

論文内容要旨

論文題目 肺がんゲノムにおける100 kb解像度でのホモ欠失探索

指導教員 高本 眞一 教授

東京大学大学院医学系研究科

2004年4月入学

医学博士過程

外科学専攻

氏名 長山 和弘

がんは遺伝子異常によって生じる疾患であり、がんの発生・進展は、段階的な複数の遺伝子異常の蓄積により、細胞がより悪性度の高い形質を獲得していく過程を反映したものであると考えられている。この過程において、がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活化は大きな役割を果たしているが、これらには、いくつかのがん種において共通するものもあれば、それぞれのがん種に特異的なもの、更には同一のがん種内の組織型特異的とされるものまである。それぞれのがん種における共通または特異的ながん遺伝子・がん抑制遺伝子の異常が明らかになれば、がんに対するより効果的な治療法の開発が可能となるであろう。肺がんは我が国の悪性腫瘍による死因の第1位を占め、米国をはじめとする諸外国においても悪性腫瘍における死因の上位を占めている。世界的に肺がんに対する有効な診断・治療法が模索されているためか、肺がんに関する分子病理学的な知見は、他の固形がんに比べて進んでいる。肺がんにおけるがん遺伝子研究の成果として、特定のがん遺伝子を特異的に阻害する薬剤、いわゆる分子標的治療薬の開発・実用化、臨床導入があげられる。また、いくつかの肺がん抑制遺伝子で、その異常が独立した予後不良因子となることや、術後抗がん剤治療の有効性を規定する因子となる可能性のあることが示されており、ハイリスクグループの同定や治療効果予測に有用な分子マーカーとなり得るような、新たな肺がん抑制遺伝子を同定することは、将来の肺がん治療において大きな発展をもたらすことになる。

がん細胞において、ヘテロ接合性の消失 (Loss of heterozygosity; LOH) が生じている領域でがん抑制遺伝子が不活化されていることはよく知られている。これには、一方の相同染色体上のがん抑制遺伝子で変異・メチル化がおり、もう一方の相同染色体でLOHによる比較的大きなDNA領域の欠失がおこることによって、両アレルのがん抑制遺伝子が不活化する場合と、一方の相同染色体上でがん抑制遺伝子を含む比較的小さなDNA領域の欠失がおり、もう一方の相同染色体ではLOHによる比較的大きなDNA領域の欠失がおこることによって両アレルのがん抑制遺伝子が不活化する場合があるが、後者は特に両相

同染色体欠失（ホモ欠失; Homozygous Deletion; HD）と呼ばれ区別されている。肺がんでは、9p21領域に存在する*CDKN2A* (*p16*)、10q23領域に存在する*PTEN*を含め、いくつかのがん抑制遺伝子がホモ欠失により不活化していることが知られている。この他の様々な染色体座においても肺がん細胞がホモ欠失を示すことが報告されており、この事実は、新規肺がん抑制遺伝子、並びに肺がん抑制遺伝子としての役割がまだ知られていない遺伝子が未知のホモ欠失領域に存在している可能性を示唆している。

今回、肺がんゲノムにおける新規ホモ欠失領域、および新たな肺がん抑制遺伝子の同定を目的として、全ゲノムに亘り115,553マーカーを配した、現在最も高解像度のDNAアレイによる、43肺がん細胞株（32非小細胞肺がん細胞株、11小細胞肺がん株）における全ゲノム網羅的なホモ欠失領域の探索・同定を行った。アレイ解析にて特異的なハイブリダイゼーションシグナルを得られなかったマーカーが4箇所以上連続してみられる常染色体上の領域をホモ欠失の候補領域として選定し、候補区域内に存在するDNA断片の欠失がMultiplex PCR法による産物の増幅欠如により確認された場合にホモ欠失していると判定した。マーカーはゲノム上において平均25 kb間隔で設定されているため、特異的なハイブリダイゼーションシグナルを得られなかったマーカーが4箇所以上連続する領域を対象とした場合には、100 kb解像度でのホモ欠失探索となる。文献を渉猟する限りでは、同様のアレイで、この手法を用いた高解像度でのホモ欠失探索の報告はこれまでにはなく、本研究が初めての報告例となる。

43肺がん細胞株におけるアレイ解析の結果、特異的なハイブリダイゼーションシグナルを得られなかったマーカーが4箇所以上連続する候補ホモ欠失領域は、142区域みられた。これらの領域に対して、Multiplex PCR法による解析を行い、63区域（63/142, 44%）が、実際にホモ欠失していることを確認した。43肺がん細胞株のうち、30株については、特異的なハイブリダイゼーションシグナルを得られなかったマーカーが3連続（75 kb解像度）でみられる領域にまで対象を上げたところ、このような領域は527区域みられ、うち9区域でホモ欠失を確認した。よって、43肺がん細胞株におけるアレイ解析を基に、29細胞株において、のべ72ホモ欠失領域を同定した。欠失領域のサイズは、最小9.0 kb、最大10.2 Mbであった。Multiplex PCR法により欠失領域の重複に関する検討を更に行い、72ホモ欠失領域のうち28区域は、7つの共通欠失領域のいずれかにおいて重複するホモ欠失であり、残りの44区域は、独立した44ホモ欠失領域であることが示された。従って、72ホモ欠失領域は、重複を考慮すると51ホモ欠失領域にまとめられる。このうち20領域はこれまで報告のない、新規に同定されたホモ欠失領域であった。一方、残りの31領域には9p21座や3p14座など、肺がん細胞における既知のホモ欠失領域が含まれていた。51領域各々について、アレイ解析に用いた43株を含めた74肺がん細胞株（52非小細胞肺がん細胞株、22小細胞肺がん株）におけるホモ欠失の実態を調べたところ、全体で45細胞株において98箇所のホモ欠失が同定された。これらは、19の常染色体に分散して存在しており、染色体腕別で見ると、9番短腕が33箇所（34%）、2番長腕が14箇所（14%）とそれ

ぞれ第一位、第二位に高い頻度でホモ欠失の標的となっていた。また、以前の報告同様、非小細胞肺癌細胞株におけるホモ欠失の頻度は、小細胞肺癌細胞株に比べて有意に高かった。

ゲノムデータベースの情報から、51ホモ欠失領域のうち41領域内には遺伝子が含まれていると推定した。個々の遺伝子に対して、Multiplex PCR法により対応する遺伝子断片の欠失の有無を解析したところ、3個のマイクロRNA遺伝子を含む113遺伝子が欠失していることが明らかになった。欠失遺伝子のうち、*CDKN2A/CDKN2B*は、74細胞株中19細胞株（26%）と最も高い頻度で欠失しており、*PTPRD*と*LRP1B*は、それぞれ9細胞株（12%）、8細胞株（11%）とそれに続いた。上記以外に2株以上の細胞株でホモ欠失を認めたものは、28遺伝子（9領域）であった。また、1株のみではあったが、既知のがん抑制遺伝子である*RB1*のホモ欠失を同定した。検出された一連のホモ欠失領域については、コピー数多型（Copy number variation; CNV）との異同を検討した。ヒトゲノムにおけるCNVデータベースの情報を参照したところ、51ホモ欠失領域のうち21領域が、登録されているCNV領域と少なくとも一部重複していたが、詳細なMultiplex PCRの結果、コピー数多型を示す領域とホモ欠失領域の範囲とに相違があることを見出した。更に、アレイ解析に使用した7株の肺癌細胞株と、それぞれ同一患者由来の7株のBリンパ球の不死化細胞株をアレイ解析により比較し、7株の肺癌細胞で認められた15ホモ欠失領域のうち11区域では、対応するBリンパ球においてヘテロ接合性が維持されていることを見出した。以上の結果より、21箇所のホモ欠失領域はコピー数多型のような胚細胞性の変化によるものではなく、がん化の過程で生じた体細胞性変化であることを示した。

本研究によって、74株の肺癌細胞において、51箇所のホモ欠失領域およびそこに含まれる113個の欠失遺伝子を同定した。欠失遺伝子には、がん細胞において欠失の標的となりやすいとされる1 Mb以上の長大な遺伝子が*LRP1B*, *FHIT*, *WWOX*, *ERBB4*, *PDE4D*, *CSMD1*の6遺伝子含まれており、*LRP1B*, *FHIT*, *WWOX*の3遺伝子は、2例以上の細胞株でホモ欠失を示し、common fragile siteに位置することから、遺伝子欠失に染色体の脆弱性が関わる可能性を示した。また、3個のマイクロRNA遺伝子の欠失が確認されたが、このなかには*RAS*調節因子として働くことが知られている*let-7*ファミリーの*MIRNLET7C*が含まれていた。今回のホモ欠失探索で同定された113個の遺伝子には、既知のがん抑制遺伝子である*CDKN2A*および*RB1*と、がん抑制遺伝子候補である、*LRP1B*, *FHIT*, *CSMD1*, *PTPRD*, *DBC1*, *PTPRO*, *PCDH20*, *WWOX*, *SMAD4*が含まれていた。従って、他の欠失遺伝子の中にも、その不活化が肺癌の発生・進展に関与する肺癌抑制遺伝子が含まれている可能性がある。以上の結果から、高解像度DNAアレイによるホモ欠失領域の探索は、肺癌の新規がん抑制遺伝子の同定や、既知のがん抑制遺伝子、並びにその候補の確認に有用であり、肺癌のハイリスクグループの同定や治療効果予測に有用な分子マーカーの同定に結びつくものと思われた。また、同定したホモ欠失に関するゲノム上の位置、大きさ、欠失遺伝子、並びに細胞株名は、他の肺癌遺伝子の研究者にとって

貴重な情報を提供するものと考えられた。