

## 論文の内容の要旨

論文題目 癌のプロモーター領域の定量的メチル化解析による  
プロファイリングと肺癌の分類への応用

指導教員 高本 眞一 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

外科学専攻

佐野 厚

遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドの異常メチル化は癌に特徴的な変化であり、異常メチル化と組織型・進行度・予後などの相関が報告されている。異常メチル化の検出には、bisulfite 処理によって非メチル化シトシンをチミンに変換した後に PCR を用いる方法が従来より行われていた。MS-PCR では、CpG サイトを含む位置にプライマーを作成し、PCR での増幅の有無でメチル化を検出した。簡便で感度の高い方法であるが、定性的な解析であり、特異度に劣る方法であった。

MethyLight をはじめとした real-time PCR によるメチル化定量法は、CpG サイトを含むプライマーで PCR を行い TaqMan probe による real-time PCR を行い定量を行う方法である。対照遺伝子と比較した定量的なデータが得られるが、probe の特異性が不十分であり、擬陽性の起こりうるシステムであった。

今回、我々が採用した Quantitative Analysis of Methylated Alleles (QAMA) は、bisulfite 処理した DNA を CpG サイトを含まないプライマーで real-time PCR を行い、別の蛍光色素を結合した TaqMan MGB probe を 2 種類用いてメチル化 DNA と非メチル化 DNA の割合を定量する方法である。1 つのプライマーセットでメチル化・非メチル化 DNA を同時に増幅するため、正確な定量データが得られる。

また、TaqMan MGB probe は非常に特異性が高く、未反応のシトシンの影響をほとんど受けない。QAMA は従来の方法の欠点を改善したメチル化定量法であり、我々はこの方法を多数遺伝子による癌のプロファイリングに応用した。

Minor Groove Binder (MGB) は 3 つのアミノ酸からなる分子で、プローブの 3' 端に MGB を付けることにより、DNA 同士の結合の特異性を向上させる。これにより、1 チューブ内で 2 本のプローブを用いて反応させても、交差反応のほとんど見られない系を作ることが可能になった。

メチル化 DNA に対応するプローブには VIC、非メチル化 DNA に対応するプローブには FAM の蛍光色素でラベルされている。消光物質によってプローブに結合した蛍光色素は光を発しないが、PCR の際に Taq DNA polymerase によって蛍光物質が DNA から離されると蛍光を発する。

メチル化・非メチル化 DNA それぞれに違ったプローブが結合するため、2 種類の波長の蛍光強度を測定することによって、それぞれの DNA の割合が定量できる。

QAMA のプライマー・プローブ作成の条件は以下の通りである。

- (1) プライマーはメチル化・非メチル化 DNA を同時に増幅するため、CpG サイトを含まない（もしくは 5' 端付近に 1 つしか含まない）位置に設計する。
- (2) メチル化・非メチル化 DNA で PCR 効率をなるべく同じにするため、PCR 産物はできるだけ短くなるようにプライマーを設計する。
- (3) プローブの位置は、癌で特異的にメチル化を受けるような部位を選択する。
- (4) プローブサイトには 3~4 の CpG サイトを含む。

さらに、我々はより感度・特異度を増すため、以下の新しいプライマー・プローブ設計基準を加えた。

- (5) 未反応シトシンの多い DNA を増幅しないため、プライマーの 3' 端はなるべく non-CpG のシトシンとした。
- (6) MGB による特異性の改善の効果は 3' 端で大きいため、プローブの 3' 端付近に多くの CpG を含むようにした。
- (7) 未反応シトシンの影響を避けるため、プローブの 5' 端は non-CpG のチミンにならないようにした。

非小細胞肺癌について、メチル化の変化と組織型・喫煙歴・悪性度・再発率などとの相関のある 10 遺伝子について、QAMA のプライマー・プローブセットを確立した。それぞれについて正常細胞（白血球もしくは気道上皮）でメチル

化がなく、癌でメチル化の報告のある部位をターゲットとしてプライマー・プローブを設計。正常細胞と *SssI* methylase で処理した完全メチル化 DNA を bisulfite 処理後にサブクローニングし、様々な割合で混合したプラスミドをテンプレートとして予備実験を行ったところ、交差反応はなく正確に定量できる系であることを確認した。

次に、原発性肺癌切除例 90 例について 10 遺伝子のプロモーターのメチル化定量を行った。研究計画について東京大学医学系研究科・医学部倫理委員会で承認を受けた後、インフォームドコンセントを患者より得て、原発性肺癌切除例の切除肺癌組織の一部を採取した。クラスター解析により分類を行ったところ、グループにより組織型・喫煙歴・*EGFR* 遺伝子変異について異なった傾向を示した。

近年、分子標的薬イレッサなどの奏効率と相関の見られる *EGFR* 遺伝子変異と DNA のメチル化についても関連を調べた。*EGFR* 遺伝子変異について、従来のダイレクトシーケンス法に加えて、正常アリルを制限酵素で切断して感度を高める方法を用いて、高感度に変異を検出した。この結果とメチル化の比較を行ったところ、*p16* のメチル化と *EGFR* 遺伝子変異は同時に存在する症例がなく排他的であった。他の遺伝子のメチル化と *EGFR* 遺伝子変異には特に関連が見られなかった。

今回の対象のうち、4 例は 2 病変を持つ症例であった。うち 3 例は同一組織型の 2 病変であったが、3 例中 1 例は組織型は同一であるがメチル化プロフィールが異なるため、同時多発肺癌であると診断した。残りの 2 例は組織型およびメチル化プロフィール共に同一の 2 病変であったため、単一の肺癌と肺内転移であると診断した。メチル化パターンによる診断と病理学的診断が異なった場合にどちらが正確であるかを検証することは難しい。今後は多数の症例を集めると共に、予後を追跡してメチル化パターンによる診断の正確性を検証していく。

今回、肺癌の多数遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析に、最新の定量法である QAMA を採用した。QAMA では特異性の高い TaqMan MGB probe とメチル化の有無に影響されないプライマー設計を採用した。TaqMan MGB probe は MGB により非常に高い特異性を示し、1 塩基のミスマッチでも識別する。そのためメチル化プローブと非メチル化プローブの交差反応が見られず、また bisulfite 処理の未反応シトシンにより結果が左右されることもほとんどない。これにより、1 チューブ内で 2 種類の蛍光プローブを用いた反応が可能となり、よ

り正確な定量が行えるようになった。

こういった従来のメチル化定量法の欠点を改善した QAMA に、さらに我々はプライマー・プローブ設計の工夫を追加し、より正確な定量が行えるようにした。この定量系を 10 遺伝子で構築し、多数遺伝子のメチル化定量を行った。これにより、従来から発現プロファイルの解析で行われていたように、メチル化プロファイルについてクラスター解析を行い分類することを可能にした。さらに、この解析から EGFR 遺伝子変異とメチル化の関連の解析や、多発肺癌と肺癌肺内転移との鑑別への臨床応用が可能であることを示した。

MS-PCR の報告以後、bisulfite 処理後の PCR を基本とした方法でメチル化解析が行われ、近年は MethyLight をはじめとした real-time PCR を用いた定量的メチル化解析が行われている。さらにそれを発展させた QAMA は、簡便な方法でありながら、高い特異性・定量性を示し、多数遺伝子にも応用可能な方法であり、今後の定量的メチル解析の主流となり得る手法である。