

氏名(国籍)	孫 衛 紅 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第5103号
学位授与年月日	平成21年3月25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	Identification of Differentially Methylated CpG Islands in the Early Stage of Human Pulmonary Adenocarcinoma (早期肺腺がんにおける異常メチル化の解析)
主査	筑波大学教授 医学博士 大塚盛男
副査	筑波大学准教授 薬学博士 伊東進
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 石川成美
副査	筑波大学助教 博士(医学) 村田聡一郎

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が高く発病率は上昇傾向にある。がんの早期発見治療は生命予後に繋がるため、診断の糸口となる分子マーカーの発見は非常に重要である。一方、重要な発がん機序の1つとして、プロモーター部の CpG 領域の異常メチル化によるがん抑制遺伝子の不活性化が知られている。本研究では、早期の肺腺がんにおいて CpG 領域が異常メチル化している遺伝子を同定するとともにその機能を解析し、早期診断のための分子レベルでの検索の可能性について検討した。

(対象と方法)

ヒト肺腺がんにおいて、CpG 領域が異常メチル化している遺伝子を探索するため、まず早期肺腺がんと組織学的類似性のある A/J マウス肺腺腫モデルを用い検討した。腺腫組織から DNA を抽出し、Methylated CpG island amplication (MCA) 法、Suppression subtraction hybridization (SSH) 法、methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) 法により異常メチル化遺伝子の同定を行った。次に、同定された遺伝子に相同するヒト遺伝子について、肺腺がんでの異常メチル化の有無、同遺伝子の発現レベル、臨床病理学的特徴との関係等について検討した。

次に、異常メチル化が同定された遺伝子の機能を検討するため、抗 SAMD14 蛋白抗体を作成して肺がん培養細胞株や肺がん組織における SAMD14 蛋白の発現状態を検討した。また、SAMD14 遺伝子に対する siRNA を肺腺がん培養細胞株 NCI-H23 に導入し、細胞増殖能や細胞遊走能を検討した。

(結果)

A/J マウス肺腺腫では 5 遺伝子に CpG 領域の異常メチル化が認められ、その中でヒトに相同遺伝子が存在する 3 遺伝子について腺腫組織での発現レベルを検討し、2 遺伝子に発現の低下を認めた。

次に、相同するヒト遺伝子について、肺腺がん組織での発現レベルを正常肺と比較し、発現の低下を認めた。この中の1つである SAMD14 (sterile α motif domain 14) について、肺腺がん培養細胞株や正常気管支上皮培養細胞における異常メチル化の有無と遺伝子発現レベルとの関係を検討すると、大部分のがん細胞株

で異常メチル化がみられ、遺伝子発現が低下していた。一方、正常気管支上皮細胞ではメチル化はなく遺伝子発現もみられた。

また、31例の肺腺がん症例について異常メチル化の有無と臨床病理学的特徴との関係を検討すると、8例25.8%の肺腺がん組織にSAMMD14の異常メチル化を認めたと、正常部の肺組織には全例認められなかった。この8例は全て野口 typeC の浸潤型早期肺腺がん、2例は臨床病期Ⅱ期とⅢ期であったが、他の組織学的特徴と異常メチル化の有無との間には有意な関係は認められなかった。

次に、肺がん培養細胞株や肺がん組織におけるSAMMD14蛋白の発現状態について検討すると、多くの肺がん細胞株にSAMMD14蛋白の発現が認められた。また、肺腺がん組織では82%、扁平上皮がん組織では100%が陽性であった。さらに、142例の種々のヒト腫瘍組織について検討すると、93%が陽性であった。一方、SAMMD14遺伝子に対するsiRNAを導入した肺腺がん培養細胞株NCI-H23では、SAMMD14の著明な発現低下がみられた。さらに、NCI-H23の増殖能及び遊走能を検討すると、これらの機能はsiRNAの導入により著明に抑制された。

(考察)

本研究では、ヒト肺腺がんにおけるCpG領域の異常メチル化遺伝子を探索するため、先ず早期肺腺がん組織学的類似性のあるA/Jマウス肺腺種モデルを用い検討から5個の異常メチル化遺伝子が存在することを明らかにし、この中の1つに相同するヒトの遺伝子であるSAMMD14が肺腺がん組織や肺腺がん培養細胞株でも高率にメチル化が認められ、遺伝子の発現レベルが低下していることを明らかにした。さらに、肺腺がん症例の臨床病理学的検討により、異常メチル化が浸潤型早期肺腺がんに特異的に認められることも明らかにした。また、免疫組織学的検討では、大部分肺腺がんにおいてSAMMD14蛋白の発現は陽性であることを明らかにした。これまでに、肺腺がんにおいてSAMMD14遺伝子の異常メチル化及び遺伝子発現レベルの低下が生じていることを明らかにした報告は認められず、本研究が初めての報告である。

さらに、これまでにSAMMD14遺伝子の機能について検討した報告がないため、siRNAを導入したSAMMD14遺伝子を用いて肺腺がん培養細胞株の細胞増殖能や遊走能を検討し、SAMMD14遺伝子はがん細胞の増殖や遊走に関与していることも明らかにした。

今回の検討により、SAMMD14遺伝子の異常メチル化及び遺伝子発現レベルの低下が肺腺がんの進行の経過中に生じる可能性が示唆されるとともに、SAMMD14遺伝子のがん細胞の増殖に関係する可能性が示唆されたが、SAMMD14遺伝子の機能やそのメチル化と発がんやがん進行との関係については更なる検討が必要がある。

(結論)

浸潤型早期肺腺がんにおいては、SAMMD14遺伝子のCpG領域で異常メチル化が認められることが明らかになった。同遺伝子の機能やそのメチル化と肺腺がん発生との関係など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示唆された。

審査の結果の要旨

本研究は、ヒト肺腺がん類似したA/Jマウス肺腺種において異常メチル化されている遺伝子を高度な遺伝子学的手法を駆使して解析し、プロモーター部のCpG領域が異常メチル化している遺伝子を見出し、その遺伝子と相同するヒトの遺伝子であるSAMMD14が、ヒト肺腺がんにおいても正常肺に比べ有意に異常メチル化していること、異常メチル化した遺伝子ではその発現レベルが低下していること、この異常メチル化は早期浸潤がんの特異的に認められることを初めて明らかにした。

さらに、siRNAを導入したSAMMD14遺伝子を用いて肺腺がん細胞の増殖能や遊走能を検討し、SAMMD14

遺伝子のがん細胞の増殖や遊走に関与していることも初めて明らかにした。

ヒト肺腺がんにおいて SAMD14 遺伝子の CpG 領域に異常メチル化が生じていることを明らかにした報告や SAMD14 の機能を検討した報告はこれまでになく、本研究によりヒト肺腺がんに関して幾つかの新しい知見が明らかとなった。同遺伝子の機能、同遺伝子の異常メチル化と肺腺がん発生との関係、臨床的な意義などについて、今後の研究の発展が期待される。

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。