

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト非小細胞肺癌における新規異常メチル化遺伝子の同定と切除標本における

メチル化プロファイルの解析

指導教員 中島 淳 准教授

東京大学大学院医学系研究科

2006年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 日下部 将史

肺癌は日本において臓器別の癌死亡者数が最も多く、他臓器の癌と比較して治療成績も良好とは言えない。近年、*EGFR* 遺伝子変異を有する肺癌患者に対してチロシンキナーゼ阻害剤が有効であるという報告がなされ、分子生物学的アプローチが肺癌診療において重要な位置を占めるようになってきている。また、発癌には DNA の異常メチル化をはじめとするエピジェネティクス異常も伴っていることが知られており、肺癌においても複数の異常メチル化遺伝子が報告されてきた。それら異常メチル化遺伝子の中には、*CDKN2A* (= *p16*) 遺伝子のメチル化のように予後と関連のある遺伝子も存在する。そこで、我々は、肺癌診療における新たなバイオマーカーや治療のターゲットとなり得る癌抑制遺伝子を同定

できる可能性があると考え、肺癌における新規異常メチル化遺伝子を検索することとした。

肺癌における新規異常メチル化遺伝子の検索を、バイオインフォマティクスの手法と実験的手法を組み合わせで行った。まず、インターネット上に一般公開されているマイクロアレイによる遺伝子発現情報 (Gene Expression Omnibus) にアクセスし、正常と比較して肺癌において発現が抑制されている遺伝子を抽出した。次に、遺伝子の機能に着目し、癌と関連が深い機能を有する遺伝子のみを Gene Ontology を利用して選択し、285 遺伝子が抽出された。これら 285 遺伝子の中で、プロモーター領域に CpG アイランドを有していた 224 遺伝子に対し、後に用いる PCR プライマーの設計を行い、173 遺伝子が残った。切除検体における 10 症例分の肺癌組織、正常組織それぞれの混合 DNA に対して、combined bisulfite restriction analysis (COBRA) を行い、肺癌組織でのみメチル化を有する 12 遺伝子を抽出した。最後に、切除検体 98 症例・101 サンプルに対して、quantitative analysis of methylated alleles (QAMA) を行い、最終的に非小細胞肺癌における異常メチル化遺伝子を 9 つ同定した。

これら 9 遺伝子のうち、*PTEN* は過去に肺癌でのメチル化の報告があったが、残りの 8 遺伝子 (*ARPC1B*, *DNAH9*, *FLRT2*, *GOS2*, *IRS2*, *PKP1*, *SPOCK1*, *UCHL1*) は我々が初めての報告となった。

過去に我々の研究室で報告した 10 遺伝子 (*APC*, *CALCA*, *DAPK*, *DBC1*, *ESR1*, *MYOD1*, *p16*, *RARB2*, *RASSF1A*, *TSLC1*) における切除肺癌 98 症例 101 サンプルの QAMA の結果と、今回我々が同定した 9 遺伝子 (*ARPC1B*, *DNAH9*, *FLRT2*, *GOS2*, *IRS2*, *PKP1*, *PTEN*, *SPOCK1*,

*UCHL1*) における同一の切除肺癌 98 症例 101 サンプルの QAMA の結果を統合し、19 遺伝子 101 サンプルにおける定量的なメチル化プロファイルに対して解析を行った。各遺伝子におけるメチル化陽性症例の割合を検討したところ、メチル化定量が 1%以上の症例の割合が従来最も使用されてきた定性的メチル化検出法である methylation-specific PCR (MSP) を用いた過去の報告と合致したことから、MSP ではメチル化定量 1%以上のサンプルをメチル化陽性と判定していたと推測された。また、メチル化定量 30%以上のサンプルの割合は 1%以上のサンプルと比較するとかなり減少し、調べた 19 遺伝子の半数程度の遺伝子においてメチル化陽性サンプルの割合が 10%を下回った。これは、メチル化陽性とされる症例においてもメチル化の定量値は比較的低値であることを示しており、癌そして DNA メチル化における不均一性が示唆された。続いて、階層的クラスター解析を行い、病理病期・組織型・*EGFR* 変異・喫煙歴・予後（平均追跡期間約 2 年）との関連を検討したが、明らかな関連は認められなかった。また、大腸癌において確立されている CpG island methylator phenotype (CIMP)を肺癌においても検討したが、階層的クラスター解析の結果と同様、明らかな関連は認められなかった。

前述の如く、複数の遺伝子群におけるメチル化プロファイルの解析においては有意な結果が得られなかったが、今回新たに同定された非小細胞肺癌における異常メチル化遺伝子の個々のメチル化プロファイルに対して解析を行ったところ、*G0S2* 遺伝子と *SPOCK1* 遺伝子のメチル化に関して臨床情報との関連を認めた。

肺癌の組織型に着目したところ、*GOS2* 遺伝子のメチル化が非扁平上皮癌（n=83, メチル化定量の平均=2.6%）と比較して扁平上皮癌（n=18, メチル化定量の平均=15%）において有意に高い（ $p<0.001$ , Mann-Whitney U test）ことが示された。*GOS2* 遺伝子の扁平上皮癌における DNA の異常メチル化が、臓器は異なるが同じ組織型である頭頸部癌においても報告があり、また、上皮系細胞ではないがマウスの 3T3-L1 細胞株において *GOS2* 遺伝子の発現が細胞の増殖停止と関連していたという報告も存在したため、*GOS2* 遺伝子の細胞増殖抑制機能が予測された。*GOS2* 遺伝子がメチル化により発現抑制されている肺扁平上皮癌細胞株（LC-1 sq）に、強制発現ベクターである pcDNA3.1 に *GOS2* 遺伝子を組み込んだプラスミドをトランスフェクションし、細胞増殖速度を検討したところ、*GOS2* 遺伝子に明らかな細胞増殖抑制機能がないことが示された。*GOS2* 遺伝子の発現は間質系組織で高く、細胞の増殖停止と関連していたという報告も 3T3-L1 というマウスの間質系由来の細胞株での結果であり、肺癌という上皮系組織における *GOS2* 遺伝子の機能と間質系組織での機能は異なる可能性がある。*GOS2* 遺伝子発現におけるエピジェネティクスの関わりを、肺扁平上皮癌細胞株や normal human bronchial epithelial cells (NHBE)において調べたところ、DNA メチル化と mRNA 発現は逆相関の状態にあった。DNA 脱メチル化剤の 5-Aza-2'-deoxycytidine・ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である Trichostatin A・*GOS2* 遺伝子に対する核内転写因子である All trans retinoic acid・PPAR $\alpha$  agonist・PPAR $\gamma$  agonist を単独ないしは組み合わせて、*GOS2* 遺伝子がメチル化により発現抑制されている肺扁平上皮癌細胞株（LC-1 sq）に投与

して発現の変化を調べたところ、5-Aza-2'-deoxycytidine のみが発現回復に関与していた。

Chromatin immunoprecipitation を利用してヒストンメチル化を調べたところ、*GOS2* 遺伝子の発現によらずヒストン H3K9 メチル化が存在していた。これらを総合すると、*GOS2* 遺伝子の発現は主に DNA メチル化によって調節されていると考えられる。

*SPOCK1* 遺伝子のメチル化が、病理病期が進行している症例において多いことが示された。平均追跡期間約 2 年という短い観察期間においてであるが、病理病期という大きな交絡因子を除いた結果、*SPOCK1* 遺伝子のメチル化が再発予後を予測する有意な因子ではないことが示されたが、stage IB に関しては *SPOCK1* 遺伝子のメチル化がある症例群が予後不良である傾向は認められた。

今回 DNA メチル化定量に主に用いた QAMA は、MSP・MethyLight と異なり過去に報告が少ないメチル化定量法であったが、複数の濃度が既知のサンプルを QAMA で測定することで、十分な定量の正確さ、再現性を有する方法であることが示された。

本研究は、肺癌という疾患に対して、エピジェネティクスの側面からアプローチした研究である。我々は独自の手法を用いることで、非小細胞肺癌における新規異常メチル化遺伝子を 8 つ同定した。それら遺伝子の中で、*GOS2* 遺伝子のメチル化が扁平上皮癌において有意に多いこと、*SPOCK1* 遺伝子のメチル化が再発の予測因子である可能性があることが示された。定量的メチル化測定法である QAMA の良好な再現性も示され、肺癌研究におけるエピジェネティクス異常のさらなる解析が期待される。