

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 中村和徳



論 文 題 目

**Comprehensive Real time PCR system for glycogenes (CRPS-G) identified aberrant methylation of GCNT2 tightly related to lymph node metastasis of primary CRC**

(包括的糖鎖遺伝子定量 PCR システムを用いて同定した大腸癌におけるリンパ節転移関連遺伝子 GCNT2 とメチル化異常)

指 導 教 授 承 認 印

渡辺昌彦



Comprehensive Real time PCR system for glycogenes (CRPS-G) identified aberrant methylation of GCNT2 tightly related to lymph node metastasis of primary CRC  
(包括的糖鎖遺伝子定量PCRシステムを用いて同定した大腸癌におけるリンパ節転移関連遺伝子 GCNT2 とメチル化異常)

中村 和徳

背景

糖タンパクの機能の詳細はいまだ明らかになっていない。しかしながら、最近の研究で二つの重要な役割が明らかになった。一つは細胞の識別であり、もう一つはシグナル伝達である。これらの役割は細胞間での情報伝達に関連するものといえる。糖タンパクは発生、分化、免疫といった生物にとって根本的に重要な機能だけでなく、癌の転移においても重要な働きを有していることが知られている。癌細胞は増殖・転移の課程で、様々な宿主細胞と交流して腫瘍を形成することがわかっており、癌化によって変化した糖タンパクが識別・情報伝達を担っていると考えられる。

糖タンパクの中には癌細胞での特徴的かつ重要な役割を担っているものが報告されている。癌細胞の表面に現れるシアリルルイス X は、DTDST (お硫酸基トランスフェラーゼ) の癌細胞における発現低下により出現するが、その発現低下はエピジェネティックな遺伝子発現制御によって引き起こされており、正常細胞の糖タンパクが有する複雑性の喪失に伴って単純化糖鎖であるシアリルルイス X が出現するのである。

エピジェネティックな修飾のなかで、遺伝子プロモーターの CpG アイランドのメチル化と遺伝子発現低下の間に強い関係が認められるということは非常に驚くべき科学的事実であった。実際に多くの糖鎖遺伝子がエピジェネティクスの修飾により調整を受け、癌遺伝子や転移のメカニズムに関係していると推測されるが、癌における糖鎖遺伝子の発現として包括的発現研究、またその機序としてのエピジェネティクス研究はこれまでにほとんどなされていない。

実験方法

- (1) Comprehensive Real time PCR system for glycogenes (CRPS-G) (186 遺伝子搭載) は現段階で知りうる糖鎖関連遺伝子を標的に Real time PCR primer, probe がデザインされ包括的定量的に糖鎖遺伝子発現を比較できる分子発現解析ツールであり、New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) Medical Glycomics (MG) project により産総研で開発された包括的発現アレイである。この分子解析ツールを用いて、大腸癌において際立った特徴を有する糖鎖遺伝子を同定した。
- (2) 大腸癌株化細胞 4 個 (DLD1, HCT116, Caco2, LoVo)、および大腸癌組織 30 例に対して GCNT2 の発現を定量的 定量 PCR で評価した。
- (3) 大腸癌株化細胞において脱メチル化剤、アセチル化剤による GCNT2 再発現の有無を確認した。
- (4) 大腸癌株化細胞において GCNT2 各バリエーション (1, 2, 3) のプロモーター領域の CpG アイランドに対してバイサルファイト処理を行い、TA cloned sequence を行った。
- (5) 大腸癌組織および、対照正常粘膜組織 59 症例に対して、GCNT2 バリエーション 2 の定量的メチル化特異的 PCR (Q-MSP) を行い、臨床病理学的意義の解析を行った。

## 結果

- (1) CRPS-G は包括的糖鎖発現プロファイル技術であり 186 個の糖鎖遺伝子の発現を同時に定量的 PCR で正確に比較できる。CRPS-G を用い、10 症例の大腸癌組織および対照正常粘膜組織において異なった発現を呈する糖鎖遺伝子を同定した。その中で GCNT2、B3GALT1、B3GALT4、GALNT6、4 つの遺伝子が大腸癌および対照正常粘膜で異なる発現パターンを示す遺伝子として同定された。その中で、GCNT2 は mRNA レベルで顕著に発現が抑制された遺伝子であった。
- (2) 大腸癌株化細胞 (HCT116, DLD1, Caco2, LoVo) および、大腸癌組織 30 例で発現を確認した。大腸癌株化細胞では DLD1 がどのバリエントも発現していなかったのに対し LoVo はすべてのバリエントでの発現を認めた。大腸癌患者において、ほぼ半数の対照非癌粘膜組織で GCNT2 の発現の低下を認めたが、それらの症例では大腸癌組織でも発現が低下していた。一方、残りの半分の症例で、対照非癌粘膜組織での GCNT2 の強い発現を認め、それらはすべての GCNT2 の 3 つのバリエントの発現は正常に比べ大腸癌組織で低下していた。異なったプロモーター領域を持った、3 つのバリエントの発現の関連を見ると、大腸癌組織・対照非癌粘膜組織において、それぞれの発現は強く相関していた (相関係数 0.99-0.995  $P < 0.0001$ )。GCNT2 遺伝子の導入により、GCNT2 のバリエント 2 が他の 2 つのバリエントを誘導することが明らかになった。
- (3) GCNT2 の発現が低下している大腸癌株化細胞 (DLD1, HCT116, LoVo) においては脱メチル化剤 (5 Aza-dC, trichostatinA) によって、再発現が認められた。
- (4) GCNT2 のそれぞれのバリエントに対して、それぞれ TA cloned sequence を行い、バリエント 2 のプロモーター領域のメチル化はその発現と関連していた。つまり、メチル化されている細胞株では発現が抑制され (DLD1, HCT116, LoVo)、逆にメチル化されていない細胞株では発現を認めた (Caco2)。以上から GCNT2 バリエント 2 大腸癌株化細胞および大腸癌組織の発現の低下を規定している可能性があることが推測された。バリエント 1, 3 についてプロモーターメチル化と発現に相関を認めなかった。
- (5) GCNT2 遺伝子バリエント 2 のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化を Q-MSP を用い解析した。メチル化レベルは大腸癌組織および非癌粘膜組織の発現プロファイルと一致した。このことから、GCNT2 の発現はメチル化で制御されている可能性が高いことが示唆された。大腸癌組織メチル化定量値と臨床病理学的比較を行った。大腸癌組織メチル化が T 因子、N 因子、Stage (第 6 版 UICC) と有意な相関があることが判明した。なかでも、N 因子の相関が最も強かった。メチル化レベルでリンパ節転移を予測する能力を ROC curve を作成して AUC を算出したところ 0.84 となり、リンパ節転移予測因子としての可能性が極めて高いことが示唆された。このとき算定された最適カットオフ値を用いて大腸癌リンパ節転移との相関を  $\chi^2$  乗検定で解析したところ、メチル化低値とリンパ節転移のあいだに強い相関が認められた ( $P < 0.00000001$ 、正診率 86.4%)。
- (6) GCNT2 バリエント 2 のメチル化レベルは大腸癌組織と非癌粘膜組織で相関しており、大部分の大腸癌患者において正常粘膜のメチル化レベルは大腸癌組織粘膜のメチル化レベルを反映していた ( $R = 0.75$ ,  $p < 0.0001$ )。したがって、正常組織における GCNT2 バリエント 2 メチル化レベルを用いてもリンパ節転移を反映していることが明らかになった。



## 議論

本研究において、GCNT2 は癌組織での発現低下をしているものとして同定されたため、その発現低下機序として DNA メチル化を想定し実際にメチル化レベルとその発現が相関することを示すことができた。このような遺伝子では通常、メチル化は癌特異性を示し癌抑制遺伝子的な役割を果たしていることが予想された。しかし、予想に反してメチル化レベルは大腸癌組織および対照非癌組織で相関しており、個々の症例では一部食い違うこともあるが全体としては正常粘膜のメチル化レベルが、大腸癌組織のメチル化レベルを反映しており、癌組織の DNA 低メチル化がリンパ節転移や悪性予後と関連した。臨床データから考えると本遺伝子は癌抑制遺伝子というより癌原遺伝子の特徴を示していると考えられる。

実際、GCNT2 の機能に関しては、人間・マウスの高転移乳癌細胞株、基底細胞様 (triple negative) 乳腺腫瘍で過剰発現していることが報告されている。さらに細胞浸潤や転移、生体内での乳癌の肺転移モデルにおける機能解析により、GCNT2 の発現が細胞の分離、内皮細胞への接着を亢進することが証明されている。この実験の結果は、GCNT2 は乳癌において癌進展促進的役割を有することを示唆している。少なくとも今回のわれわれの研究では、GCNT2 は癌組織で非癌組織に比較して発現が低下しており、このことは乳癌での報告から考えられる分子イメージがとは異なる。

これまでに糖鎖遺伝子に対して、大腸癌における DNA プロモーターのメチル化によって調整されているという報告はほとんどない。我々の研究では、メチル化の強い大腸癌株化細胞 (DLD1, HCT116, Caco2) において、脱メチル化剤、アセチル化剤によって、GCNT2 バリエント 2 の再発現が起こることを示し、GCNT2 が大腸癌および正常大腸癌組織においてエピジェネティックな修飾により調整されていると考えた。GCNT2 バリエント 2 のメチル化が発現に重要な役割を呈していると言う仮説を補足するために、大腸癌および対照正常粘膜組織における GCNT2 variant 2 のメチル化の程度を調べた。興味深いことに、およそ半数の大腸癌組織および対照正常粘膜組織においてメチル化が確認でき、そのことがおよそ半分の大腸癌組織および対照正常粘膜組織において GCNT2 の発現が低下している事実を裏付けていると考えられた。その一方で、対照正常粘膜組織においてメチル化の低い大腸癌組織においては、メチル化の割合が高い傾向にあることが明らかになった。これらの結果より、GCNT2 バリエント 2 のプロモーター領域の低メチル化が原発大腸癌においても発現低下に重要であると考えた。さらに興味深いことには、GCNT2 遺伝子を導入した HCT116、DLD1 2 つの大腸癌細胞株において、GCNT2 バリエント 1 と 3 の発現が亢進しており、バリエント 2 遺伝子によって他の GCNT2 バリエントが誘導されたことが示され、バリエント 2 の発現が GCNT2 発現亢進において中心的な役割を呈していることが示唆された。

癌組織におけるメチル化レベルと臨床病理学的因子との相関を解析することにより、遺伝子の役割を予想することができる。GCNT2 はメチル化レベルが低い症例で大腸癌のより進行した状態 (深い深達度、リンパ節転移、進行した臨床病期) と相関していることが明らかになった。このことを反映して GCNT2 メチル化が低い症例は予後不良であった。中でもリンパ節転移との相関を極めて強く、本遺伝子のメチル化レベルを測定することにより大腸癌のリンパ節転移を予想できる可能性が示唆された。リンパ節転移の術前診断は進行大腸癌においてきわめて重要であり、リンパ節転移を有する大腸癌は予後不良であることから、今後術前化学療法などの治療介入を可能にすると考えられる。実際に術前に遠隔転移を起こしていない stage II/III 大腸癌においても GCNT2 のメチル化レベルは予後と相関し、このことは術前に予後を含めたリンパ節転移が予測可

能であることを示唆している。GCNT2 の低メチル化によるリンパ節転移診断の精度は 86.4%にのぼり、CT や MRI と行った画像診断システムより高く、リンパ節転移診断の優れた手段となりうるため、今後前向き検討を行う予定である。

今回の解析で、腫瘍組織の GCNT2 メチル化のレベルは対照非癌粘膜組織の GCNT2 メチル化レベルと相関しており、対照非癌組織の GCNT2 メチル化のレベルで多くの腫瘍の GCNT2 メチル化レベルを反映していることが考えられた。したがって、対照非癌粘膜組織の GCNT2 メチル化レベルを用いてのリンパ節転移の予測も腫瘍のメチル化レベルを用いた場合と同様に有用であった。この事実は、リンパ節転移が原発巣の周辺非癌組織によって影響を受けていることを表している。対照非癌組織における GCNT2 メチル化レベルを用いた Log rank plot 解析の結果も GCNT2 の低メチル化が大腸癌の予後を予見することを示唆している。

GCNT2 の低メチル化が悪性度の高い大腸癌組織に認められるという臨床的事実は GCNT2 遺伝子が乳癌での研究同様、大腸癌においても癌原遺伝子的な働きをしていることを示唆している。興味深いこと、GCNT2 が発現していた大腸癌株化細胞 LoVo は鎖骨下リンパ節転移から分離された組織に由来し、高度に侵襲的な性質を有している細胞であった。

今回の報告は GCNT2 がエピジェネティックな遺伝子の修飾によりコントロールされているという大腸癌における初めての報告であるとともに、正常組織のメチル化の状態が、リンパ節転移の有無を予見する可能性を示した初めての報告である。このような高いリンパ節診断能は癌研究における臨床応用において注目に値すると考えられる。