

氏名(本籍)	しば	あや	綾(東京都)	
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6586号			
学位授与年月日	平成25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	肺腺癌において <b>stratifin</b> は脱メチル化により発現上昇し、細胞増殖能を亢進させることで悪性を促す			
主査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	本多伸一郎	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	栗島浩一	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	酒井光昭	

## 論文の内容の要旨

### (目的)

現在、日本における癌死の原因として最も多い癌種が肺癌であり、その5年生存率は40%以下と極めて低い。その中でも肺腺癌は発生頻度が最も高く近年増加傾向にある。進行腺癌ではEGFR変異、ELM4-ALK転座等の異常に対して分子標的治療が行われるようになったが、依然根治は困難である。つまり現状では肺腺癌の真の救命のためには早期発見・早期治療が重要と言える。肺腺癌を根治するにはその根底にある発癌分子機構を解明する必要がある。肺末梢に発生する腺癌は基本的に既存の肺胞上皮を置換しながら増殖する前癌病変 (Atypical adenomatous hyperplasia, AAH) や上皮内腺癌 (adenocarcinoma in situ, AIS)、いわゆる細気管支肺胞上皮癌 (bronchioloalveolar carcinoma, BAC) を介して浸潤癌に多段階的に進展すると考えられる。野口分類では AIS (BAC) を含む小型腺癌を病理形態学的に置換性増殖群と非置換性増殖群に分類し、前者のうち AIS (BAC, type A) に線維芽細胞の増殖巣が加わる (type C) と予後が悪くなることが明らかになっている (Noguchi M, et. al. Cancer 1995)。そこで、初期腺癌であるものの予後の悪い type C 腫瘍と予後良好な上皮内癌である type A 腫瘍の発現遺伝子プロファイリングを比較することにより差次的発現遺伝子を選別し、上皮内癌から初期浸潤癌へ進展する悪性の責任遺伝子、あるいは責任遺伝子群の同定を試みた (Shiba-Ishii A, et. al. Int J Cancer 2011)。その中で type A に比べて type C において発現が高い遺伝子の1つとして、stratifin (SFN, 14-3-3 sigma) が同定された。

SFN は 14-3-3 ファミリーに属するアンカー蛋白であり、さまざまな細胞の活動に関与している。癌に関連しては、腫瘍抑制遺伝子として機能する側面と発癌遺伝子として機能する側面を併せ持ち、両作用遺伝子と考えられる。肺腺癌におけるその機能の報告は未だないため、本研究では SFN が肺腺癌における発現制御の様式と、担っている機能とその機序を明らかにすることを目的とした。SFN は予後良好の上皮内腺癌 (type A) と比べて予後不良であった初期浸潤癌 (type C) で高発現していた遺伝子であり予後の悪化・肺腺癌の初期悪性に何らかの関与があることが予想された。肺腺癌の極めて初期における発癌増悪の分子機構の一端を明らかにして肺腺癌の早期発見、早期治療に貢献することが本研究の目的である。

## (対象と方法)

本研究は以下の3点を軸に研究を進めた。

- ① SFN 発現解析：8種類の肺腺癌細胞株、および106例のヒト肺腺癌組織検体を対象として、定量的 real-time RT-PCR、western blotting、免疫染色を行った。
- ② SFN 機能解析：肺腺癌細胞株 A549 など3種類を対象として、RNA 干渉と発現ベクターを利用して機能解析を実施した。細胞増殖能、細胞周期、浸潤能、アポトーシス、細胞老化について個別に解析し、SFN との関係を考察した。また、siRNA により SFN 発現を抑制した A549 をヌードマウスの皮下に異種移植し、腫瘍の生着や増大にどのような影響が見られるか観察した。
- ③ SFN 発現制御機構の解析：ヒト肺腺癌組織 31 例からゲノム DNA を抽出し、遺伝子増幅の検出 (real-time genomic PCR)、およびメチル化解析を行った。SFN プロモーター領域のメチル化状態は DNA を bisulfite 処理した後に bisulfite sequence、real-time MSP を実施して解析した。

## (結果)

発現解析の結果から、SFN は上皮内癌に比べて初期浸潤癌において発現が有意に高いことが確認され、免疫染色を実施すると上皮内癌では 12.9% が陽性を示したのに対し、type C 以上の浸潤癌では 98.7% が陽性となった。また、SFN は肺腺癌細胞において細胞増殖能を亢進させる機能を持つことが示された。動物実験からその増殖促進作用は生体内でも確認され、移植肺腺癌細胞が形成した腫瘍容積の増大を促していた。

さらに興味あることとして SFN の発現は DNA の SFN プロモーター領域のメチル化機構により制御されていることがわかった。正常肺組織や上皮内癌では SFN のプロモーター領域は完全メチル化していたが、初期浸潤癌では少なくとも一部で脱メチル化することによって発現が異常に亢進していることが示された。脱メチル化は腫瘍の病理学的病期が進行するに伴って進み、p53 異常発現や EGFR 遺伝子変異とは独立した現象であった。

## (考察)

免疫染色により肺腺癌組織で SFN の発現解析を行うと、type C 以上の初期浸潤癌では 98.7% の症例で陽性であったのに対し、上皮内癌である type A, B の陽性率は 12.9% にとどまった。さらに興味深いことは、SFN は初期浸潤癌の中心の浸潤部だけでなく辺縁の上皮内進展部でもびまん性に陽性となることである。この知見を利用すれば、浸潤癌の上皮内進展部のみが診断用標本として採取されたのか、全体が上皮内癌なのかこれまで鑑別が困難だった場合でも、SFN に対する免疫染色を行えば陰性となった腫瘍はほぼ確実に非浸潤癌であると鑑別することができると思われる。

機能解析の結果からは、SFN の発現を抑制すると細胞数や BrdU の取り込み量、さらには S 期に属する細胞の割合が低下し、細胞増殖能を亢進させる機能があることが示された。SFN 抑制によってアポトーシスや細胞老化が誘導されることはなく、細胞数の低下はこれらに起因するものではないと推測される。さらに、動物実験により SFN は生体内でも細胞の増殖能を亢進させ腫瘍の形成を促進していることが明らかになり、持続的に SFN 発現を抑制する手段を用いることで肺腺癌の進展を抑えられる可能性が示唆された。

一方、SFN 発現制御メカニズムを明らかにするために、遺伝子増幅、メチル化異常の検出を試みた。ゲノム DNA の SFN コード領域の遺伝子増幅は検出されなかったものの、正常肺組織と肺腺癌組織では SFN プロモーター領域のメチル化状態に違いがあることを見出した。Bisulfite sequence や real-time MSP の結果より、正常肺組織と上皮内癌に比べて type C 以上の浸潤癌ではそのメチル化率が低下することがわかり、このことから上皮内癌から浸潤癌への進展に伴い SFN プロモーター領域で一部脱メチル化が起こっていることが示された。SFN は他臓器の癌において癌抑制遺伝子として働きメチル化により発現が抑制されていることがわかっているが、今回のように腫瘍において脱メチル化が見出されたのは初めてのことである。さらに、このメチル化率は病期が進むにつれて低下し、p53 の異常発現や EGFR 遺伝子変異とは独立した事象であるこ

とも明らかになった。一般的に肺腺癌の遺伝子異常はEGFRの変異を基本として相互排他性があると考えているが、SFNの脱メチル化はEGFR変異とは独立した異常であり大変興味深い。脱メチル化の原因はゲノム全体の低メチル状態から続発的に引き起こされた可能性やメチラーゼ活性の変化などが考えられるが、いずれも断定的ではなく今後の検討課題である。

**(結論)**

SFNは正常肺、および上皮内癌ではメチル化によって発現抑制されているが、何らかの原因で脱メチル化されることで発現が異常に亢進し、細胞の増殖能を高めることで初期浸潤癌への悪性を促していると考えられた。

**審 査 の 結 果 の 要 旨**

臨床検体の解析と実験を組み合わせて、stratifyn 遺伝子の脱メチル化による発現亢進が肺癌の腫瘍形成能の促進に関与していることを示した優れた研究である。

平成 25 年 1 月 11 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。