

論文の内容の要旨

論文題目 DNA メチル化情報を用いた大腸癌のエピジェノタイピング

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 18 年 4 月入(進)学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 八木 浩一

[背景と目的]

悪性腫瘍はジェネティックな変化とエピジェネティックな変化が蓄積した結果生じる。大腸癌におけるジェネティックな変化として *APC* 変異、*KRAS* 変異、*p53* 変異などの遺伝子変異、及びマイクロサテライト不安定性、染色体不安定性が有名である。エピジェネティックな変化として DNA メチル化異常、ヒストン修飾異常、ゲノムインプリンティング異常などが知られている。遺伝子プロモーター領域の異常メチル化は遺伝子のエピジェネティックな不活化機構であり、癌の発生や進展に密接に関与している。

一部の大腸癌では、遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化が著しく亢進しており、CpG island methylator phenotype (CIMP) と呼ばれている。この CIMP の概念は 1999 年に提唱され、マイクロサテライト不安定性と相関すると報告された。2006 年には新規 CIMP マーカーが提唱され、CIMP がマイクロサテライト不安定性と *BRAF* 変異と相関すると報告された。最近では、CIMP-low、CIMP-2 と表現される *KRAS* 変異と相関する中間メチル化群の存在が示唆されているが、その同定のためのマーカーは確立されておらず、存在そのものも未だコンセンサスが得られていない。

本研究では、従来から汎用されているメチル化マーカーのみならず、マ

マイクロサテライト不安定大腸癌細胞株 HCT116、マイクロサテライト安定大腸癌細胞株 SW480 の両細胞株のゲノムワイドなメチル化および発現解析から得られた新規メチル化マーカーを用いて大腸癌を DNA メチル化情報で分類 (=エピジェノタイプング) を行い、まず中間メチル化群が存在するか検証することを第一の目的とした。中間メチル化群を同定するための適切な分類方法を提唱し、遺伝子変異、臨床病理学的因子、予後などの因子との相関を解析することを第二の目的とした。

[材料と方法]

大腸癌細胞株 HCT116 及び SW480 のゲノムワイドなメチル化情報を得るために、ヒト 25500 遺伝子の転写開始点上流 7.5k から下流 2.45k をタイルするプロモーターアレイを用いて、メチル化 DNA 免疫沈降-アレイ解析を行った。またゲノムワイドな発現データを得るために、正常大腸、胎児大腸、HCT116 および SW480 の脱メチル化剤処理サンプル、脱メチル化剤/ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理サンプル、および薬剤未処理サンプルについて、マイクロアレイを用いた発現解析を行った。

メチル化の解析は高い定量性と多検体を同時に解析できる高いスループットを兼ね備えている MassARRAY を用いて行った。メチル化解析サンプルは大腸癌 213 サンプルのうち癌細胞含有率 40%以上であった 149 サンプル、正常大腸粘膜 9 サンプル、大腸癌細胞株 6 サンプルとした。ジェネティックな変化の解析としてマイクロサテライト不安定性解析、*BRAF* 遺伝子変異解析、*KRAS* 遺伝子変異解析、及び p53 免疫染色を行った。

[結果]

サイレンシング候補遺伝子抽出の条件として下記 4 条件を設けて候補遺伝子を抽出した 1) メチル化 DNA 免疫沈降-アレイ解析で転写開始点上下 1kbp 以内にメチル化候補領域をもつ、2) 細胞株のマイクロアレイの発現スコア<50、3) 脱メチル化剤処理または脱メチル化剤/ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤処理により発現が発現スコアで 1.5 倍以上回復、4) 正常大腸もしくは胎児大腸 における発現スコア>50 。HCT116 単独で 4 条件を満たす遺伝子は 577 個、SW480 単独では 313 個、HCT116 および SW480 両方で満たす遺伝子が 421 個あった。これらの遺伝子より、それぞれ、21 遺伝子、10 遺伝子、24 遺伝子選択した。その他従来から汎用されている CIMP マーカーとして 13 領域、大腸癌でメチル化の報告のある 6 遺伝子をサイレンシング遺伝子として選択した。このうち、定量性が確認された 60 マーカーについてサンプルのメチル化解析を行った。

DNA メチル化情報で大腸癌を分類(エピジェノタイプング)するため、60

マーカーのメチル化情報を用いて臨床大腸癌検体 149 検体、正常大腸粘膜 9 検体、細胞株 6 株を 2 方向性階層的クラスタリングで分類した。臨床大腸癌検体は 3 群のエピジェノタイプ、マイクロサテライト不安定性の 3 細胞株と同じクラスターに属する高メチル化エピジェノタイプ群、マイクロサテライト安定性の 3 細胞株と同じクラスターに属する中間メチル化エピジェノタイプ群、及び低メチル化エピジェノタイプ群に分類された。正常大腸粘膜サンプルはすべてメチル化の少ないクラスターとして別のクラスターに分類された。

高メチル化群は 17 大腸癌サンプルで構成されており、マイクロサテライト不安定性 13 例(76%)、*BRAF*変異(+) 12 例(71%)、*KRAS*変異(+) 3 例(18%)、p53 免疫染色(+) 0 例(0%)であった。中間メチル化群は 60 大腸癌サンプルで構成されており、マイクロサテライト不安定 2 例(3%)、*BRAF*変異(+) 0 例(0%)、*KRAS*変異(+) 38 例(63%)、p53 免疫染色(+) 29 例(50%)であった。低メチル化群は 54 大腸癌サンプルで構成されており、マイクロサテライト不安定 0 例(0%)、*BRAF*変異(+) 0 例(0%)、*KRAS*変異(+) 14 例(26%)、p53 免疫染色(+) 30 例(57%)であった。3 群間のエピジェノタイプの比較では、マイクロサテライト不安定性 ($P=1.6 \times 10^{-14}$, Fisher's exact test)、*BRAF* 変異($P=2.0 \times 10^{-13}$)、*KRAS* 変異 ($P=2.3 \times 10^{-5}$)、p53 免疫染色($P=2.4 \times 10^{-5}$)で有意差を認めた。中間メチル化群と低メチル化群の 2 群間の比較では、*KRAS* 変異にのみ有意差を認めた($P=7.4 \times 10^{-5}$)。各エピジェノタイプと年齢、性別、臨床病期、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲、腫瘍占拠部位、粘液成分、未分化成分の臨床病理学的因子の相関について比較した。高メチル化群は高齢者 ($P=8.5 \times 10^{-3}$, ANOVA)、女性($P=0.038$)、近位側腫瘍占拠部位($P=8.7 \times 10^{-7}$)、粘液成分あり ($P=9.7 \times 10^{-8}$)、未分化成分あり ($P=7.5 \times 10^{-3}$)が多かった。中間メチル化群と低メチル化群の 2 群間の比較では粘液成分で有意差を認める($P=1.4 \times 10^{-5}$)のみであった。

解析した 60 メチル化マーカーは、クラスタリングにより 2 群のグループに分類された。高メチル化群でのみ高いメチル化率を示す Group-1 マーカーと高メチル化群と中間メチル化群で高いメチル化率を示す Group-2 マーカーの 2 グループに分類されることが示唆された。これらのマーカーを用いて簡便にエピジェノタイプを決定するために、二段階パネル方式という新しい概念でエピジェノタイプ分類法を構築した。パネル-1 は 3 個 Group-1 マーカー *LOX*、*CACNA1G*、*SLC30A10* で構成されており、2-3 個メチル化(+)の検体が高メチル化群と判定される。0-1 個メチル化(+)の検体がパネル-2 に進む。パネル-2 は 4 個の Group-2 マーカー *ELMO1*、*FBN2*、*THBD*、*HAND1* と *SLC30A10* で構成され、これら合計 5 個のうち 3 個以上メチル化(+)のサンプルを中間メチル化群、0-2 個メチル化(+)のサンプルを低メチル化群と判定した。このモデルは 90 サンプルのトレーニングセットで構築され、41 サンプルのテストセットでの検

討では 39 サンプル(95%)が正しく分類された。

遺伝子変異、エピジェノタイプが大腸癌の予後予測に有用であるかを、マイクロサテライト安定大腸癌のサンプルを用いて検討した。中間メチル化群と低メチル化群の比較では、大腸癌に起因する予後に有意差はなく($P=0.18$ 、ログランク検定)、*KRAS* 変異(+)と *KRAS* 変異(-)の比較でも予後に有意差を認めなかった($P=0.074$)。 *KRAS* 変異と中間メチル化群が強く相関することから、*KRAS* 変異の有無とエピジェノタイプで 4 群に分類して検討した。 *KRAS* 変異(+)中間メチル化群 (n=37)が最も予後が悪く、 *KRAS* 変異(-)低メチル化群 (n=49)と比較して有意に予後不良であった($P=0.036$)。さらに *KRAS* 変異(+)中間メチル化群 (n=37)と、それ以外の 3 群をまとめた群(n=89)の比較では、*KRAS* 変異(+)中間メチル化群が有意に予後不良であった($P=0.027$)。

[考察]

本研究ではメチル化解析を単一で定量性が高い解析法で行い、階層的クラスタリングを用いて大腸癌を 3 群のエピジェノタイプに分類し、中間メチル化群が *KRAS* 変異と相関することを初めて示した。また本研究はメチル化マーカーが 2 群に分類されることを初めて示した。従来汎用されてきた CIMP マーカーは、1 個を除いてすべて Group-1 マーカーに分類され、高メチル化群を抽出する目的には適していると考えられたが、中間メチル化群を区別する目的には適切ではないと考えられた。 Group-2 マーカーに分類されたマーカーを有効に用いることで、中間メチル化群を区別できると考えた。このことを踏まえ、エピジェノタイプの分類に二段階パネル分類法という新しい概念を導入し、モデルを構築した。これは、全大腸癌の中から最初に高メチル化群を抽出、次に中間メチル化群と低メチル化群を分類するという概念であり、今までこのような概念で大腸癌を分類した報告はない。異なるサンプルセット及び、他のメチル化解析手法との整合性については、今後の課題である。

エピジェノタイプの成因については不明であるが、2 つの可能性が考えられる。癌遺伝子活性化自体がゲノムワイドに異なるエピジェネティックな変化を誘導する第一の可能性、癌遺伝子の活性化自体は DNA メチル化を誘導しないが、癌遺伝子変異による誘導される早期細胞老化を回避し癌になるために DNA メチル化による遺伝子の不活化が必要である第二の可能性である。 *BRAF* が不活化を要求する遺伝子群が、 *KRAS* が不活化を要求する遺伝子群を包括しており、それがクラスタリングで確認された高メチル化群と中間メチル化群の異なるエピジェノタイプをもたらしていると推測される。

本研究では *KRAS* 変異(+)中間メチル化群が最も予後が悪く、エピジェノタイプ分類が予後予測に有用であることを示した。中間メチル化群の予後が

悪いという過去の報告があるが、本研究とは用いたメチル化マーカーも分類方法も異なっているため、単純比較はできない。なお、本研究で用いた大腸癌症例は、すべて抗 EGFR 抗体を用いた治療歴のない症例である。抗 EGFR 抗体は *KRAS* 変異を有する大腸癌に対して効果が期待できないと報告されているため、今後この予後の差はより顕著になる可能性がある。この予後の悪い群に対してエピジェネティック変化や遺伝子変異を標的とした新たな治療が確立されることで大腸癌の予後改善に大きく寄与できるものとする。