

論文内容の要旨

論文題目 乳癌における新規癌抑制遺伝子に関する研究

菊山 みずほ

【序文】

背景

乳癌の大部分を占める散発性乳癌では、家族性乳癌の原因遺伝子 *BRCA1/BRCA2* の生殖細胞突然変異はきわめて稀であるが、*BRCA1* 遺伝子の DNA メチル化、*p53* 遺伝子の突然変異、*PTEN* 遺伝子の DNA メチル化が約 50%前後にみられる。しかしながら、これまでに同定されている癌抑制遺伝子の数は少なく、まだ同定されていない癌抑制遺伝子が存在すると考えられる。

遺伝子プロモーター領域の CpG 部位が密集した CpG アイランド (CGIs) のメチル化は、下流の遺伝子発現を抑制し、点突然変異や染色体欠失に加えて、癌抑制遺伝子の不活化の機構として重要である。癌抑制遺伝子のメチル化は、癌の診断、予後や治療反応予測などに応用されている。

DNA メチル化異常によってサイレンシングされている癌抑制遺伝子を同定するために、メチル化 DNA 免疫沈降法 (methylated DNA immunoprecipitation: MeDIP) のようにゲノム網羅的にメチル化解析をする方法や、5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) のような脱メチル化剤処理後の発現の変化をマイクロアレイで解析する方法などがある。これらの方法では数百から数千の遺伝子が選別されてくることがあり、癌化の随伴現象としてメチル化されている遺伝子も数多く含まれている。

数多くのメチル化された遺伝子の中から癌抑制遺伝子を同定するために、メチル化される遺伝子には規則があることを利用した。転写の有無に関わらず、正常細胞で RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が CGIs に結合している遺伝子はメチル化抵抗性を示し、一方で、正常細胞で CGIs に Pol II 結合がなく、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) が高レベルに認められる遺伝子は、メチル化感受性を示す。大多数の遺伝子は、このメチル化の規則に従ってメチル化されるが、数%の遺伝子は正常細胞で Pol II が結合しているにもかかわらず、癌細胞でメチル化されており、"outlier 遺伝子"と名付けた。この outlier 遺伝子は正常細胞で発現している、または発現していなくても Pol II が結合しているので発現できる状態になっているため、癌化の原因になりうるものが推測される。そこで、この

outlier 遺伝子を探索することによって、癌抑制遺伝子が同定できると仮定した。

目的

本研究では、outlier 遺伝子を探索するという新規のアプローチを用いて、新規癌抑制遺伝子を同定することを目的とした。そのために、1) 乳癌においてメチル化サイレンシングされている癌抑制遺伝子は outlier 遺伝子かどうかを明らかにするために、正常ヒト乳腺上皮細胞 (normal human mammary epithelial cell: HMEC) における Pol II 結合と H3K27me3 レベルを解析する。2) HMEC と乳癌細胞株におけるメチル化レベル、HMEC における Pol II 結合及び H3K27me3 レベルをゲノム網羅的に解析し、outlier 遺伝子を同定する。3) 新規癌抑制遺伝子の候補の機能解析を行う。

【方法】

癌抑制遺伝子の HMEC における Pol II 結合と H3K27me3 レベルは、クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) とポリメラーゼ連鎖反応法 (polymerase chain reaction: PCR) (ChIP-PCR 法) で定量的に解析した。

2 つの HMEC と 5 つの乳癌細胞株 (BT-474, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, ZR-75-1) におけるゲノム網羅的 DNA メチル化解析は、MeDIP 及びヒト CGI オリゴヌクレオチドマイクロアレイ法を用いた。

HMEC における Pol II 結合と H3K27me3 レベルのゲノム網羅的解析は、ChIP 法及びヒト CGI オリゴヌクレオチドマイクロアレイ法を用いた。

乳癌細胞株及び乳癌検体におけるメチル化は、メチル化特異的 PCR (methylation-specific PCR) 法で定量的に解析した。

発現解析は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (reverse transcription PCR) を用いた。

候補癌抑制遺伝子の機能解析は、short hairpin RNA (shRNA) を用いてノックダウンし、細胞増殖アッセイを行った。

【結果】

正常細胞における癌抑制遺伝子の Pol II 結合と H3K27me3 レベル

乳癌において DNA メチル化によって不活化される既知の癌抑制遺伝子 *BRCA1*、*CDKN2A*、*HOXA5*、*MSPIN*、*RASSF1A*、*RBPI* の正常細胞 (HMEC) における Pol II 結合と H3K27me3 レベルを解析した。*HOXA5* と *MSPIN* は高い Pol II 結合レベルと低い H3K27me3 レベルを

示した。*BRCA1* も、Pol II 結合が高く、H3K27me3 レベルが低い傾向にあった。これらの結果から、一部の癌抑制遺伝子は outlier 遺伝子であることが示された。

乳癌における outlier 遺伝子の網羅的探索

2 つの HMEC 及び 5 つの乳癌細胞株のゲノム網羅的メチル化解析から、HMEC ではメチル化されておらず、2 つ以上の乳癌細胞株でメチル化されている 280 個の遺伝子を同定した。次に、この 280 遺伝子の HMEC における Pol II 結合及び H3K27me3 レベルをゲノム網羅的に解析し、Pol II 結合レベルが高く、H3K27me3 が低いレベルを示す 14 個の outlier 遺伝子を同定した。

乳癌細胞株及び乳癌検体における outlier 遺伝子の定量的メチル化解析

14 個の outlier 遺伝子のうち、ヒストンをコードする遺伝子を除く 13 遺伝子について、HMEC と 13 個の乳癌細胞株における定量的メチル化レベルを解析した。5 遺伝子 (*DZIP1*、*FBN2*、*HOXA5*、*HOXC9*、*OSBPL3*) が乳癌細胞株でメチル化を認めた。

乳癌細胞株でメチル化を認めた 5 遺伝子について、40 例の乳癌検体における定量的メチル化レベルを解析した。5 遺伝子のうち、*DZIP1*、*FBN2*、*HOXA5*、*HOXC9* は、乳癌検体でもメチル化を認めた。

Outlier 遺伝子の DNA メチル化異常と発現の関連

乳癌検体でもメチル化を認めた 4 遺伝子 (*DZIP1*、*FBN2*、*HOXA5*、*HOXC9*) のうち、*HOXA5* は乳癌においてメチル化サイレンシングされている癌抑制遺伝子として報告されていた。*FBN2* は腎細胞癌で癌抑制遺伝子と報告されていた。そこで、*DZIP1* と *HOXC9* を新規癌抑制遺伝子の候補として、HMEC と 13 個の乳癌細胞株におけるメチル化異常と発現の関連を解析した。*HOXC9* はメチル化されている細胞株では発現は抑制されていたが、メチル化されていない細胞株での発現は認めなかった。一方で、*DZIP1* はメチル化されている細胞株では発現が抑制されており、メチル化されていない細胞株では発現を認めた。そこで、メチル化と発現に負の相関がみられた *DZIP1* について、機能解析をすることとした。

DZIP1 による乳癌細胞増殖抑制

shRNA によってノックダウンした *DZIP1* が発現している HCC1937 細胞と MDA-MB-436 細胞は、コントロールに対する shRNA が発現している細胞に比べて、増殖が促進していた。

DZIP1 のメチル化と臨床病理学的所見との相関

計 74 例の乳癌検体における *DZIP1* の定量的メチル化解析から、10 例がメチル化ありと判定された。リンパ管侵襲陽性例にメチル化ありの症例が有意に多く見られたが、リンパ管侵襲陽性症例自体が少ないため、統計処理に適していない可能性がある。統計学的有意差は認めなかったが、エストロゲンレセプター陽性例には、メチル化ありの症例が少ない傾向にあった。無再発生存率、全生存率との相関は認められなかった。

【考察】

DZIP1 (DAZ-interacting protein) はヘッジホッグシグナル経路に関わることが報告されており、ヘッジホッグシグナル経路は乳癌を含む様々な癌で活性化されているが、癌における *DZIP1* の役割は不明である。また、細胞増殖アッセイの他に、*in vivo* 実験や過剰発現などにより機能解析、突然変異やヘテロ接合性の消失の証明、家族性腫瘍の同定など、さらなる研究が必要である。しかし、*DZIP1* をノックダウンすると細胞増殖が促進されることから、新規癌抑制遺伝子の可能性があることが示された。

【結語】

1) DNA メチル化異常によって不活化されている癌抑制遺伝子の中には、*BRCA1*、*HOXA5*、*MSPIN* のように正常細胞で高い Pol II 結合と低い H3K27me3 レベルを示す outlier 遺伝子が存在した。2) メチル化の規則に従わない outlier 遺伝子をゲノム網羅的に探索することにより、既知の癌抑制遺伝子が含まれていた。このことから、このアプローチによって癌抑制遺伝子が同定できることが示された。3) *DZIP1* は乳癌における新規癌抑制遺伝子の可能性があることが示された。