

本研究は非小細胞肺癌の 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を明らかにするため、肺癌臨床検体およびヒト肺癌細胞株を用いてマイクロ RNA 領域の DNA メチル化を検出し、マイクロ RNA の発現量や臨床・病理的特徴との関連の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 肺癌において、ゲノム上で異常な DNA メチル化が生じているマイクロ RNA 領域を検索した。その候補として、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 を 8 個選出した。それぞれがコードされている CpG アイランド上に Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)用のプライマーセットを作成し、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。正常肺組織では *mir-152* 領域にメチル化は認められず、*mir-152* 領域のメチル化は肺癌特異的な異常メチル化と考えられた。
2. 同様に、肺癌の臨床検体 8 例における *mir-152* 領域の COBRA を行った。その結果、8 例中 3 例の肺癌検体において *mir-152* 領域のメチル化を認めた。一方、対応するいずれの正常肺組織検体においても *mir-152* 領域のメチル化は認めなかった。肺癌における *mir-152* 領域のメチル化はこれまで報告がなく、新しい知見といえた。
3. *mir-152* 領域の異常なメチル化と、対応する転写産物である miR-152 の発現量との関連を検討した。メチル化の認められた肺癌 3 細胞株を用いて、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。
4. 肺癌臨床 8 例の肺癌組織を用いて 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 *mir-152* 領域が異常メチル化を受けるものの、miR-152 の発現抑制の程度は大きくないと考えられた。
5. 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切除された非小細胞肺癌 96 症例の解析を行った。*mir-124-2* および *mir-124-3* のメチル化は高年齢群・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。

6. *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。
7. 上記96症例の生存解析を行った。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。無再発生存期間の単変量解析の結果、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。

以上、本論文は非小細胞肺癌において、臨床検体および細胞株のゲノムDNAを用いたCOBRAから、*mir-152*領域の異常メチル化の存在を示し、臨床検体の生存解析からマイクロRNA領域のメチル化が肺癌の無再発生存期間の予後因子となりうる可能性を示した。本研究はこれまで未知に等しかった、肺癌におけるバイオマーカーとしてのマイクロRNA領域のメチル化の解明に重要な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。