

審査の結果の要旨

氏名 日下部 将史

本研究は、未だに予後不良の疾患であるヒト非小細胞肺癌の診療において、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の検索と切除標本におけるメチル化プロファイルの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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 (*ARPC1B*, *DNAH9*, *FLRT2*, *GOS2*, *IRS2*, *PKP1*, *SPOCK1*, *UCHL1*) 同定した。
2. 切除標本101サンプルにおける19遺伝子(今回新たに同定された異常メチル化遺伝子に加え、過去に報告のあった肺癌における異常メチル化遺伝子を加えた)の定量的メチル化プロファイルの解析を行い、メチル化陽性とされるサンプルにおいてもメチル化の定量値は比較的 low であることが示された。また、メチル化定量が1%以上のサンプル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することが示された。一方、階層的クラスター解析や大腸癌において確立されている CpG island methylator phenotype (CIMP)の肺癌における解析においては、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。
3. 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* 遺伝子の細胞増殖に与える影響を調べたところ、発現がある系の方が細胞増殖が早いことが示された。
4. *GOS2* 遺伝子の mRNA 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ることが示された。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。
5. *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。

6. 今回の一連の研究において 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。

以上、本論文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。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、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と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。