

主論文の要旨

**Aberrant TET1 Methylation Closely Associated
with CpG Island Methylator Phenotype
in Colorectal Cancer**

〔 異常な TET1 のメチル化は大腸がんメチル化高集積症例と強く相関する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：高橋 雅英 教授)

市村 典久

【背景】

大腸がんは全世界で最も発生頻度の多いがんの一つであり、様々なゲノムやエピゲノム異常の蓄積が、がん化に関与している。大腸がんの中には CpG アイランドの同時多発的な高メチル化をきたす CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) の一群が存在し、特徴的な臨床病理組織像を示すことが知られているが、CIMP の発がんへの影響については未だ不明な点が多い。これまでに、大腸がんを対象として DNA のメチル化に関わる DNMT (DNA Methyltransferase) 遺伝子群と CIMP との関連についての報告は数多く認めるが、脱メチル化に関わる遺伝子群と CIMP との関連については未だ報告がない。近年、脳腫瘍や血液腫瘍において脱メチル化を仲介する TET (Ten-eleven translocation) 遺伝子群の機能抑制と異常な DNA 高メチル化の関係が報告されているが、大腸がんを対象とした報告は皆無である。今回我々は TET 遺伝子群に着目し、脱メチル化と大腸がん CIMP 陽性例で認める異常な高メチル化との関連について生物学のおよび臨床学的見地から解析を行った。

【対象および方法】

まず、6 種類の大腸がん細胞株 (CIMP 陰性 3 株、CIMP 陽性 3 株)、168 例の大腸がん臨床検体を用い Real time RT-PCR 法、Western blot 法にて TET 遺伝子群の発現レベルを解析し、発現低下を認めた遺伝子について Bisulfite pyrosequencing 法を用い DNA メチル化レベルを解析した。また、高メチル化を認めた細胞株に対して DNA メチル化酵素阻害剤である DAC (5-aza-2'-deoxycytidine) によりメチル化活性を阻害した後に mRNA の発現レベルを解析した。次に CIMP 陽性例で有意に高率に認める BRAF (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog)、KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) 遺伝子の変異、hMLH1 (human MutL homolog 1) 遺伝子のメチル化と、TET 遺伝子群のメチル化との相関を解析した。また、前がん病変とされる 64 例のポリープ部を対象に TET 遺伝子群のメチル化を解析した。さらにゲノムワイドなメチル化レベルと TET 遺伝子群のメチル化の関連を解析する目的で、22 例の大腸がん臨床検体を TET 遺伝子群のメチル化の有無で分類し Methylated CpG Island Amplification-Microarray (MCAM) を行った。最後に公共データベース (TCGA: The Cancer Genome Atlas) を用い、CIMP 陽性例における TET 遺伝子群のメチル化と臨床病期との関連を解析した。

【結果】

大腸がん細胞株を用いて TET 遺伝子群の発現を解析した結果、TET2, TET3 は mRNA, タンパク質レベル共に CIMP 陰性、陽性細胞株間で発現パターンに差を認めなかったのに対し、TET1 の発現は CIMP 陽性細胞株において高度に発現の低下を認め (Fig1-A)、プロモーター周囲の CpG アイランドは高度にメチル化されていた (Fig1-B)。また、TET1 の高メチル化を認めた細胞株に対して DAC によって TET1 遺伝子の発現が回復することを確認した (Fig1-C)。同様に、臨床検体においても CIMP 陰性例 (n=91) と比

較して CIMP 陽性例 (n=28) で有意に *TET1* の mRNA 発現レベルの低下を認めた ($p=0.0063$) (Fig2-A)。 *TET1* のメチル化 (>8% をメチル化陽性と定義) は CIMP 陰性例では 113 例中 2 例 (2%) であったのに対し、 CIMP 陽性例では 55 例中 23 例 (42%) と、 CIMP 陽性例に有意に高頻度に認めた ($p<0.0001$) (Fig2-B)。 この結果はポリープでも同様に認めた (Fig2-C)。 *TET1* のメチル化は CIMP 陽性例で高頻度に認める *BRAF* の変異と強く相関する一方で、 *hMLH1* のメチル化とは相関しなかった (Fig3-A,B)。 MCAM によるゲノムワイドなメチル化遺伝子プロファイルを解析した結果、 *TET1* のメチル化陽性例は陰性例と比較しメチル化遺伝子数が有意に数多く蓄積していた (Fig3-C) ($p=0.007$)。 また、 *TET1* のメチル化症例では有意に遠隔転移の頻度が少なかった (Table1) ($p=0.045$)。

【考察】

我々は CIMP 陽性大腸がんにおいて、 *TET1* が DNA のメチル化によって高頻度に発現抑制されていることを見出した。 これまで、 *BRAF* 変異と *hMLH1* のメチル化によるマイクロサテライト不安定性が、 CIMP 陽性大腸がんにおける一つの発がん経路と考えられてきた。 しかし我々の結果は、 *BRAF* 変異を伴う *TET1* のメチル化症例が、 上述の経路とは異なる発がん過程を通して CIMP 陽性大腸がんの発生に寄与する可能性を示唆している。 さらに、 *TET1* のメチル化症例は有意に高メチル化遺伝子が蓄積していること、 及び遠隔転移症例が少なかったことから鑑みて、 *TET1* のメチル化は発がん過程においてゲノムワイドなメチル化レベルを亢進させ、 臨床的にも特徴的な CIMP 陽性大腸がんの形成に寄与することが示唆された。 また、 臨床現場においては *TET1* のメチル化は転移予測の優れたバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

【結語】

大腸がん CIMP 陽性例において、 *TET1* のメチル化による発現抑制は *hMLH1* のメチル化とは異なる経路を介して発がんに寄与すると共に、 大腸がんの転移予測のバイオマーカーとなりうることが示された。