

氏名(国籍)	ほう 方	めい 明(中国)
学位の種類	博士(医学)	
学位記番号	博甲第2380号	
学位授与年月日	平成12年3月24日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	医学研究科	
学位論文題目	DNA Methylation and Expression of P16 <sup>INK4A</sup> Gene in Pulmonary Adenocarcinoma and Anthracosis in Background Lung (肺腺癌におけるP16 <sup>INK4A</sup> 遺伝子の発現及びDNAメチル化と背景肺の炭粉沈着量との関係)	
主査	筑波大学教授	医学博士 三輪正直
副査	筑波大学教授	医学博士 赤座英之
副査	筑波大学教授	医学博士 関沢清久
副査	筑波大学助教授	医学博士 大塚盛男

## 論文の内容の要旨

### (目的)

肺癌、特に肺腺癌の発癌と増悪には多くの癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常が関与していることが明らかになってきた。癌抑制遺伝子群の中で、p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) の不活化にはその存在部位である9番染色体短腕の欠失が関与しているものの、点突然変異は殆ど発見されておらず、むしろプロモーター領域のメチル化が重要であると考えられている。

一方、著者は参考文献(Hou et al, 1998)にも示す用に肺腺癌の発癌、増悪とその発生母地である背景肺の炭粉沈着量の関係を解析し、たばこや排気ガス等の発癌因子に曝露されたいる肺(炭粉沈着の多い肺)に発生する肺癌の方がより低分化で予後の悪い肺癌へと増悪する確率が高いことを示した。

p16遺伝子のメチル化はこれら発癌因子によって引き起こされると考えられる。そこで、p16遺伝子のプロモーター領域のメチル化あるいはp16蛋白の発現量と背景肺の炭粉沈着量との関係を解析し、両者の間の関係を検討した。

### (材料と方法)

1988年から1997年にかけて、筑波大学附属病院で原発性肺腺癌で死亡した47人を対象として検討した。

すべての剖検肺の最大断面を切り出し、DNAと炭粉とを分けて抽出し、DNA 5  $\mu$ gを抽出すると同量の肺組織から抽出された炭粉をニトロセルロース膜上にドットプロットし、デンストメーターでその程度を数値化した。

#### (1) p16遺伝子のプロモーター領域のメチル化の解析。

Methylation-Specific PCR (MS-PCR)法を用い、p16遺伝子のプロモーター領域のメチル化を調べた。剖検肺の腫瘍部と非腫瘍部を分けてそれぞれから抽出されたDNA 1  $\mu$ gを亜硫酸ナトリウムで処理し、非メチル化DNAのシトシンをウラシルに変異させた後、特別にデザインした三つのプライマを用い、DNAを増幅した。シトシンを持つメチル化DNAのPCR産物を制限酵素 *Bst*U1 (認識位置, CGCG)を用いて処理し、結果を確認した。

#### (2) p16遺伝子の発現量の解析。

Polyclonal rabbit anti-human p16 antibody (Phar Mingen, Inc., San Diego, CA)を用い、ABC法で、免疫染色を行っ

た。人の肺癌細胞株, A549とLu141をそれぞれ陽性, 陰性コントロールとして用い, 染色性の確認を行ったGeradtsら (Geradts et al., 1996) の基準を用いて評価した。

各グループの間の統計分析には two-tailed Fisher's exact test を用いた。

#### (結果)

47剖検例の肺内蓄積炭粉を定量化し, 三つのグループに分類した。(1) 軽度グループ (A value < 0.3, 20 cases), (2) 中等度グループ ( $0.3 \leq A \text{ value} \leq 0.6$ , 8 cases), (3) 高度グループ (A value > 0.6, 19 cases)。

すべての検体についてMS-PCR法で遺伝子増幅し, 47検体の中, 19検体で解析可能であった。19検体中6検体(32%)にDNAメチル化が検出された。メチル化と腫瘍発見時の臨床病期との間には有意な関係は認められなかった。メチル化グループの平均炭粉沈着量 (A = 0.715) は非メチル化グループのそれ (A = 0.298) より有意に高度であった (P < 0.05)。免疫組織染色を用い, 47例のp16遺伝子の発現を検討した。p16メチル化が確認されたすべての検体は免疫染色陰性でp16の発現は不活化されていた。炭粉沈着量のレベルが軽度から中等度, そして高度に上昇するにつれ, 異常のp16遺伝子発現の症例は11症例 (11/20cases, 55%), 7症例 (7/8 cases, 87.5%), 19症例 (19/19 cases, 100%) であり, 徐々にその頻度が上昇した。一方, 正常のp16遺伝子発現を示したグループの平均炭粉沈着量 (A = 0.151) はp16発現の異常 (不活化あるいは部分的に不活化) を示したグループ (A = 0.531) のそれにより有意に低かった (P < 0.01)。

#### (考察)

DNAメチル化は癌抑制遺伝子の異常 (不活化) に密接に関係, 人の発癌において重要な原因の一つだとされている。

今回の研究で, p16遺伝子のプロモーター領域における19例の原発性肺腺癌中, 6例 (32%) にDNAメチル化が検出された。さらにDNAメチル化を示したグループの平均炭粉沈着量は非DNAメチル化グループのそれにより有意に高いことを明らかにした。p16遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化の発生と背景肺の炭粉沈着量との間には密接な関係があることを示した。つまり背景肺の高度炭粉沈着がp16遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化に必要な条件だと推測した。また, p16遺伝子のメチル化と臨床病期との間には相関関係が認められなかったので, DNAメチル化は発癌早期に起こる異常と考えられた。

免疫組織化学染色法を用い, p16遺伝子発現とp16遺伝子のメチル化との関係を解析すると, メチル化を持つすべての検体でp16遺伝子の発現が不活化しており, p16遺伝子プロモーター領域のメチル化はp16遺伝子の不活化に密接に関係していることがわかった。正常のp16発現を示したグループの平均炭粉沈着量がp16発現異常のグループ (不活化あるいは部分的に不活化) のそれより有意に低く, 背景肺の炭粉沈着量の程度はp16遺伝子の発現の異常とも強く関係していることが示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

肺腺癌における癌抑制遺伝子の異常の一つとしてp16の不活化に関して点突然変異は頻度が低く, 不活性化の機構は別と考えられる。

著者らは, 肺腺癌のp16遺伝子のプロモーター領域のメチル化がその一因であると考え, またそのメチル化と背景肺の炭粉沈着量の関係を解析した。その結果, メチル化グループの平均炭粉沈着量は非メチル化グループのそれより有意に高度であることにより, 背景肺の高度炭粉沈着がp16遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化に関わっている可能性を見だし, このメチル化は, 発癌早期に起こることも示唆している。また, これらの結果を免疫組織化学染色法によっても確認している。

以上の知見は、最近増加している肺腺癌の発癌要因や、その予防に関する価値あるものである。  
よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。