

## 論文の内容の要旨

論文題目 進行非小細胞肺癌患者における血清 DNA メチル化解析と  
その臨床的諸因子との関連に関する研究

指導教員 長瀬 隆英教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 工富 知子

わが国の原発性肺癌による年間死亡者数は、2009 年人口動態統計月報によると、約 6 万 8000 人、癌死亡の中で男性では第 1 位、女性では大腸癌に続く第 2 位を占め、原発性肺癌は難治癌の代表となっている。原発性肺癌の組織型は、非小細胞肺癌が約 90%を占めている。非小細胞肺癌は、治癒のためには早期に発見し手術療法を行うことが必要であるが、実際には、手術可能な症例は 40%程度であり、初診時に既に手術不能な臨床病期 B・期へと進行している場合が多い。進行非小細胞肺癌における標準的化学療法であるプラチナ製剤を含む 2 剤併用化学療法の奏効率 (CR+PR) は約 30%、全体での生存中央期間は 10-12 カ月に留まり、進行非小細胞肺癌の予後は極めて不良である。一方、化学療法の

副作用は少なくなく、QOL の低下にもつながる可能性を考慮すると、あらかじめ化学療法が奏功する症例を選別したうえで、化学療法を行うことが望ましい。そこで、本研究では、非小細胞肺癌においてプロモーター領域の CpG アイランドに異常なメチル化を有する遺伝子の抽出を行い、それらの遺伝子に対して、血清 DNA を用いてメチル化の解析を行い、臨床的諸因子、特に化学療法に対する奏功性との関連を検討することを目的とした。限られた量の患者血清検体から、解析対象遺伝子の DNA メチル化を解析するのに十分な量の血清 DNA を抽出するため、血清 DNA の抽出方法に関して検討を行った。また、進行非小細胞肺癌患者の末梢血白血球数と血清 DNA 量の比較検討も行った。

まず初めに、血清 DNA の抽出方法に関して検討を行った。肺組織からの DNA 抽出方法を用いた血清 DNA 収量をコントロールとし、タンパク変性時に添加する NaCl 濃度・EDTA 濃度・ProteinaseK 濃度の検討、塩化カルシウム・塩酸グアニジンを用いたタンパク変性の検討、市販の DNA 抽出キットによる血清 DNA 抽出の検討、限外濾過膜によるタンパク除去を行った場合の血清 DNA 収量の検討を行った。その結果、タンパク変性時に NaCl を添加せず、ProteinaseK を増量し、タンパク変性を十分に行うことで、肺組織からの DNA 抽出方法を用いた血清 DNA 抽出方法と比較し、血清 DNA 収量を 3.7 倍に増加できた。また、抽出

した血清 DNA の GAPDH 遺伝子を Real-time PCR で定量し、健常人白血球 DNA を用いて作製した標準曲線をもとに血清 DNA 含量を定量すると、健常人血清 DNA 含量 median 41.2 ng/ml (23.8-68.0ng/ml n=6)、非小細胞肺癌患者血清 DNA 含量 median 301 ng/ml (58.1-899ng/ml n=18) であった。今回検討し採用した血清 DNA 抽出方法を用いることで、Gautschi 等による DNA 抽出キットを用いた血清 DNA 抽出の報告(健常人血清 DNA 含量 median 12.6 ng/ml, 非小細胞肺癌患者血清 DNA 含量 median 39.6 ng/ml)、Danese 等による DNA 抽出キットを用いた血清 DNA 抽出の報告(健常人血清 DNA 含量 median 14.0 ng/ml, 大腸癌患者血清 DNA 含量 median 91.5 ng/ml)と比べ、血清 DNA 収量を増加させることが出来た。また、健常人血清と比較し非小細胞肺癌患者血清で有意に血清 DNA 含量が多かったこと (Mann-Whitney rank sum test,  $p < 0.0001$ )、患者末梢血白血球数と血清 DNA 含量との間に統計学的に有意な正の相関は認めず ( $r = 0.23$ ,  $p = 0.36$ )、健常人と同程度の末梢白血球数を有する進行非小細胞肺癌患者でも有意に血清 DNA 含量が多いことより (Mann-Whitney rank sum test,  $p = 0.0002$ )、患者血清 DNA 含量の増加は末梢血白血球由来以外の担癌状態に基づくものであり、癌由来 DNA が血清中に存在する可能性が考えられた。

次に、血清 DNA のメチル化解析の対象とする遺伝子の選択を行った。NCBI の Gene Expression Omnibus で公開されている、肺癌細胞株と正常気道上皮細胞株、あるいは肺癌組織と正常肺組織との発現比較が可能なマイクロアレイを用いた 6 つの発現プロファイルのデータセット ( GDS1688, GDS1650, GDS1312, GSE7339, GSE6044, GSE4824 ) を解析に使用した。1 つ以上のデータセットで肺癌細胞株・肺癌組織で 1/8 以下に発現が低下し、かつその他のデータセットで肺癌細胞株・肺癌組織で 8 倍以上の発現上昇を認めない遺伝子を抽出し、更に、癌の増殖・進展に深く関与すると考えられる 7 つの Gene ontology ( cell communication(GO:0007154), cell adhesion(GO:0007155), cell cycle(GO:0007049), cell cycle process(GO:0022402), cell motility(GO:0006928), cell proliferation(GO:0008283), cellular developmental process(GO:0048869) ) のいずれかと関連する 285 遺伝子を抽出した。285 遺伝子に対し、CpG Island Searcher を用いて、遺伝子のプロモーター領域に CpG アイランドが存在する 224 遺伝子を抽出した。これら 224 遺伝子のうち 173 遺伝子に対しメチル化 DNA、非メチル化 DNA の両者を PCR で増幅可能な、CpG アイランド内で CpG 配列を含まないプライマーの設計が可能であり、Bisulfite 法・COBRA 法( combined bisulfite restriction analysis)によるメチル化解析で、実際に肺癌組織検体 DNA でプロモーター領域の DNA メチル化が生じていた 10 遺伝子 ( *PKP1*, *SPOCK1*, *FLRT2*, *IRS2*, *DNAH9*,

*PTEN, UCHL1, GOS2, OSMR, ARPC1B* )を抽出した。10 遺伝子のうち、メチル化の有無を検出する TaqMan MGB プローブが作製可能であった 8 遺伝子 (*PKP1, SPOCK1, FLRT2, IRS2, DNAH9, PTEN, UCHL1, GOS2* )と、肺癌組織においてプロモーター領域の DNA メチル化が認められる場合があり予後と関連があると報告されている 10 遺伝子 (*p16, APC, ESR, RASSF1A, RARB2, CALCA, DAPK, DBC1, TSLC1, MYOD1* )を加えた計 18 遺伝子を解析対象遺伝子とした。

これら、18 遺伝子を対象として、非小細胞肺癌患者 18 名のプラチナ製剤を含む初回 2 剤併用化学療法前血清と健常人 6 名の血清を用いて、QAMA 法 (quantitative analysis of methylated alleles) を用いた定性的解析を行い、得られた各遺伝子の DNA メチル化の状態に対し、階層的クラスター解析と Fisher 検定を行った。階層的クラスター解析では臨床的諸因子 (性別・年齢・組織型・喫煙歴・臨床病期・標的病変の縮小率・化学療法効果判定・全生存期間・無増悪生存期間) と関連があると考えられる遺伝子群は認められなかったが、Fisher 検定で各々の臨床的因子と DNA メチル化の有無の関連を検討したところ、p16 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化の存在と、化学療法の効果が PR であることの間に関連を認めた (Fisher 検定  $p=0.0004$ ,  $n=18$  )。また、プラチナ製剤を含む 2 剤併用化学療法により PR となった症例で生存期間中央値の延長 (PR 9 例  $MST=737$  日, SD/PD 9 例  $MST=303$  日, log rank test  $p=0.011$  )、無増悪生存期間中

中央値の延長( PR 9 例 median PFS =227 日, SD/PD 9 例 median PFS =97 日, log rank test  $p=0.00019$  ) を認めるのと同様に、p16 遺伝子メチル化陽性例で生存期間中央値の延長(p16 メチル化陽性 8 例 MST=801 日, p16 メチル化陰性 10 例 MST=311 日, log rank test  $p=0.022$ )、無病増悪生存期間中央値の延長 ( p16 メチル化陽性 8 例 median PFS =236 日, p16 メチル化陰性 10 例 median PFS =98 日, log rank test  $p=0.0022$  ) が認められた。

以上より、進行非小細胞肺癌患者において、化学療法前の血清 DNA を用いた p16 遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析を行うことで、シスプラチンを含む化学療法の効果を予測できる可能性が示された。

本研究は、進行非小細胞肺癌患者症例として、癌の既往のない、初回治療としてプラチナ製剤を含む 2 剤併用化学療法を 2 コース行った症例に限定したため、症例数は 18 例に留まった。また、プライマーの作製部位が原因と考えられる、p16 遺伝子の DNA メチル化が、健常人血清で 6 例中 1 例検出された。

今後、健常人では DNA メチル化が生じないと考えられる、exon1 前半からプロモーター領域での p16 遺伝子のプライマー・プローブ作成による精度の上昇、症例数の蓄積が必要であると考えられた。