

## 論文の内容の要旨

論文題目 神経膠腫における染色体変異の解析および新規癌抑制遺伝子の同定

指導教員 斉藤延人 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 荻原英樹

神経膠腫は、神経細胞の支持や栄養を司り、また髄鞘の構成要素となる神経膠細胞が腫瘍化したものと考えられている。年間 10 万あたり 3 人に発生し、脳という重要な組織に浸潤性に進展し、一般に予後不良である。なかでも、最も悪性度の高い神経膠芽腫では、その生存期間中央値は 1 年である。現在までに、神経膠腫の発生や進展の分子レベルでの解析が進められており、*TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *RB* 等の関与が報告されている。しかしながら、これらは個別の遺伝子異常についての情報であり、これらだけでは解明できない腫瘍の進展機構も存在していると考えられる。

一般に、悪性腫瘍は、その発生、進展の過程でさまざまな遺伝子に異常が生じ、これらが蓄積していくことにより、浸潤、転移、薬剤耐性といった悪性形質を獲得していくことが知られている。このような遺伝子異常の背景として、ゲノムの一次構造の異常が深く関わっており、腫瘍特異的なゲノム一次構造の異常を検出すれば、病態と関連する遺伝子の同定につながり、治療標的としての意義が検討できる。

悪性腫瘍で染色体のコピー数の増加がみられる部位から、*EGFR*, *MYC* などの癌遺伝子

(oncogene) が同定され、染色体のコピー数が減少している部位から *PTEN*, *TP53*, *RB1* 等の細胞周期を抑制する遺伝子や DNA の修復を担う腫瘍抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) が報告されてきた。これらの腫瘍抑制遺伝子の不活化には、その領域における 2 本の染色体の両方の機能が失われる必要がある。それは 2 本のアレルの欠失 (ホモ欠失)、一方のアレルの欠失 (LOH) と他方アレルの点突然変異、あるいは一方のアレルの LOH ともう一方のアレルのメチル化、により起こるとされている。

近年、SNP genotyping array を用いたゲノム解析により、高速かつ高解像度なコピー数の解析が可能となっている。これにより、数 10kb の解像度で染色体変化の全体像を見ることが可能であり、また、本研究で使用したアルゴリズムを用いるとアレル別コピー数の解析が可能となった。

本研究では、50K SNP genotyping array を用いて、32 例の神経膠腫 (稀突起神経膠腫 12 例、退形成性稀突起神経膠腫 4 例、星状細胞腫 4 例、退形成性星状細胞腫 4 例、神経膠芽腫 8 例) の染色体変異を解析し、新規癌抑制遺伝子を同定することを目的とした。

SNP genotyping array によるコピー数解析の結果、7 箇所、6 検体でホモ欠失領域を認めた。ホモ欠失を認めた検体 6 例中、5 例が神経膠芽腫であり、1 例は星状細胞腫であった。ホモ欠失 7 箇所のうち、4 箇所は 9p21.3 の領域であった。この領域には既知の癌抑制遺伝子である *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *CDKN2B* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B) が存在している。また、1 箇所は 10q23.31 の領域であり、既知の癌抑制遺伝子である *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) が存在している。その他、12q21, 13q21 の 2 箇所は神経膠芽腫における新規のホモ欠失領域であった。

この新規ホモ欠失領域に関して、ダイレクトシーケンシングを用いた SNP 解析により、ホモ欠失領域とその両端の LOH 領域の解析を行い、検証した。12q21 のホモ欠失領域は 4.17Mbp、13q21 では 388Kbp に渡っていた。このように 50K SNP タイピングアレイを用いることにより、従来の CGH などの方法に比し、より限局した範囲でのホモ欠失の同定

が可能であることが示された。

更に、SNP genotyping array に用いた神経膠芽腫 8 例に 22 例の神経膠芽腫を加えた 28 例に対して、質量分析による LOH 解析を行い、染色体欠失の頻度を調べたところ、12q21 の領域では、28 例中 4 例 (14.3%) に LOH、2 例 (7.1%) にホモ欠失を認めた。13q21 の領域では 28 例中 8 例 (28.5%) に LOH、3 例 (10.7%) にホモ欠失を認めた。

12q21 ホモ欠失領域には、4 つの遺伝子が含まれていたが、定量 PCR による mRNA の発現解析により、正常脳の発現に比し、神経膠芽腫で発現が低下している *NAV3* が候補癌抑制遺伝子として選出された。

13q21 ホモ欠失領域には、*DACH1* 遺伝子が存在していた。定量 PCR による mRNA の発現解析により、正常脳での発現部位のひとつと考えられる尾状核での発現量に比し、神経膠芽腫の臨床検体、細胞株において、発現が低下していることを確認した。

*DACH1* は、13q21 に存在する遺伝子で、*Drosophila* の *dachshund gene* の human homolog として同定された。*Drosophila* では、*dachshund gene* の欠損で、眼、足が低形成となることが報告されている。Mouse Dach1 は Six6 と結合して複合体を形成し、cyclin-dependent kinase inhibitors を抑制することにより、網膜と下垂体の発生に関与している。Human homolog の DACH1 は全長 706 アミノ酸からなり、分子量は 73kDa である。N 末に ski/sno に相同な DS ドメインを持つ。腫瘍との関連では、Wu らは、DACH1 はその DS ドメインを介して、NeoR と Smad4 と相互作用し、TGFβシグナルを抑制することを示し、乳癌細胞株において TGFβが誘導するアポトーシスを抑制することを示した。一方で、Wu らは、DACH1 が cyclin D1 を抑制し、乳癌細胞株において増殖抑制効果を持つことを示し、DACH1 が核で発現している乳癌の患者群では、発現していない群に比し予後が良好であることを示した。このように、DACH1 は腫瘍増殖に促進的に働く場合もあれば、抑制的に働く場合もあることが示され、腫瘍細胞における DACH1 の役割について一致した見解は得られていない。

本研究では、DACH1 の発現を認めていない神経膠芽腫由来の細胞株である U87 に DACH1 を強制発現させることにより、DACH1 の発現が神経膠芽腫の進展に関してどのような機能を果たしているのかを検討する目的で、テトラサイクリンにて誘導される DACH1 の安定発現株の作製を行った。

2 種類のクローンで DACH1 の発現による増殖に対する効果を WST-8 アッセイにて検討した。ドキシサイクリン 1 $\mu$ g/ml の投与から 96 時間後に、コントロール(ドキシサイクリンなし)と比較して、クローン 1 では 15.8%、クローン 2 では 25.7%と有意な低下を認めた。ドキシサイクリン 1 $\mu$ g/ml の投与から 144 時間後では、クローン 1 では 29.0%、クローン 2 では 32.7%と有意な低下を認めた ( $p<0.005$ )。

また、ソフトアガーアッセイにて足場非依存性増殖に対する効果をみたところ、ドキシサイクリン 1 $\mu$ g/ml の投与をしたものは、コントロール(ドキシサイクリンなし)と比較して、クローン 1 では 62.7%、クローン 2 では 69.6%と有意な低下を認めた( $p<0.005$ )。

また、DACH1 を発現している神経膠芽腫由来の細胞株である U251 において、siRNA による DACH1 の発現抑制が腫瘍細胞に与える影響について検討した。siRNA は、Invitrogen 社の 3 種類の Stealth RNAi を用いた。20nM の siRNA により、DACH1 タンパク質の発現抑制効果が見られることを確認した。この条件で、DACH1 を発現抑制したときの細胞増殖への影響を WST-8 アッセイにて検討したところ、96 時間後に siRNA-1 で 35.6%、siRNA-2 で 17.9%、siRNA-3 で 14.6%と、細胞増殖は有意に亢進した。

これらのことにより DACH1 の発現が神経膠芽腫において増殖抑制効果を持つことが示唆された。

今回の結果より、DACH1 が神経膠芽腫細胞で発現低下することにより、腫瘍細胞の増殖や生存を促進すると考えられ、DACH1 が神経膠芽腫において、癌抑制遺伝子としての働きを持つことが示唆された。