

論文の内容の要旨

論文題目：尿路上皮の多段階発がん過程における DNA メチル化の変化

指導教員：北村唯一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

中川 徹

【背景】

DNA メチル化は転写制御・クロマチンリモデリング・ゲノムの安定性に重要な役割を果たしており、DNA メチル化の変化は発がんに寄与する主要なエピジェネティクス機構のひとつである。ヒトがんには通常認められる DNA メチル化の変化は領域特異的な高メチル化と 5 メチルシトシン総量の減少である。

がんにおける領域特異的な異常高メチル化は、腫瘍抑制遺伝子の発現消失を介して発がんに寄与する。しかし異常高メチル化の原因となる詳細な分子機構はいまだ充分には解明されていない。DNA メチルトランスフェラーゼ 1 (DNMT1) は体細胞中に最も豊富に存在する DNA メチル化酵素である。最近 DNMT1 は DNA メチル化の維持のみならず *de novo* メチル化にも働く可能性が示唆されており、その発現の変化はがんにおける DNA メチル化の異常を引き起こす原因となる可能性がある。一方異常低メチル化は、ES 細胞やマウスモデルを用いた実験により、染色体不安定性を惹起して発がんを誘導することが知られている。

尿路上皮がんにおいては p16 や E-カドヘリンなどの遺伝子がプロモーター領域 CpG アイランドの異常高メチル化により発現が消失すること、CpG アイランドのメチル化の頻度と予後の相関などが報告されている。しかしながら、尿路上皮がんの組織学的な多様性や前がん病変を十分考慮した上での DNA メチル化の変化についての検討はいまだ十分になされていない。また、DNA 異常高メチル化の原因のひとつである可能性がある DNMT1 蛋白発現の変化についてもこれまで報告はない。さらに、

尿路上皮がんにおける異常低メチル化の意義についても未だ十分に解明されていない。

本研究は、尿路上皮がんの多段階発生過程や多様な発生経路に対応するさまざまな組織検体を用いて、(1) DNMT1 蛋白発現の変化ならびにその細胞増殖能との関係について検討すること、(2) 領域特異的な異常高メチル化ならびにその DNMT1 蛋白発現の変化との関係について検討すること、(3) 傍セントロメアサテライト領域の異常低メチル化ならびにその尿路上皮がんの特徴的な他の分子生物学的な変化との関係について検討することにより、尿路上皮がんの診断や治療に DNA メチル化の変化を利用することを将来的な視野に入れつつ、その基礎として尿路上皮の多段階発生過程における DNA メチル化の変化の意義についての理解を深めることを目的とする。

【対象と方法】

＜1＞膀胱移行上皮の多段階発生過程における DNMT1 蛋白発現の変化

膀胱全摘術を施行した膀胱がん症例 103 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本から作成した、組織学的に特記すべき所見を示さない移行上皮 89 検体・異形成上皮 78 検体・移行上皮がん（乳頭状がん、上皮内がんならびに浸潤がん）174 検体の組織切片、ならびに、正常対照として、非尿路上皮がん症例の手術あるいは剖検で得られた正常移行上皮 61 検体について検討した。抗ヒト DNMT1 ポリクローナル抗体ならびに抗ヒト PCNA モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、その結果について相互の関係ならびに臨床病理学的な諸因子との相関を検討した。

＜2＞膀胱移行上皮の多段階発生過程における CpG アイランドのメチル化の変化、ならびにその DNMT1 蛋白発現の変化との関係

膀胱がん症例 55 例のホルマリン固定パラフィン包埋標本から、組織学的に特記すべき所見を示さない移行上皮 23 検体、移行上皮がん（乳頭状がん、広汎進展上皮内がんならびに浸潤がん）70 検体の DNA をマイクロダイセクション法にて回収した。正常対照として骨盤内臓全摘術を施行した直腸がん症例 12 例から得られた正常移行上皮 12 検体から抽出した DNA を検討に加えた。DNA をバイサルファイト変換に供した後、メチル化特異的 PCR (MSP) あるいはバイサルファイト変換-制限酵素処理 (COBRA) 法により p16, Death-associated protein kinase (DAPK) 遺伝子ならびに MINT2, 12, 25, 31 クローンの各 CpG アイランド（これらは消化器がんを対象とした研究において年齢依存性でなくがん特異的にメチル化が亢進することが知られている）のメチル化の状態を解析した。これらの結果について臨床病理学的な諸因子との相関を検討した。

＜3＞尿路上皮がんにおける異常低メチル化の意義

膀胱がん 13 例・尿管がん 5 例・腎盂がん 9 例、計 27 例の尿路上皮がん症例の手術摘出標本から採取したがんならびに非がん組織の新鮮凍結組織から高分子量 DNA を抽出した。MspI あるいは HpaII にて処理した DNA に対してサテライト 2・3 の各々に対するオリゴヌクレオチドプローブを用いてサザンブロッティングを行った。9 番染色体上の 6 部位のマイクロサテライトマーカー (D9S775, D9S925, D9S304,

D9S303, D9S283, D9S747) におけるヘテロ接合性喪失 (LOH) の有無を、蛍光ラベルしたプライマーを用いた PCR を利用して解析した。これらの結果について相互の関係ならびに臨床病理学的な諸因子との相関を検討した。

【結果】

＜1＞膀胱移行上皮の多段階発がん過程における DNMT1 蛋白発現の変化

正常移行上皮・膀胱がん症例から採取した組織学的に特記すべき所見を示さない移行上皮・異形成上皮・移行上皮がんへと進展するに伴い DNMT1 蛋白発現は有意に亢進した ($p<0.0001$)。特に、前がん段階にある可能性のある膀胱がん症例の組織学的に特記すべき所見のない上皮において既に正常移行上皮に比べて DNMT1 の発現の有意な亢進が見られた ($p<0.0001$)。膀胱がん症例から採取した組織学的に特記すべき所見を示さない移行上皮では DNMT1 の発現と PCNA 標識率の間に有意な相関は見られなかった。非乳頭状がんは乳頭状がんに比べて DNMT1 を有意に高発現しており ($p=0.0001$)、非乳頭状がんの中でも特に DNMT1 を高発現していたのは悪性度の高い結節性浸潤がんの前駆病変である広汎進展上皮内がんであった。

＜2＞膀胱移行上皮の多段階発がん過程における CpG アイランドの DNA メチル化の変化、ならびにその DNMT1 蛋白発現の変化との関係

正常移行上皮、膀胱がん症例から採取した組織学的に特記すべき所見を示さない移行上皮、移行上皮がんにおける各 CpG アイランドの DNA メチル化の頻度はそれぞれ p16 (0%, 17%, 21%), DAPK (13%, 33%, 29%), MINT2 (56%, 60%, 76%), MINT12 (0%, 6%, 30%), MINT25 (25%, 27%, 35%), MINT31 (45%, 56%, 79%) であり、概ね正常移行上皮から前がん状態にある組織学的に特記すべき所見を示さない移行上皮、移行上皮がんへと進展するにつれて各 CpG アイランドの DNA メチル化の頻度は亢進していた。

3 箇所以上の CpG アイランドが同時にメチル化される事象の頻度は、正常移行上皮から、膀胱がん症例から採取した組織学的に特記すべき所見を示さない移行上皮、移行上皮がんへと進展するにつれて有意に亢進し ($P=0.0043$)、特に膀胱がん症例から採取した組織学的に特記すべき所見を示さない移行上皮の段階で既に正常移行上皮と比較して有意に亢進していた ($P=0.0455$)。CpG アイランドメチル化形質 (CIMP; がんににおいて同時に 3 箇所以上の CpG アイランドがメチル化されるとき CIMP 陽性と定義) は乳頭状がんに比べて非乳頭状がんにおいて有意に高頻度に見られた ($P=0.0143$)。全検体を用いて検討したとき、同時に 3 箇所以上の CpG アイランドがメチル化される事象は DNMT1 蛋白発現の亢進と有意に相関していた ($P=0.0167$)。

＜3＞尿路上皮がんにおける低メチル化の意義

サテライト 2・3 の低メチル化はそれぞれ非がん組織の 7%・0%、尿路上皮がんの 41%・44%に見られ、がんの組織学的異型度 ($P=0.0012$, 0.0043)、深達度 ($P=0.0055$, 0.0228)、組織構築 (乳頭状がん対結節性浸潤がん, $P=0.0161$, 0.0297) と有意に相関していた。少なくとも 1 箇所以上のマイクロサテライトマーカーにおける LOH は移行上皮がんの 52%に認められ、サテライト 2・3 の低メチル化との間に有意な相関

が見られた ($P=0.0098$, 0.0034)。

【結論】

DNMT1 蛋白発現の亢進は単に細胞増殖能の亢進に伴う二次的なものではなく、膀胱尿路上皮の多段階発がん過程において細胞増殖能の亢進に先行し、多数の CpG アイランドのメチル化の亢進を惹起する可能性がある。DNMT1 蛋白発現ならびに CpG アイランドにおける DNA メチル化はともに、尿路上皮における多段階発がん過程早期の前がん段階から既に亢進し、特に乳頭状がんが発生する過程よりも広汎進展上皮内がんを経て悪性度の高い結節性浸潤がんが発生する過程に寄与する可能性がある。尿路上皮がんにおいて傍セントロメアサテライト領域の低メチル化は、尿路上皮がんを高頻度に見られる 9 番染色体の LOH の原因となっている可能性がある。