

## 審査の結果の要旨

氏名 工富 知子

本研究は非小細胞肺癌患者血清 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ており、下記の結果を得ている。

- 1 . 血清 DNA 抽出方法の検討の結果、タンパク変性時に NaCl を添加せず、Proteinase K を増量しタンパク変性を十分に行うことにより、現在までに報告されている市販の DNA 抽出キットを使用した場合と比較し、約 3 から 7 倍の血清 DNA が抽出可能となった。
- 2 . 健常人・進行非小細胞肺癌患者血清 DNA の GAPDH 遺伝子を Real-time PCR で計測し、健常人白血球 DNA を用いて作製した標準曲線から血清 DNA 量を定量した。健常人と比較し患者血清で有意に血清 DNA 含量が多いことが示された ( Mann-Whitney rank sum test,  $p < 0.0001$  )。また、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示された。
- 3 . Gene Expression Omnibus で公開されているマイクロアレイデータと癌の増殖・進展に關与する遺伝子機能 ( Gene ontology ) を解析することにより、肺癌組織または肺癌細胞株で正常肺組織、正常気道上皮細胞株と比較し遺伝子発現が低下している 285 遺伝子が抽出された。Bisulfite 法・

COBRA 法( combined bisulfite restriction analysis)によるメチル化解析を行い、実際に肺癌組織検体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* ) が抽出された。 *PTEN* 以外の 9 遺伝子は肺癌でのプロモーター領域 DNA メチル化の報告はなく、肺癌組織でプロモーター領域 DNA メチル化が生じうる新規遺伝子が示された。

4.           メチル化の有無を判別する TaqMan MGB プローブを作製できた 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、非小細胞肺癌患者 18 例のプラチナ製剤を含む初回 2 剤併用化学療法前血清 DNA メチル化解析を QAMA 法( quantitative analysis of methylated alleles ) を用いて行い、臨床的背景因子との関連を階層的クラスター解析と Fisher 検定で検討した。その結果、階層的クラスター解析では臨床的諸因子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、 *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が認められた ( Fisher 検定  $p=0.0004$ ,  $n=18$  )。また、 *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、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。

以上、本論文で、既存の方法と比較し血清 DNA 収量を上げる抽出方法が明らかとなった。肺癌組織でプロモーター領域 DNA メチル化が生じうる新規遺伝子が示された。また、進行非小細胞肺癌患者の血清 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奏功性を予測できる可能性が示された。患者血清 DNA を用いた *p16* 遺伝子のメチル化解析による化学療法の事前予測は、健常人血清 DNA でも *p16* 遺

伝子のメチル化を認めた症例があること、メチル化解析において、2 検体のうち 1 検体でメチル化陽性の場合もメチル化陽性と判定した症例があることより、今後、症例数の蓄積、メチル化解析精度の上昇が必要であると考えられた。本研究は、血清 DNA を用いた研究、非小細胞肺癌患者血清を用いた化学療法奏功性の事前予測に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。