胃癌は 11 例存在し、*p16*・*hMLH1* の異常メチル化と相関した ( $p < 0.0001$ )。これら高頻度にメチル化を認める胃癌 11 例は全て未分化型であった ( $p < 0.001$ )。

異常メチル化プロファイルとの比較のため、正常でメチル化状態にある *MAGE-A1*、*MAGE-A3*、*MAGE-B2* 遺伝子の 5'領域の異常低メチル化を MSP にて解析した。異常低メチル化を高頻度におこす胃癌サンプルは、異常メチル化を高頻度におこす胃癌とは異なる群を形成した。

## 考察

MS-RDA はほとんど完全にメチル化された領域を選択的に増幅する。これは、感知できるメチル化 CpG アイランドは限られるが、遺伝子不活化を伴わない不十分なメチル化は感知せず、サイレンシングを引き起こす CpG アイランドを効率よく増幅することを意味する。しかし高すぎる感度ゆえに、メチル化状態が異なる間質細胞が混入する癌組織ではなく、メチル化状態がより均一な癌細胞株を材料にすることが望ましいと思われた。

*HpaII* に加え、新たに 6 塩基認識制限酵素 *SacII*・*NarI* を用いることで、メチ

ル化したプロモーターCpG アイランドを重なり無く、よりゲノムワイドに、かつ効率的に抽出することが可能となり、有用な改良と思われた。

異常メチル化により胃癌でサイレンシングされている遺伝子を、改良したMS-RDA法を用いたゲノム解析により新たに9個同定した。9個の遺伝子のうち、3個（*LOX*、*HRASLS*、*TM*）は細胞増殖抑制作用が報告されている遺伝子であるが、癌における不活化機構が今研究により初めて明らかにされ、有力な癌抑制遺伝子候補と思われた。

41例中11例の胃癌サンプルは9個の遺伝子の異常メチル化を高頻度に示し、*p16*・*hMLH1*の異常メチル化と有意に相関した。これは、「CpG アイランドメチル化形質（CpG island methylator phenotype, CIMP）」が41%の胃癌に存在する、とするToyotaらの報告によく合致する。しかし、これら高頻度に異常メチル化を示す11例の胃癌症例が、未分化型と有意に相関したことは、新しい知見でありかつ特筆すべきことである。異常メチル化の蓄積が未分化型の原因となっている可能性を初めて示した報告であり、胃癌組織多様性を考察する上で特に興味深い。

正常組織ではメチル化されている3個の遺伝子5'領域CpGアイランドの、異常低メチル化を解析した。3個すべて異常低メチル化を示した胃癌は5例存在し、それらは異常メチル化形質陽性胃癌とは異なるグループを形成した上、統計学的に有意なクラスタリングを示した（ $p < 0.05$ 、 $\chi^2$ 検定）。これは、「CpG アイランド異常低メチル化形質（CpG island hypomethylator phenotype, CHOP）」とでも呼ぶべき新しい形質の存在を示唆し、異常メチル化と異常低メチル化が異なるメカニズムにより生ずることを意味する。MAGE 蛋白は、MHCにより抗原提示され殺傷性T細胞に認識される、癌特異抗原として知られ、癌免疫療法への応用が試みられている。異常低メチル化形質は、免疫療法が有効な癌を選別するのに有用な形質となるかもしれない。

以上、i)MS-RDAの改良、ii)胃癌においてサイレンシングされる遺伝子9個の新規同定、iii)異常メチル化を高頻度におこす胃癌と未分化型との相関、iv)新しい形質「異常低メチル化形質（CHOP）」の存在、を報告した。