【242】

氏　名（国籍）	舒　宇　剣（中　国）（じょ う けん）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博　甲　第　4074　号
学位授与年月日	平成 18 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	人間総合科学研究科
学位論文題目	**The ACIN1 Gene is Hypermethylated in Early Stage Lung Adenocarcinoma** （早期肺腺癌にて高率にメチル化されている遺伝子 ACIN1 の同定）

主　査	筑波大学教授	医学博士	大　塚　盛　男
副　査	筑波大学講師	博士（理学）	三　輪　佳　宏
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	石　川　成　美
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	小　田　竜　也

論　文　の　内　容　の　要　旨

（目的）

肺腺がんは肺がんの中で最も発生頻度の高い組織亜型であり，発病率は上昇傾向にある。肺腺がんの早期発見，早期治療への糸口となる分子マーカーを発見するために，発がん初期の遺伝子異常として重要な遺伝子のメチル化について検討した。

（対象と方法）

1. がん培養細胞に特異的な異常メチル化遺伝子の探索

肺腺がんの前がん病変である異型線種様過形成から作成された培養細胞（PL16T）と同一患者の正常末梢気管支上皮から作成された培養細胞（PL16B）のそれぞれから DNA を抽出した。この DNA に対して Methylated CpG island amplication（MCA）法，Suppression subtraction hybridazation（SSH）法，differential screening（DS）法を用いて PL16T のみにメチル化がみられる DNA 断片を検出した。この DNA 断片の塩基配列を決定し，遺伝子の同定を行った。

2. ヒト早期肺腺がん症例での ACIN1 遺伝子の異常メチル化状態の検討

1. で得られた PL16T 特異的にメチル化が認められる DNA CpG island の 1 つである ACIN1（Apoptotic chromatin condensation inducer 1）遺伝子について，ヒト肺腺がん症例でのメチル化状態を検討した。直径 2cm 以下の末梢発生肺腺がん手術症例 37 例について，がん組織および非がん部肺組織から別個に DNA を抽出し，各 3 ～ 5 個の DNA 断片について bisulfate sequence 法によりメチル化を解析し，全クローンにメチル化が認められた場合を陽性と判定し，メチル化と臨床病理学的所見との関係について検討した。また，一部の症例では切除肺の凍結組織から RNA を抽出し，real-time RT-PCR 法で ACIN1 遺伝子の発現量を検討した。

（結果）

1. がん培養細胞に特異的な異常メチル化遺伝子の探索

MCA-SSH 法により 2134 クローンが得られ，DS 法により 229 クローンが選別された。この 229 クローンの DNA 断片の塩基配列を解析した結果，15 クローンが CpG island であった。なお，229 クローン中には既知遺伝子のプロモーター領域は認められなかった。この 15 個の CpG island のうち exon17-intron18 領域に PL16T 特異的にメチル化が認められた ACIN1 遺伝子について，PL16B と PL16T での発現量を RT-PCR 法で検討すると，PL16B の発現量が有意に高値であった。

2. ヒト早期肺腺がん症例での ACIN1 遺伝子の異常メチル化状態の検討

肺腺がん 37 例のがん組織の ACIN1 遺伝子のメチル化を検討すると 30 例（81％）が陽性で，同一症例の非がん部肺組織の陽性 9 例（24％）に比べ有意に高値を示した（$p<0.05$）。

肺腺がんを形態学的に分けると，肺胞上皮置換性増殖型 21 例と非置換性増殖型に 21 例であった。両者のがん組織におけるメチル化陽性率はともに 81％であった。一方，非がん部肺組織のメチル化は，置換性増殖型の 2 例（10％）に比べ非置換性増殖型は 7 例（44％）が陽性で，両者に有意差がみられた（$p<0.05$）。なお，性別，年齢，喫煙指数とメチル化状態との間には関連は認められなかった。

ACIN1 遺伝子のメチル化がみられた置換性増殖型及び非置換性増殖型の各 3 例について ACIN1 遺伝子の発現量を検討したが，遺伝子の発現量とメチル化の間には相関はみられなかった。

（考察）

肺腺がんの前がん病変である異型線種様過形成から作成された培養細胞に特異的な遺伝子のメチル化の有無を明らかにするために，DNA のメチル化状態を網羅的に検討し，15 個の遺伝子に特異的なメチル化が認められることが明らかになった。この中の 1 つである ACIN1 遺伝子について，ヒト早期肺腺がん症例の切除組織を用いがん組織と非がん肺組織のメチル化を検討し，がん組織では高率にメチル化が生じていることが明らかになった。この遺伝子はアポトーシスに関係していることが知られているが，肺がんも含めがんにおけるこの遺伝子の検討はこれまでにされていない。

肺腺がんを肺胞上皮置換性増殖型と非置換性増殖型に分け，各がん組織別の ACIN1 遺伝子メチル化の頻度を検討すると，両者ともに高率にメチル化が認められた。同遺伝子のメチル化は組織型に関係なく早期肺腺がんにおいて高頻度に生じていることが明らかになったが，肺腺がんの発生における同遺伝子のメチル化の関与の有無については明らかにできず，さらに検討が必要である。また，今後他の遺伝子についても組織型と遺伝子メチル化との関係について検討を加える必要がある。

置換性増殖型と非置換性増殖型における非がん部肺組織のメチル化の頻度に差がみられた。これまでの報告から肺腺がん患者における非がん部肺組織のメチル化状態は肺のディーゼル排気やタバコ等の発がん物質への暴露の程度を反映していることが考えられる。今回の検討では組織型と喫煙指数との間に関係は認められなかったが，置換性増殖型と非置換性増殖型における非がん部肺組織のメチル化の違いの意義を明らかにするために，症例をさらに増やすとともに環境因子の情報をさらに加えて検討する必要がある。

（結論）

早期肺腺がんにおいては，ACIN1 遺伝子 exon17-intron18 領域でメチル化が組織型に関係なく高率に生じていることが明らかになった。同遺伝子のメチル化と肺腺がん発生との関係についてはさらに検討を要するが，同遺伝子のメチル化が早期肺腺がん患者の検出の指標になる可能性が考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，肺腺がんの前がん病変である異型線種様過形成から作成された培養細胞を用い高度な遺伝子学

的手技を駆使して早期の肺腺がん細胞に特異的な遺伝子メチル化を網羅的に解析し，15 個の遺伝子に特異的なメチル化が認められること，早期肺腺がん症例のがん組織ではこの中の 1 つである ACIN1 遺伝子のメチル化が組織型に関係なく高率に生じていること，置換性増殖型と非置換性増殖型における非がん部肺組織のメチル化の頻度に差がみられることを明らかにし，同遺伝子のメチル化が早期肺腺がん患者の検出の指標になる可能性を示したものである。

同遺伝子のメチル化と肺腺がん発生との関係や組織型と関連するメチル化遺伝子の有無についてはさらに検討が必要であるが，本研究は肺腺がんの発生や進行のメカニズムを明らかにするのに重要と考えられ，今後さらなる研究の発展が期待される。

なお，本研究に関する論文は国際肺癌学会の公式雑誌である Journal of Thoracic Oncology に投稿・受理され，平成 18 年 1 月の掲載が決定されている。

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。