

論文の内容の要旨

論文題目 非小細胞肺癌のDNAメチル化によるマイクロRNAの
発現抑制と臨床・病理的特徴との関連

氏名 北野 健太郎

肺癌は本邦並びに世界的にも癌死の第1位であり、他臓器の癌と比較して治療成績は良好とは言えない。遺伝子工学の発達にともなって、肺癌の分子生物学異常についても多くの研究が行われてきた。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が関与していることが知られており、肺癌においては*CDKN2A* 遺伝子のメチル化が予後と関連するという報告がある。マイクロRNAは約22塩基長のノンコーディングRNAで、その配列特異性を鍵として標的遺伝子発現を抑制する。肺癌においてはマイクロRNAの一種である*let-7*の低発現が進行した病期と不良な予後に関連するという報告がある。マイクロRNAはタンパクをコードする遺伝子と同様、ゲノムDNAからの転写を由来としていることから、その発現調節にはエピジェネティクスも関与していると考えられる。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うる癌抑

制的なマイクロ RNA を同定できる可能性があると考え、2つの実験を行った。

1つめの実験は、肺癌におけるマイクロ RNA のエピジェネティックサイレンシングの検索である。すなわち、肺癌において、DNA メチル化によって発現が抑制されているマイクロ RNA が存在するかという課題である。当研究室でこれまで行ってきた手法として、まず肺癌細胞株で CpG アイランドに関連するマイクロ RNA の発現量を定量し、脱メチル化剤で処理することで発現量が増加したマイクロ RNA から絞り込むことで、最終的に2つのマイクロ RNA (miR-34b と miR-126) を同定した。今回、そこから漏れたマイクロ RNA を改めて検索することにした。アプローチ法を変え、まずゲノム上で異常なメチル化のある、マイクロ RNA のコードされている領域 (マイクロ RNA 領域) を検索することとした。

2010年1月時点で入手可能なキットで定量可能な完成型マイクロ RNA のうち、CpG アイランド上にコードされているマイクロ RNA は30個であった。性染色体上にコードされているもの、ひとつの完成型マイクロ RNA に対して複数の pre-miRNA が存在するもの、当研究室ですでに研究を進めていたものなどを除外した結果、8個のマイクロ RNA が残り、それぞれがコードされている CpG アイランド上に COBRA 用のプライマーセットを作成した。肺癌 24 細胞株と正常肺組織のゲノム DNA を用いて、この8個のマイクロ RNA 領域の COBRA を行った。その結果、mir-152 領域において3細胞株で高い割合のメチル化が認められた。これら3細胞株の脱メチル化処理前後で miR-152 を定量したところ、脱メチル化処理による発現量の増加はいずれもごくわずかであった。また、肺癌の臨床検体8例における mir-152 領域の COBRA と miR-152 の定量を行った。3例で mir-152 領域のメチル化を認めたが、miR-152 の発現量との関連は認めなかった。以上から、肺癌において DNA メチル化による miR-152 の発現抑制の程度は大きくないと考えられ、肺癌におけるマイクロ RNA のエピジェネティックサイレンシングを新たに同定するには至らなかった。

2つめの実験は、臨床肺癌検体におけるマイクロ RNA 領域のメチル化の検討である。す

なわち、マイクロ RNA 領域の DNA メチル化を検出することにより、何らかの臨床・病理的特徴との関連を見いだすことができるかという課題である。今回、上述の *mir-152* のほか、これまで肺癌において DNA メチル化の報告されている *mir-9-3*, *-124-1*, *-124-2*, *-124-3* について、臨床肺癌検体のゲノム DNA を対象として COBRA を行い、DNA メチル化の有無と臨床・病理的特徴との関連を検討した。

東京大学医学部附属病院呼吸器外科で 2005 年 6 月から 2007 年 9 月までの間に切除された原発性非小細胞肺癌症例の解析を行った。組織型は腺癌・扁平上皮癌・腺扁平上皮癌に限定し、T1 および T2 の症例を対象とした。肺癌 96 症例を検討に含めた。観察期間の中央値は 49.5 月であった。観察期間中、30 例に再発を認めた。*mir-124-2* および *mir-124-3* のメチル化は高年齢群 (>65 歳)・喫煙者に多かった。また、*mir-9-3*, *-124-2*, *-124-3* のメチル化を有する症例は、メチル化を有しない症例と比べて有意に T2 の割合が多かった。さらに、*mir-124-2* のメチル化は、EGFR 変異陰性と相関した。*mir-152*, *-124-1* のメチル化の状態は、どの臨床・病理的特徴とも相関を認めなかった。*mir-152*, *-9-3*, *-124-1*, *-124-2*, *-124-3* のうち 2 つ以上の領域でメチル化の検出された症例は、メチル化の検出が 2 つ未満の領域であった症例に対して、T2 であるオッズ比は 4.75 (1.83 - 13.59) であった。言い換えると、調査した 5 つのうち複数のマイクロ RNA 領域でメチル化が認められれば、T2 である可能性が高いと言えた。最後に、無再発生存期間についての生存曲線を作成した。単変量解析の結果、最も強い予後因子は T 因子であった。マイクロ RNA 領域のメチル化の状態を用いた単変量解析では、2 領域以上のメチル化が、有意な予後因子となった。

2 つの実験の結果をまとめると、今回、肺癌におけるマイクロ RNA のエピジェネティックサイレンシングを新たに同定するには至らなかったが、ゲノム DNA におけるマイクロ RNA 領域のメチル化を検出することで、T 因子や予後との関連を見出すことができた。異

常な DNA メチル化があるにもかかわらずマイクロ RNA の発現抑制がさほど認められなかった要因の一つとして考えられるのは、より上流の転写開始点の存在である。 *mir-152* は CpG アイランド上に存在すると同時に親遺伝子 *COPZ2* を持つため、 *COPZ2* とともに転写制御を受けている可能性がある。肺癌における T 因子は、きわめて単純化すれば発癌から発見されるまでの時間を反映したものと解釈できる。今回の研究では、マイクロ RNA 領域の個々のメチル化が劇的な表現型の変化をもたらさなかったからこそ転移や脈管侵襲に関してはほとんど有利にも不利にも働かず、結果として、時間の経過とともに生じたメチル化の蓄積が進んだ T 因子としてのみ相関したとも考えられた。

本研究は、肺癌という疾患に対して、エピジェネティクスとマイクロ RNA の両面からアプローチした研究である。DNA メチル化を検出する手法は、マイクロ RNA の発現量を定量する方法と比べて、低コストであることと、臨床検体採取から検出までの低質化が生じにくい利点がある。肺癌の臨床においては、腫瘍組織の DNA メチル化を調査できるよりも先に、T 因子が判明することが通常である。そのため、今回の結果が直ちに臨床に応用できるとはいいがたい。今後、マイクロ RNA 領域のメチル化が臨床的に有用なバイオマーカーとなりうるかを検討するために、T 因子を一定に揃えた上での予後の比較が必要と考えられた。