

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 小 寫 慶 太



論 文 題 目

「大腸癌 adenoma-carcinoma sequence における  
cysteine dioxygenase type1 遺伝子プロモーター領域の  
メチル化の関与」

指 導 教 授 承 認 印

瀧 邊 昌 彦



# 大腸癌 adenoma-carcinoma sequence における cysteine dioxygenase type1 遺伝子 プロモーター領域のメチル化の関与

氏名 小嶋慶太

## 【背景】

大腸癌は欧米だけでなく、日本において癌死亡の主要な原因疾患である。大腸癌の発生にはジェネティックな異常と、エピジェネティック異常の蓄積が関与しているとされている。代表的な発癌経路として adenoma-carcinoma sequence 説 (ACS) がある。ACS では多段階発癌モデルとして、低異型性腺腫→高異型性腺腫→粘膜内癌→浸潤癌という進展過程が提唱されており、遺伝子異常のほかにエピジェネティック異常の関与も報告されている。

大腸癌に関連するエピジェネティック異常として、これまで我々は *Cysteine dioxygenase type1 (CDO1)* 遺伝子のメチル化異常を報告している。*CDO1* はヒト癌におけるメチル化特異的遺伝子と同定された遺伝子で、腫瘍抑制遺伝子として機能する。*CDO1* のプロモーター領域のメチル化異常は消化器癌などで広く認められており、癌特異的バイオマーカーとしてもその有用性が期待される。

*CDO1* のメチル化異常は発癌に関与していることは明らかとなっているが、癌化のどの段階で起こっているのかは解明されていない。本研究では *CDO1* のメチル化異常が大腸癌の発癌過程にどのように関与しているのかを明らかにし、その臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。

また、血清中の DNA のメチル化を利用した大腸癌診断技術で現在臨床応用されている *SEPT9* 遺伝子と *CDO1* を比較し、*CDO1* の臨床診断応用の可能性についても検討を行う。

## 【対象と方法】

2000 年 1 月 1 日から 2000 年 12 月 31 日までに北里大学病院で、大腸癌の診断で手術治療を受けた 107 例の癌組織および非癌粘膜を対象とした。発癌経路の機構を理解するために、2000 年に内視鏡的切除を受けた 90 例の腺腫も対象とした。腺腫は細胞異形と構造異形によって従来の分類の軽度 (mild atypia), 中等度 (moderate atypia), 高度異型 (severe atypia) に分類した。さらに現行の分類である軽異型度腺腫 (low grade adenoma) と、高異型度腺腫 (high grade adenoma) に分類し評価した。Mild atypia が 30 例, moderate atypia が 30 例, severe atypia が 30 例だった。同様に, low grade adenoma が 60 例, high grade adenoma が 30 例だった。すべての検体はホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織 (FFPE 検体) を使用した。

臨床病理学的因子の解析には年齢, 性別, 組織型 (分化型, 未分化型), 腫瘍の占拠部位,

腫瘍径，肝転移の有無，Dukes 分類，また、第 7 版 the American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer staging system に基づいた深達度，リンパ節転移，遠隔転移，病期，リンパ管侵襲，静脈侵襲，さらに第 8 版大腸がん取り扱い規約に基づいた浸潤増殖様式を用いた。

メチル化の解析には FFPE 検体から DNA を抽出し，バイサルファイト処理した検体を用いて定量的 TaqMan メチル化特異的 PCR (Q-MSP) を行った。メチル化の定量値として，対象遺伝子の初期量平均値を  $\beta$  アクチンで除算し，100 倍した値 (TaqMeth V) を用いた。

*CD01* の機能解析として，足場非依存的増殖能の解析には *CD01* 導入を行った大腸癌細胞株を混ぜたアガロースを作成し，anchorage-independent colony formation assay を行った。培養から 2 週間後に細胞数 100 個以上のものを 1 コロニーとし，10 視野におけるコロニー数を計測した。

CD01 蛋白発現の確認には，一次抗体に rabbit CD01 polyclonal antibody (12589-1-AP) (proteintech, Rosemont, IL) を用いて免疫染色を行った。

統計解析には，JMP (version 11, SAS Institute INC., Cary, NC, USA) を用い，統計学的な有意水準は P 値 0. 05 未満とした。

### 【結果】

(1) 大腸癌組織での *CD01* TaqMeth V 中央値は 34. 8 (0-100. 3) であり，非癌粘膜では 4. 3 (0-35. 5) であった。TaqMeth V の比較では，癌組織では有意に非癌粘膜に比べメチル化が高度に認められた ( $p < 0. 0001$ )。この結果から，大腸癌組織と非癌粘膜とを区別する最適なカットオフ値を ROC 曲線を用いて算出すると，*CD01* TaqMethV のカットオフ値は 15. 6 (AUC=0. 96，感度 95%，特異度 90%) であった。

(2) 大腸癌組織での *SEPT9* TaqMeth V 中央値は 3. 17 (0-17. 74) であり，非癌粘膜では 0 (0-4. 25) であった。*SEPT9* でも大腸癌組織では有意に非癌粘膜に比べメチル化が高度に認められた ( $p < 0. 0001$ )。癌組織と非癌粘膜とを区別する最適な *SEPT9* TaqMethV のカットオフ値は 0. 06 (AUC=0. 96，感度 94%，特異度 95%) だった。

(3) 癌組織における *CD01* のメチル化異常の臨床病理学的特徴では，加齢 ( $p = 0. 006$ ;  $R = 0. 26$ )，組織型 ( $p = 0. 03$ )，腫瘍径 ( $p = 0. 04$ ;  $R = 0. 19$ )，肝転移 ( $p = 0. 02$ ) で有意差を認めた。また，*SEPT9* の臨床病理学的特徴は有差を示すものはなかった。

(4) *CD01* の発現のない大腸癌細胞株である HCT116、Colo205 に *CD01* を強制発現させ soft-agar colony formation assay を行った。結果は，moc に比べ有意に *CD01* 導入の細胞でコロニー形成が減少した ( $p = 0. 0007$ )。

(5) *CD01* のメチル化異常と CD01 蛋白の発現を免疫染色で評価した。低メチル化検体 10 例 (平均 TaqMethV = 0) と高メチル化検体 10 例 (TaqMethV = 75. 4) を用い，免疫染色を行った。Score 0 は染色を認めない，Score 1 は散在性の染色または淡い染色に留まる，Score 2 は瀰漫性の濃染を認めると定義し，Score 0~2 の 3 段階に分け評価した。各検体での染色結果は，低メチル化群では全例が Score 2 だった。高メチル化群では Score 0 が 25%，Score 1 が 55%，Score 2 が 25% であり，有意に低メチル化群で CD01 の高発現を認めた ( $p < 0. 0001$ )。

(6) 非癌粘膜、腺腫、癌組織とで *CD01* のメチル化の程度を比較すると、異型度の進行に伴ってメチル化の上昇を認めた ( $p < 0.0001$ ). 非癌粘膜と mild atypia では有意に腺腫でのメチル化が高度であった ( $p < 0.0001$ ). また, high grade adenoma は low grade adenoma に比べ有意に高度にメチル化を認めた ( $p = 0.001$ ). *SEPT9* でも同様に腺腫を含む組織間で TaqMethV の解析を行うと, *CD01* と同様に異型度の進行に伴ってメチル化の上昇を認めていた. *SEPT9* では非癌粘膜と mild atypia では有意差を示さなかったが ( $p = 0.06$ ), high grade adenoma と癌組織では有意差を認めた ( $p < 0.0001$ ).

#### 【考察】

本研究では, 大腸癌組織における *CD01* のメチル化異常と臨床病理学的特徴を明らかにするとともに, *CD01* のメチル化異常と ACS との関連を明らかにした.

癌組織での *CD01* のメチル化異常の臨床病理学的特徴は, 加齢による上昇, 分化型組織での上昇, 腫瘍径の増大に伴う上昇, 肝転移群での上昇だった. この結果から, *CD01* のメチル化異常が悪性形質転換に関与していることが推測された. そこで, anchorage-independent colony formation assay を行い *CD01* の機能解析を行うと, *CD01* の導入により細胞増殖抑制が起きることが確認された.

また, *CD01* のメチル化異常とタンパクの発現に関して免疫染色を行った結果, 高メチル化群での発現抑制の結果が得られており, *CD01* タンパクの発現が *CD01* のメチル化異常により制御されている可能性が示唆された.

次に, 大腸癌発生過程への *CD01* のメチル化異常の関与について解析を行うと, 非癌粘膜から腺腫, 癌への進行に伴ってその値は上昇しており, 最も注目されたのは, 非癌粘膜と mild atypia で有意差を認めたことである. この結果は *CD01* のメチル化異常が腺腫発現に関与していることを推測させる. 更に, low grade adenoma と high grade adenoma で有意差を示していたことから, 腺腫の増大と, 異型度の増加への関与と考えられる. また, 肝転移陽性癌組織では, 陰性癌組織に比べ高メチル化を示しており, *CD01* のメチル化異常が腫瘍細胞の遊走, 浸潤能の獲得に寄与していることが推測された.

以上の結果は, *CD01* のメチル化異常は細胞異型を誘導し, さらにその蓄積増加が癌を発生させるものと推測できる. また, これまで大腸癌発生の主経路として主張されてきた ACS に新たな根拠を加えることが出来たといえる.

DNA メチル化は安定した修飾であり, その安定性から疾患マーカーとして注目されている. *CD01* のメチル化異常が癌組織はもちろん, 腺腫の段階で非癌粘膜と区別可能であったという結果は, 各組織間のメチル化異常の差を利用した大腸癌検出のバイオマーカーとしての有用性が期待できるものといえる. 引き続き, 本研究結果の臨床応用に向けてさらなる検証を進めていく予定である.