

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

非がん食道粘膜における DNA メチル化異常  
～とくに喫煙および飲酒との関係について～

氏名            岡   大嗣

【背景】 食道扁平上皮癌（esophageal squamous cell carcinoma ; ESCC）は多中心性発生を来しやすいことから、遺伝子上の変異あるいはエピジェネティックな変化が蓄積した背景粘膜を母地として発生していると考えられている。本研究では、喫煙と飲酒が、背景食道粘膜における DNA メチル化異常の蓄積にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

【方法】 3種類のヒト ESCC 細胞株（KYSE30、KYSE220、KYSE270）を脱メチル化剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理後、RNA を抽出、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを行うことにより、ESCC 細胞株において、プロモーター領域 CpG アイランドのメチル化によって不活化されている遺伝子を網羅的に探索した。

国立がんセンター中央病院で施行された食道切除術の手術標本から、60例の

ESCC 検体およびその背景食道粘膜を採取するとともに、それぞれの症例について喫煙歴および飲酒歴を聴取した。これらの検体より抽出したゲノム DNA を材料に定量的メチル化特異的ポリメラーゼ連鎖反応 (MSP) を行い、それぞれについて全分子数に対する各マーカー遺伝子のメチル化分子数の割合 (メチル化レベル) を計測した。

【結果】 47 個の遺伝子が、3 種の ESCC 細胞株のうち少なくとも 1 種においてメチル化により不活化されていた。これらの遺伝子について、6 例の ESCC 検体およびその背景粘膜におけるメチル化状態を MSP で解析したところ、24 遺伝子が ESCC 特異的にメチル化されていた。うち定量的 MSP に使用可能なプライマーを設計できた 14 個の遺伝子 (*CLDN6*、*GPR158*、*HOXA9*、*MT1M*、*NEFH*、*PKP1*、*PPP1R14A*、*PYCARD*、*RSPO4*、*TSPYL5*、*UCHL1*、*ZFP42*、*ZIK1*、*ZSCAN18*) をマーカー遺伝子として使用した。

喫煙期間については、5 個の遺伝子 (*HOXA9*、*MT1M*、*NEFH*、*RSPO4*、*UCHL1*) の背景粘膜におけるメチル化レベルとの間に有意な相関関係 (それぞれ  $\rho = 0.268$ ;  $P = 0.044$ 、 $\rho = 0.405$ ;  $P = 0.002$ 、 $\rho = 0.285$ ;  $P = 0.032$ 、 $\rho = 0.300$ ;  $P = 0.024$ 、 $\rho = 0.437$ ;  $P = 0.001$ ) が認められた。対照的に、飲酒の有無による背景粘膜のメチル化レベルを比較すると、*GPR158* ( $P = 0.035$ )、*NEFH* ( $P = 0.047$ )、*PPP1R14A* ( $P = 0.011$ )、*ZSCAN18* ( $P = 0.004$ ) の 4 遺伝子において、飲酒有群でメチル化レベルの有意な低値がみられた。アルコール摂取量についても、*PYCARD* のメチル化レベルとの

間に、不活性型 aldehyde dehydrogenase 2 遺伝子 (*ALDH2*) をもつ患者群において負の相関関係 ( $\rho = -0.334$ ;  $P = 0.025$ ) が認められた。

ESCC 検体においては、マーカー遺伝子のメチル化レベルが 6%以上のものをメチル化陽性とした。ESCC においてメチル化されている遺伝子の数とその背景粘膜におけるメチル化レベルとの関係を解析したが、有意な相関関係は認められなかった。

**【結論】** 本研究結果により、喫煙への曝露によって食道粘膜にエピジェネティックな発がんの場が形成され、この微小環境から ESCC が発生することが示唆された。また、飲酒、喫煙は異なるエピジェネティックな作用をもつと考えられた。エピジェネティックな発がんの場は、今後 ESCC のリスク診断や予防の重要な手がかりとなることが予想される。