

論文の内容の要旨

論文題目

**Strong association between the CpG island methylator phenotype and
HER2 amplification in human breast cancers**

和訳

ヒト乳がんにおける CpG island methylator phenotype と *HER2* 遺伝子増幅の
相関

指導教員 瀬戸 泰之 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 15 年 4 月入学
医学博士課程
外科学専攻
寺田 琴江

背景

乳がんは、近年本邦でも罹患率は上昇しており、特に若年者での死亡率が高いことが知られている。再発を規定する因子として、リンパ節転移の有無、ホルモン受容体（エストロゲン受容体及びプロゲステロン受容体）の発現状況、病理学的異型度、年齢（閉経状況）、腫瘍径、そして *HER2* 遺伝子増幅（*HER2* タンパク質発現）の有無などがあげられる。特に、*HER2* の遺伝子増幅（またはタンパク質発現）は、乳がんにおいて非常に重要な因子である。The epidermal growth factor receptor (EGFR) family のひとつである *HER2* の遺伝子産物の発現は、乳がんの 15~30%に認められ、悪性度や予後と強く関連している。そして、*HER2* に対するモノクローナル抗体である trastuzumab が出現し、乳が

ん治療に大きく貢献している。しかしながら、*HER2* 遺伝子増幅の分子機構や trastuzumab の臨床効果機構の詳細はまだ知られていない。

DNA のメチル化は様々な癌の発がんや進展に関わっていることが知られている。特に CpG islands のプロモーター領域のメチル化は、ゲノムの不安定性を引き起こすことや、癌抑制遺伝子のサイレンシングをもたらす。

多数の CpG islands のメチル化は、メチル化傾向 (the CpG island methylator phenotype : CIMP) と呼ばれて、ある種の悪性腫瘍 (大腸がん、胃がんなど) の性質や臨床病理学的所見と関連している。小児悪性腫瘍である神経芽細胞腫では、*MYCN* 遺伝子の増幅 (神経芽細胞腫の予後因子) と CIMP が関連しており、さらに CIMP は予後とより良く関連していることがわかってきた。

そこで私は、CIMP と乳がん、および *HER2* 遺伝子増幅の関連を探求することを研究目的とし、乳がんにおける発がんや *HER2* 遺伝子増幅メカニズムの解明に繋がることを目指した。

材料と方法

用いた検体は、原発性乳がんの手術を施行した 63 例の手術検体を用いた (stage I : 22 例、stage II : 26 例、stage III : 15 例、stage IV : 0 例)。これらの手術検体よりがん部および非がん部を採取し、DNA を抽出した。

HER2 遺伝子増幅の判定は FISH 法にて行った。

メチル化レベルの算出方法は、ゲノム DNA を抽出し、bisulfite 変換をした後、定量的なメチル化特異的 PCR 法 (methylation specific PCR) にて行った。

CIMP の検討遺伝子は、乳がんではメチル化が認められている 11 遺伝子 (*LOC346978*, *3OST2*, *GREM1*, *XT3*, *PCDH10*, *FLNC*, *THBD*, *COE2*, *CLDN3*, *F2R*, *AK5*) を用いた。また、CIMP の検討遺伝子には含めなかったが、癌抑制遺伝子である、*p16*, *BRCA1*, *CDH1* の 3 遺伝子のメチル化レベルの検出も行った。

統計解析として、傾向解析は the Mantel-Haenszel χ^2 検定を用いた。

結果

乳がん組織中の乳がん細胞含有量の測定

メチル化レベルのカットオフ値の決定のため、乳がん組織中の乳がん細胞含有量の測定を行った。摘出したがん組織の HE 標本から、無作為に 3 か所選択し、顕微鏡下でがん細胞と、がん細胞以外の細胞の数をそれぞれ計測して、がん細胞の割合を算出した。がん細胞含有率は、 $22.9 \pm 0.3\%$ と $19.8 \pm 5.2\%$ (平均値 \pm 標準偏差) であった(図 1)。

がん部と非がん部のメチル化レベルの比較

また、がん部より抽出された DNA のメチル化は、がん細胞由来であるのかの確認のため、非がん部のメチル化レベルの測定を行った。手術検体より、がん部と、その同側乳腺の非がん部組織から抽出したゲノム DNA のそれぞれのメチル化レベルを比較した(図 2)。11 症例について、それぞれ 9 個の遺伝子のメチル化レベルについて検討した。ほとんどの症例と遺伝子で、がん部のメチル化レベルのほうが高いことが確認された。以上より、がん部のメチル化レベルの高さは、がん細胞由来であることが確認された。

乳がんのメチル化レベルの解析

14 遺伝子のメチル化レベルを、63 症例すべてに行った(図 3)。メチル化レベルのカットオフ値を、10%、20%と設定し、カットオフ値以上のメチル化レベルを示すものをメチル化あり、カットオフ値未満をメチル化なし、とした(図 4)。2つのカットオフ値で各検体のもつメチル化された遺伝子数の検討を行ったが(図 5)、どちらも同じ傾向を示すことがわかり、CIMP の解析は 10%カットオフ値で行うこととした。

乳がんにおける CIMP の検討は、メチル化された遺伝子数によって CIMP-high, CIMP-low, CIMP-negative の 3 群に分類し検討した。CIMP-high を、メチル化された遺伝子数が 3 個以上のカットオフ数とすると、CIMP-high は 16 例、CIMP-low は 26 例、CIMP-negative は 21 例であった。また、メチル化された遺伝子数のカットオフ

数を4個以上とすると、CIMP-highは8例、CIMP-lowは34例、CIMP-negativeは21例となった。

HER2 遺伝子増幅と CIMP の相関

HER2 遺伝子増幅は FISH 法にて解析した。乳がん63例中24例(38%)に HER2 遺伝子増幅を認めた。遺伝子増幅の認められた症例における FISH 解析による遺伝子コピー数は、2.0-16.8であった。

メチル化された遺伝子数で分類すると、CIMP-highのカットオフ数を3個以上とした場合、HER2 遺伝子増幅を持つものは、CIMP-high, CIMP-low, CIMP-negative はそれぞれ、11/16、11/26、2/21であった。また、カットオフ数を4個以上とした場合、CIMP-high, CIMP-low, CIMP-negative はそれぞれ、6/8、16/34、2/21であった(図6)。HER2 遺伝子増幅とメチル化された遺伝子数の相関を傾向解析したところ、メチル化された遺伝子数が多い群ほど、有意差を持って HER2 遺伝子増幅が多いことが示され($P < 0.001$)、これは、2つのカットオフ数ともに、同様であった。

これに対し、遺伝子メチル化が細胞増殖に有利に働くと考えられる3つのがん抑制遺伝子、*CDKN2A*, *CDH1*, *BRCA1* のメチル化と、CIMP の解析では、3つのがん抑制遺伝子いずれも、CIMP との相関は認められなかった(表)。

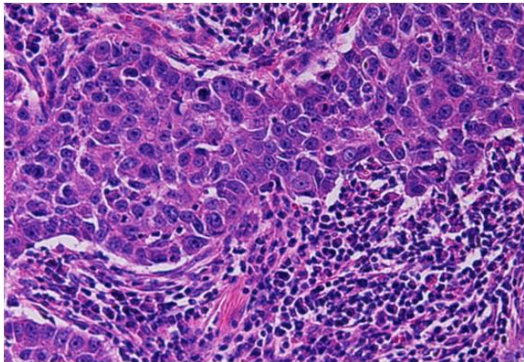
乳がんの臨床病理学的所見と CIMP

HER2 遺伝子増幅以外の乳がんの臨床病理学的所見の中では、高い核異型度と CIMP には有意差を持って相関が認められた ($P = 0.001$)。また、相関の傾向が認められたものは、病理学的 stage、閉経状態であった。しかし、リンパ節転移の有無、ホルモンレセプター (ESR, PgR) の発現とは、相関は認められなかった(表)。

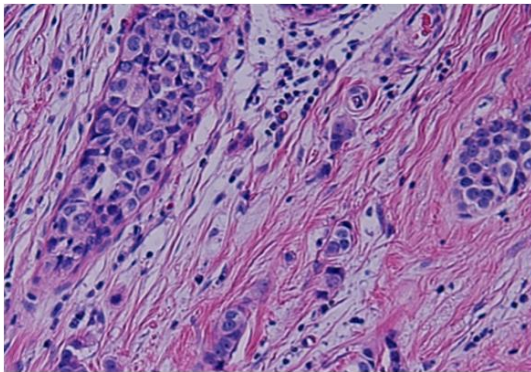
結語

本研究は、乳がんにおける CIMP と HER2 遺伝子増幅に相関が認められることを示した初めての報告である。これらは乳がんの発がんメカニズムの解明や今後の治

療の発展への糸口になると考えられる。



	がん細胞数	非がん細胞数
1回目	229 (23%)	781
2回目	227 (23%)	773
3回目	232 (23%)	768



	がん細胞数	非がん細胞数
1回目	191(19%)	809
2回目	53(25%)	747
3回目	49(15%)	851

図 1 乳がん組織中のがん細胞含有量の測定

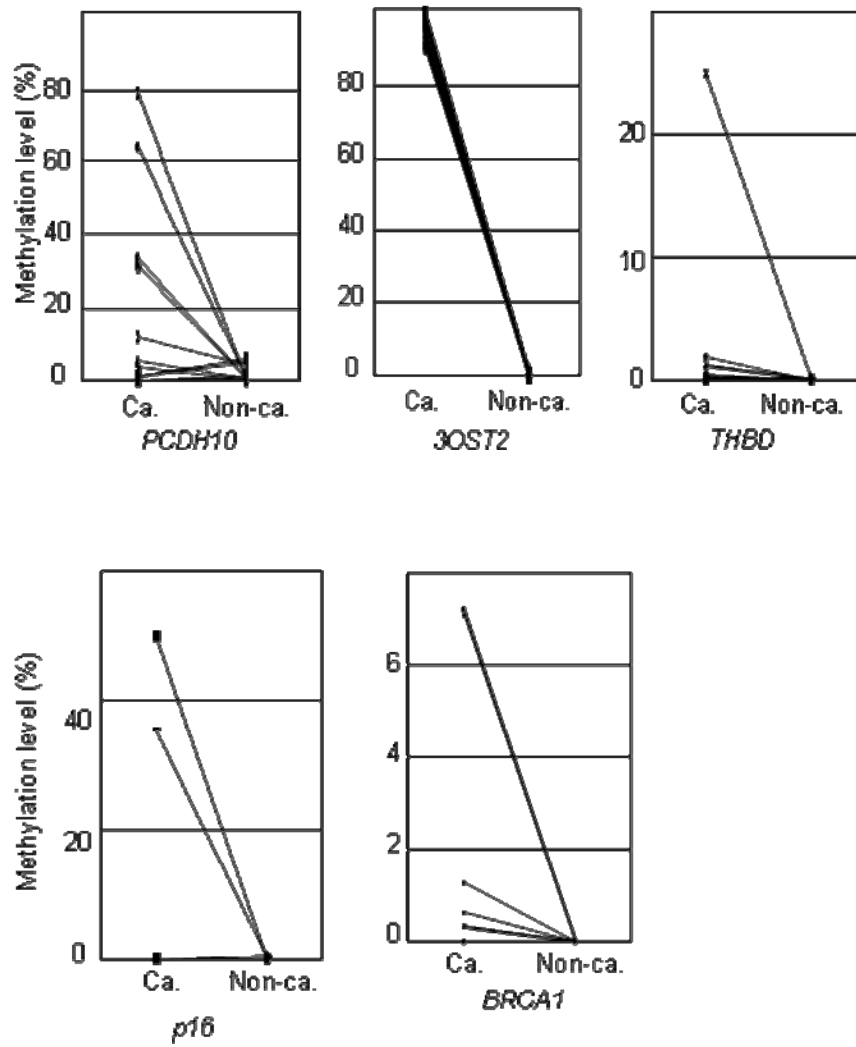


図2 がん部と非がん部のメチル化レベルの比較

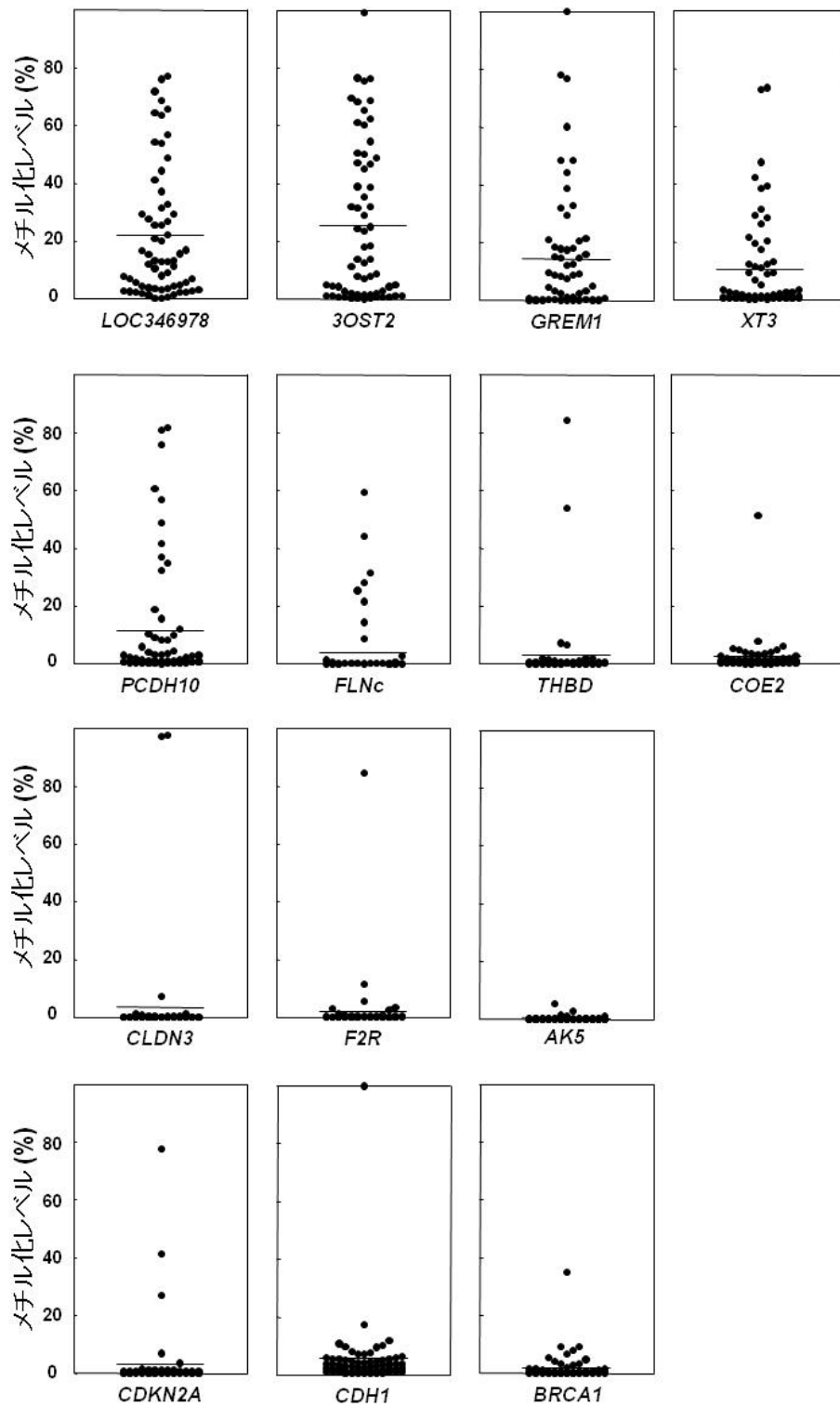


図 3 遺伝子による 14 遺伝子の乳がんのメチル化レベル

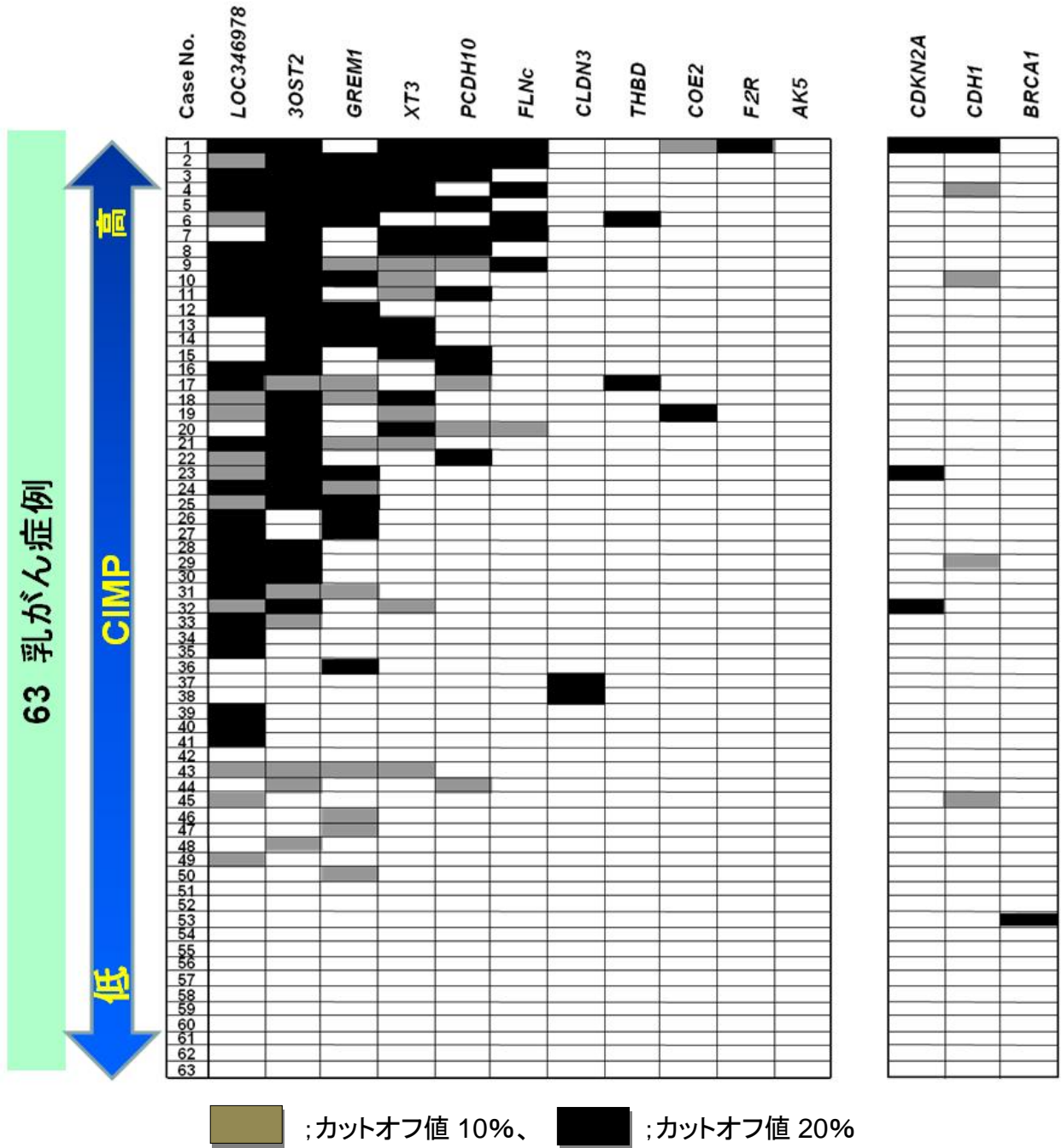


図 4 11 個のマーカー遺伝子と 3 個のがん抑制遺伝子のメチル化プロファイル

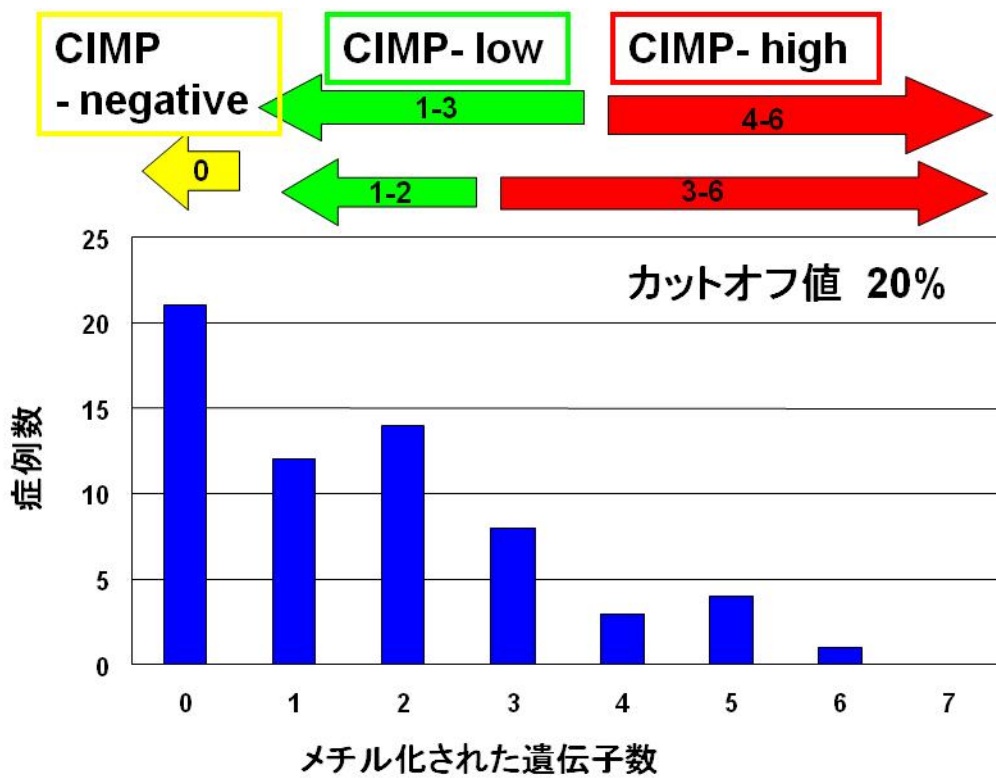
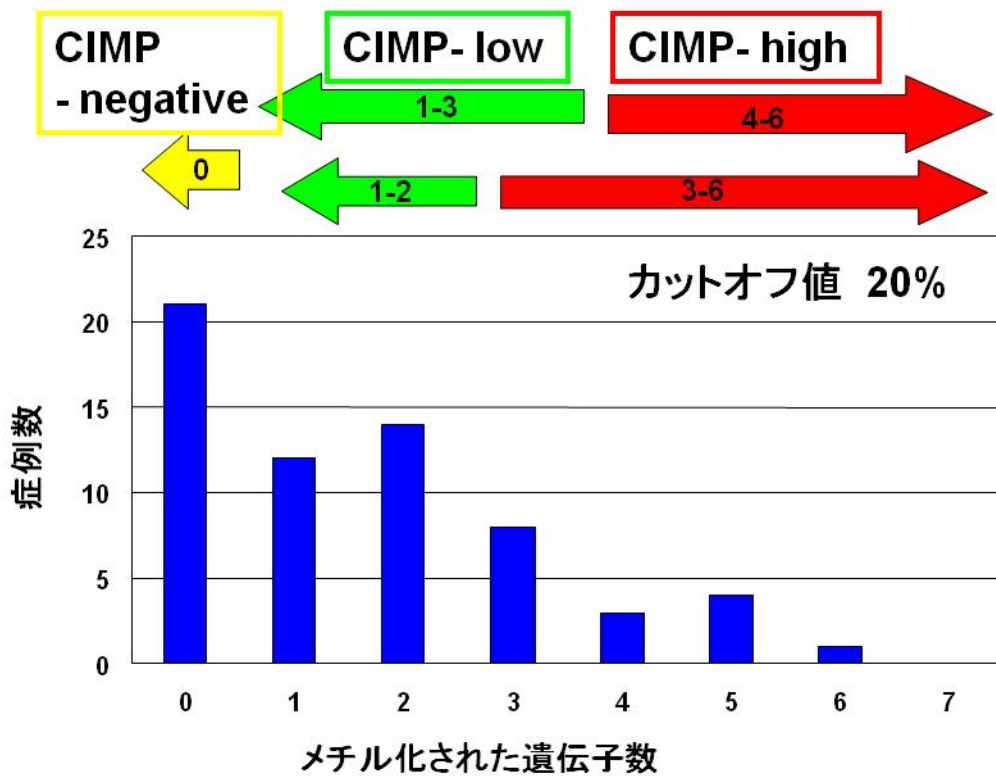
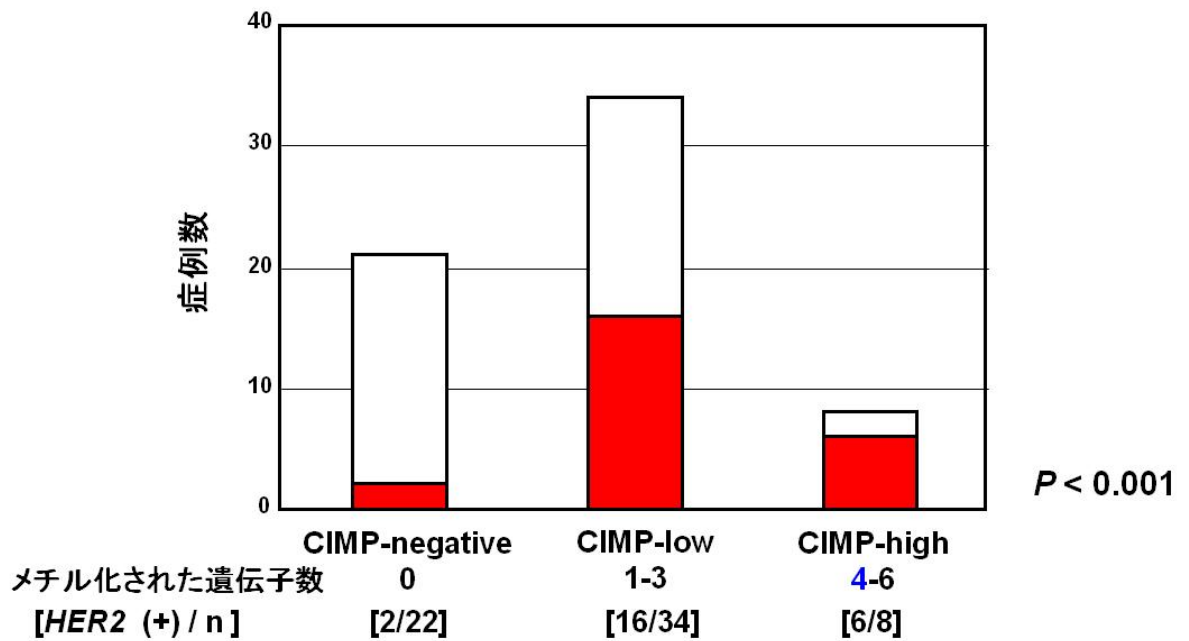
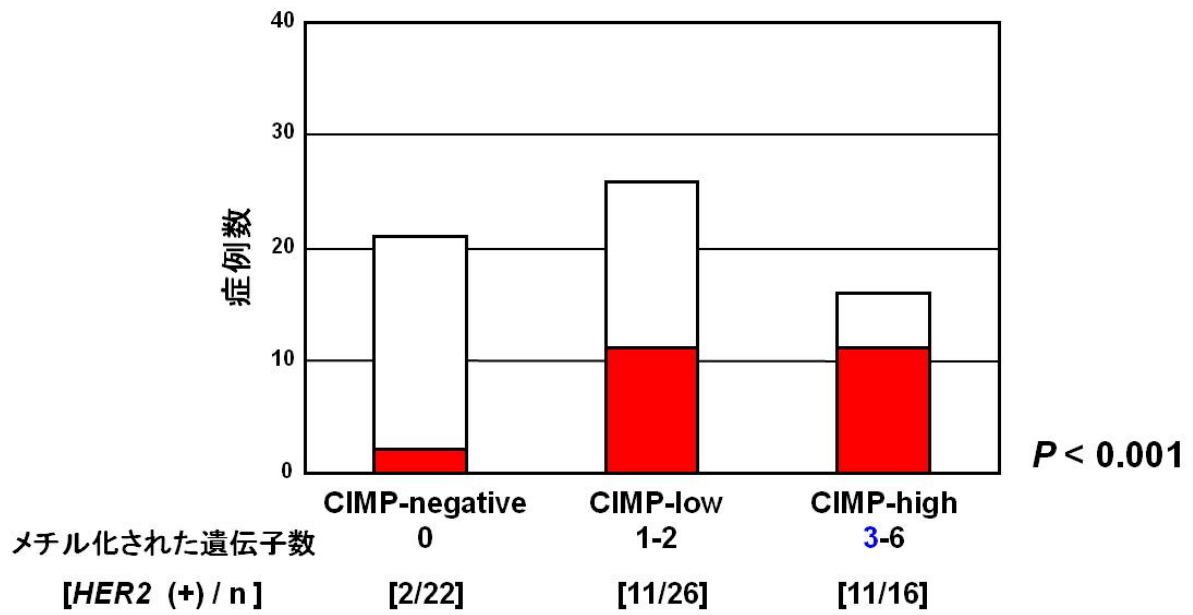


図 5





 *HER2* 遺伝子増幅 (-)
 *HER2* 遺伝子増幅 (+)

図 6 *HER2* 遺伝子増幅と CIMP

表 CIMP と臨床病理学的所見および癌抑制遺伝子のメチル化の関係

	CIMP- negative	CIMP- low	CIMP- high	<i>P</i> value
<i>p16</i> methylation (+/-)	0/11	1/28	3/20	0.106
<i>BRCA1</i> methylation (+/-)	0/11	2/27	3/20	0.182
<i>CDH1</i> methylation (+/-)	1/10	5/24	8/15	0.066
Menopausal (pre/post)	5/6	15/14	5/18	0.086
Stage (I/II/III)	5/6/0	10/13/6	7/7/9	0.053
Lymph node metastasis (positive/negative)	2/9	14/15	6/10	0.423
ESR (positive/negative)	8/3	17/12	9/14	0.053
PGR (positive/negative)	8/3	22/7	10/13	0.040
Nuclear grade (1/2/3)	2/5/4	3/11/15	1/4/18	0.016

CIMP-high : メチル化された遺伝子 4 個以上

Increasing or decreasing trends were tested by Mantel-Haenszel chi-square.

