

審査の結果の要旨

氏名 長山 和弘

ヒトがんの発生・進展には、がん抑制遺伝子の不活化が大きな役割を果たしているが、がん抑制遺伝子を不活化する分子機構の一つとして、DNA 領域のホモ欠失（両相同染色体欠失）が挙げられる。本研究では、肺がんゲノム DNA における新規ホモ欠失領域と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知られていない遺伝子の同定を目的として、現在最も解像度が高い DNA アレイを用いて 43 株の肺がん細胞株（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・同定を行い、下記のような新たな手法を確立し、有用な結果を得ている。

1. がん細胞におけるホモ欠失領域の実態を把握する目的で、高解像度 DNA アレイを用いた新たな解析手法を確立した。すなわち、DNA アレイ解析により、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 箇所以上連続する常染色体上の区域を、ホモ欠失の候補区域として選定し、候補区域内の DNA 断片の欠失が Multiplex PCR 法による増幅産物の欠如として確認された場合に、ホモ欠失が生じていると判定した。マーカーはゲノム上に平均 25 kb 間隔で設定されているため、これが 4 箇所以上連続する区域を対象とした場合、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、同様の DNA アレイを用いたこの高解像度でのホモ欠失領域の探索は、本研究が初めてである。
2. 上記手法により、43 株の肺がん細胞株において既知のホモ欠失領域を含む 63 箇所のホモ欠失区域を同定した。また、43 細胞株のうち 30 株については、マーカーが 3 箇所（75 kb 解像度）連続してみられる区域まで対象を拡げ、更に 9 ホモ欠失区域を追加、同定した。この結果、29 細胞株において合計 72 箇所のホモ欠失区域を同定した。次に、Multiplex PCR 法により欠失領域の重複に関する検討を行い、72 箇所の欠失区域のうち 28 区域は、7 つの共通欠失領域にまとめられること、残る 44 欠失区域は、それぞれ独立した領域であることを示し、合計 51 箇所のホモ欠失領域を同定した。このうち 20 箇所は、新規に同定されたホモ欠失領域であった。
3. アレイ解析に用いた 43 株の肺がん細胞株を含む 74 株の肺がん細胞株（非小細胞肺がん細胞株 52 株、小細胞肺がん株 22 株）について、51 箇所のホモ欠失領域におけるそれぞれの欠失の実態を Multiplex PCR 法にて検証し、全体で 45 細胞株において 98 箇所のホモ欠失を同定した。染色体部位としては、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になっていた。また、以前の報告同様、非小細胞肺がん細胞株におけるホモ欠失の頻度は、小細胞肺がん細胞株に比べて有意に高いことを確認した。

4. 51 箇所のホモ欠失領域内の 41 領域に、のべ 113 個の遺伝子の存在を確認し、74 株の肺がん細胞株に対して、Multiplex PCR 法により、個々の遺伝子断片の欠失の有無を検索した。この結果、既知のがん抑制遺伝子である *CDKN2A/CDKN2B* のホモ欠失を最も高い頻度 (74 株中 19 株; 26%) で認め、次いで肺がん抑制遺伝子候補 *PTPRD* と *LRP1B* のホモ欠失を、それぞれ 9 株 (12%)、8 株 (11%) に認めた。また、既知のがん抑制遺伝子である *RB1* のホモ欠失を 1 株 (1%) に見出した。更に、2q24 の 7 遺伝子、すなわち *GRB14*, *COBLL1*, *FLJ39822*, *SCN3A*, *SCN2A2*, *FAM130A2*, *GALNT3*, 2q34 の *ERBB4*, 3q14 の *FHIT*, 5q11 の *PDE4D*, 7q35 の *CNTNAP2*, 10p11 の *PARD3*, 16q23 の *WWOX*, 18q21 の *SMAD4*, 21q11-21 の 14 遺伝子、すなわち *RBM11*, *STCH*, *SAMSN1*, *NRIP1*, *USP25*, *C21orf34*, *CXADR*, *BTG3*, *C21orf91*, *CHODL*, *PRSS7*, *MIRNLET7C*, *MIRN99A*, *MIRN125B2*, 以上合計 28 個 (9 領域) の遺伝子のホモ欠失を 2 株以上の細胞株に認めた。この中には *RAS* の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* など、3 個のマイクロ RNA 遺伝子が含まれていた。また、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 株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。

5. 検出された一連のホモ欠失領域についてコピー数多型との異同を検討した。コピー数多型データベースから得た情報を解析したところ、51 箇所のホモ欠失領域のうち、21 領域がコピー数多型による変化である可能性が示唆された。しかし、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、7 株の肺がん細胞株と、それぞれ同一患者由来の 7 株の B リンパ球不死化細胞とをアレイ解析により比較し、7 株の肺がん細胞株で認められた 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。

以上、本論文では 43 株の肺がん細胞株ゲノム DNA に対して、これまで試みられていない高解像度アレイ解析法による 100 kb 解像度でのホモ欠失探索を行い、20 箇所の新規ホモ欠失領域を含む、51 箇所のホモ欠失領域を同定した。更に 74 株の肺がん細胞株における 51 領域各々の欠失の実態を示し、また欠失領域内に存在するマイクロ RNA 遺伝子 3 個を含む、113 個の遺伝子の欠失を明らかにした。これら 113 個の欠失遺伝子の中には、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、その不活化が肺がんの発生・進展に関与する肺がん抑制遺伝子が含まれている可能性が示唆される。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、他の肺がん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る。このように、本研究は肺がんの発生・進展にかかわる遺伝子、特にがん抑制遺伝子研究において、新たな手法と知見をもたらすものであり、学位の授与に値するものと考えられる。