

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 甲状腺乳頭癌における異常高メチル化遺伝子の同定

氏名 菊池 弥寿子

緒言

日本では甲状腺癌の 8 割を乳頭癌が占めるが、その予後は一般的に良好であり、10 年生存率は 9 割を超える。しかし、遠隔転移や繰り返す局所再発で病死する例も存在する。近年、甲状腺乳頭癌の予後に関して、癌死する危険性の少ない低危険度群と、高危険度群が存在すると考えられるようになった。乳頭癌において、生物学的性質の異なる癌種が存在し、これを区別できるならば、診断、及び予後マーカーとして用いることができ、治療方針を再発危険度で選択できる可能性がある。DNA メチル化は多くの癌において癌抑制遺伝子のプロモーター領域でメチル化され、発癌の制御に関わっていると知られている。本研究では分子生物学的に、DNA メチル化の解析を用いて、乳頭癌の性格とそのサブタイプ分類の可能性について検討した。メチル化解析にはマイクロタイリングアレイを用い、ゲノムワイドな解析と、定量性を備えた解析と併せて解析することが有用と考えられた。

材料・方法

2003 年 12 月から 2011 年 12 月まで、東大病院乳腺内分泌外科において外科的に切除された甲状腺腫瘍組織および非癌部甲状腺組織をマイナス 80 度で凍結保存した検体を用いた。採取された検体のうち、本研究においては、甲状腺乳頭癌 34 サンプル、非癌部甲状腺組織は 20 サンプルを用いた。まず遺伝子変異解析に乳頭癌 34 サンプルを用いた。Infinium による DNA メチル化解析時には、*BRAF*、*RAS* 変異の有無で乳頭癌 14 サンプル、非癌部甲状腺組織 10 サンプルを使用した。PyroMark Q24 を用いた解析時には、Infinium で用いたサンプル

ルに加え、validation set として乳頭癌 20 サンプル、非癌部甲状腺組織 10 サンプルを加えた。サンプルより DNA を抽出し、一部を MassARRAY、サンガーシーケンス法での遺伝子変異解析に、一部はバイサルファイト処理後に、Infinium ビーズアレイを用いた網羅的なメチル化解析、MassARRAY、PyroMark Q24 を用いた定量的なメチル化解析に使用した。まず、既報のメチル化報告についても再検討する必要があると考えられ、Infinium、MassARRAY で検証し、新規メチル化遺伝子の探索に、Infinium を用いた。抽出した遺伝子のメチル化を PyroMark Q24 にて定量的に解析した。

結果

既報の遺伝子変異を MassARRAY、および 3130XI Genetic Analyzer にて解析した。乳頭癌 34 サンプル中、*BRAF*^{T1799A} 遺伝子変異は 23 例 (23/34、67.4%) に、*RAS* 変異は *HRAS*^{A182G} が 1 例 (1/34、2.9%)、*NRAS*^{A182G} が 1 例 (1/34、2.9%) 見られた。*RAS* 変異の見られた症例が *BRAF* 変異を持つことはなかった。一方メチル化に関しては MSP による結果として *RASSF1*、*MLH1*、*p16*、*TSHR*、*TGF β* 、*RASSF5* などは報告があるが、定量的な解析ではなく、他癌種ほど網羅的解析はなされていない。そこで他癌で知られている DNA メチル化遺伝子である、*LOX*、*ELMO*、さらに乳頭癌で MSP での報告が見られた *RASSF1*、両方で報告の見られた *MLH1* について、MassARRAY を用いて定量的にメチル化解析を行った。*LOX*、*ELMO* は乳頭癌ではほとんどメチル化はみられなかった。*MLH1*、*RASSF1* を MassARRAY で定量的に解析したところ、既報ほどのメチル化がなく、*RASSF1* は癌でメチル化は入るが、正常甲状腺組織においてもメチル化がみられ、癌特異的とは言えなかった。この結果より、網羅的な新規 DNA メチル化の探索が必要と考えられた。そこで Infinium を用いた乳頭癌メチル化遺伝子の探索を行った。乳頭癌 14 サンプルを使い、Infinium でも、既報の遺伝子を調べると、MassARRAY 同様に既報ほどのメチル化は見られなかった。胃癌、大腸癌で広く知られている 33 遺伝子についても同様に Infinium で解析し、乳頭癌でもメチル化がみられるか検索したが、メチル化がみられなかった。次に他癌種と異なる乳頭癌特異的 DNA メチル化がみられるか、NCBI のデータを用いて比較した。10061 遺伝子を用いて、標準偏差 0.15 以上で 2745 遺伝子を抽出したところ、各癌種で異なるメチル化を示し、おのおのクラスタリングされた。乳頭癌もまとめてクラスタリングされ、他癌とは異なる DNA メチル化状態を示した。しかし、各癌の背景となる臓器特異的なメチル化の情報の影響を伴っている可能性がある。今度は正常組織でメチル化が入らず、癌腫ではメチル化が入るという条件で再度クラスタリングした。乳頭癌は他癌と比較し、メチル化の頻度は少ないが、正常組織とは異なり、まとめてクラスタリングされた。更に、乳頭癌自体で、比較的メチル化の入る症例群と、あまりメチル化の入らない症例群の存在が示唆された。次に、乳頭癌では高メチル化がみられ、非癌部の甲状腺組織ではメチル化の見られない条件を設定し、乳頭癌特異的な高メチル化遺伝子を抽出した。14 例の甲状腺乳頭癌中、少なくとも 3 例以上の乳頭癌において β 値 0.25 以上であり、10 例の非癌部組織の β 値が 0.2 未満という条件で 25 遺伝子を抽出した。症例で検討すると、正常と同様にメチル化をほとんど呈さない 3 症例の

存在を認めた。この3症例はメチル化異常(-)の症例と示し、それ以外はメチル化異常(+)
の症例とした。再発を認めた2症例はどちらもメチル化異常(-)であった。サイログロブリン
高値、*BRAF*、*RAS* 変異についても有意差を持ってメチル化異常(+)
の症例に多く認めた。*Infinium* で抽出したメチル化候補遺伝子の validation は *PyroMark Q24* で定量的に解析し、臨床学的所見についても再検討した。抽出した25遺伝子からパイロシークエンシング法にて解析できた *HIST1H3J*、*TLX3*、*HOXA7*、*PHKG2*、*POU4F2*、*SHOX2* の6遺伝子について、*Infinium* 解析で用いた症例を使い、*Infinium* データが再現できることを確認した。次に validation set として20症例の乳頭癌を加えた合計34症例の癌と、非癌部甲状腺組織も癌同様に *Infinium* 解析症例に追加の症例を加え、合計20例を用いて、上記6遺伝子のパイロシークエンシングを行った。*Infinium* 結果同様、非癌部の甲状腺組織と比較し、癌において有意差を持ってメチル化が高かった。また、乳頭癌34症例でのパイロシークエンシング解析においても、複数の遺伝子でメチル化の見られる症例と、あまりメチル化の見られない症例が存在した。改めて34症例におけるメチル化と臨床学的所見との相関について検討した。34症例のうち、メチル化率30%以上の遺伝子を1つも認めない症例をメチル化異常(-)症例とした。*Infinium* 解析では、メチル化異常(+)
症例に *BRAF*、*RAS* 変異を多く認めたが、34症例の合計によるパイロシークエンシングの検討でも、有意差を持ってメチル化異常(+)
の症例に変異を多く認めた。また、メチル化異常(+)
の症例は、サイログロブリン高値、腫瘍径が大きい傾向が示唆されたが、有意差は出せなかった。一方で、*Infinium* 解析ではメチル化異常(-)
の症例に術後再発が有意差を持って認められたが、34症例の解析ではメチル化異常(+)
の症例にも術後再発、転移を認め、合有意差は見られなかった。再発症例数が少ないため、メチル化情報と術後再発の可能性を相関させることは现阶段では困難であり、今後さらに多くの症例を用いて検討する必要がある。6遺伝子については、細胞株にDNA脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を投与し、RT-PCRにて、発現が回復しているか検討した。うち、細胞株でもパイロシークエンシングにてメチル化がみられた5遺伝子は、発現回復を認めた。

考察

乳頭癌は、他の癌種と異なるメチル化状態を持つことが示された。既報で乳頭癌特異的メチル化の報告があった遺伝子は、*Infinium*、*MassARRAY* など複数の網羅的定量的メチル化解析ではメチル化値は低く、また高メチル化であっても、非癌部と区別ができず、癌特異的なメチル化マーカーとは言い難かった。新たに高メチル化遺伝子を選びだす手法として *Infinium* は遺伝子のプロモーター領域を網羅することが可能であり、得られたデータは *PyroMark Q24* による定量的メチル化率の測定によって検証することができた。今回選出した異常メチル化遺伝子は、他癌でよく知られた癌抑制遺伝子や、癌関連遺伝子でのプロモーターメチル化遺伝子ではなかった。しかし、複数のサンプルで高メチル化を示している遺伝子では、遺伝子にメチル化が起きることで癌細胞の増殖、進展に働いていたり、なんらかの理由で、癌細胞での遺伝子プロモーター領域のメチル化感受性が上昇していたりし

ていたとも考えられる。さらに転写に関与する因子が多く見られていた。癌において、これら転写因子の変化により発現の変化、細胞周期の変化、シグナル伝達の抑制、結合領域の変化などが生じ、結果的に癌遺伝子や癌抑制遺伝子などを制御している可能性が考えられる。また、他癌種において異常高メチル化の報告のみられた遺伝子もあり、乳頭癌においてもメチル化と発癌が関与している可能性が示唆された。今後、さらに多くの症例での結果を重ね、より高特異度、高感度の遺伝子を選出し、癌特異的メチル化遺伝子の機能的意義を探求することで、臨床への応用が期待される。