

主論文の要約

**Estrogen receptor 1 gene as a tumor suppressor  
gene in hepatocellular carcinoma detected  
by triple-combination array analysis**

〔 トリプルアレイ法にて抽出した *ESR1* の肝細胞癌の  
癌抑制遺伝子としての検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻  
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

菱田 光洋

## 【目的】

肝細胞癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC) は現在でも予後不良な疾患である。最近では画像診断や治療法が進歩してきたが、未だに高い再発を認めている。HCC も他癌腫と同様に、遺伝子異常が発癌に関与していることは知られているが、その発癌メカニズムは複雑で、全貌はまだ明らかにされていない。また、遺伝子マーカーの発見などが、予後の改善につながると考えられる。今回、当教室で施行した肝切除標本を用いて、発現アレイ、Single Nucleotide Polymorphism (SNP)アレイ、メチル化アレイを組み合わせる新規癌関連遺伝子を抽出する方法(トリプルアレイ法)を用い、HCC に関する新規癌関連遺伝子の検出を試みた。

## 【方法】

本研究ではまず、当科にて切除術を行った慢性 C 型肝炎を背景に持つ 60 代女性の HCC 摘出標本の癌部、非癌部から抽出した核酸を用い、トリプルアレイ法による解析を行った。RNA を用いて発現アレイを、DNA を用いて SNP アレイ、メチル化アレイを行った。これらの結果より変化を認めた遺伝子を抽出し、9 種類の HCC 細胞株と定量 RT-PCR による発現を調べた。また、トリプルアレイの結果より、発現低下はプロモーター領域のメチル化が関与していると仮定し、methylation specific PCR (MSP) と bisulfite sequence analysis を行った。臨床病理学的所見との相関を検討した。さらにその遺伝子について当科で切除した HCC 48 症例を用い、定量 RT-PCR および MSP を行い、臨床病理学的因子との関連を検討した。

## 【結果】

6 番染色体に存在する estrogen receptor 1 遺伝子 (*ESR1*) は、発現アレイで Log<sub>2</sub> Ratio -2.5 と癌部で明らかな低下を認めた (Table I)。SNP アレイでは遺伝子座 6q25.1 のコピー数は 2 と正常であった。また、*ESR1* の配列内において、非癌部が AB call である SNP site を 26 か所で認めたが、いずれも癌部で AB call を示しており、ヘテロ接合性欠損 (loss of heterozygosity (LOH)) は認めず (Table II)、染色体コピー数にも異常は認めなかった (Fig. 2)。メチル化アレイではメチル化値が非癌部で 0.093、癌部で 0.775 (0~1、高い値ほどメチル化している) と癌部のメチル化が優位であった (Table III)。また、*ESR1* のプロモーター領域の塩基配列を調べると多数の CpG 配列を認め、発現低下の機序をメチル化によるものと仮定した。アレイに用いた検体では、RT-PCR を行くと癌部で発現の低下を認め (Fig. 1A)、MSP を行くと癌部のみで陽性であった (Fig. 1B)。9 種類の HCC 細胞株 (HuH1、HuH2、HuH7、HepG2、Hep3B、HLE、HLF、SK-Hep1、PLC/PRF/5) では、MSP を行くと HuH2、HepG2、HLE、HLF、SK-Hep1 において陽性であり (Fig. 1C)、RT-PCR においては、HuH2、HepG2、HLF、SK-Hep1 で発現低下を認め、さらにメチル化阻害剤 5-aza-dC 処理により再発現することが確認できた (Fig. 1D)。*ESR1* のプロモーター領域の bisulfite sequence analysis を行くと、CpG islands は、SK-Hep1 では CG 配列のままで完全メチル化を

認めていた一方、HuH7 では TG 配列となりメチル化を認めていなかった(Fig. 3A)。HuH7 と SK-Hep1 の各 6 つずつのクローン検体では、一部でメチル化状態が異なるものを認めた (Fig.3B)。続いて、切除標本 48 例について検討を行った。MSP では、40 例(83.3%)の癌部で陽性であった (Fig. 4A)。Case 5 では、非癌部でも弱いメチル化を示していた (Fig. 4B)。定量 RT-PCR を行くと、*ESR1* の mRNA 発現量は非癌部に比べ癌部で有意に低下を認めた ( $P<0.001$ 、Fig. 4C)。また、mRNA 発現量が癌部で 90%より低下した症例で (24 例; 50%)、臨床病理学的因子との関連を検討すると、肝障害度の悪化、病理学的門脈浸潤陽性、腫瘍径 3cm 超、HBV 感染陽性と、有意な相関を認めた。しかし、全生存率および無再発生存率では有意差は認めなかった。

### 【考察】

*ESR1* は、エストロゲンレセプターの一つである estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) をコードしている。エストロゲンは、乳腺細胞の増殖促進、卵巣排卵制御、脂質代謝制御、動脈硬化抑制などの働きがあり、また、乳腺、大腸、血液、膀胱などの悪性腫瘍に関与すると報告されている。また、肝細胞では、活性酸素、炎症誘発因子である IL-6、転写因子である AP-1 や NF- $\kappa$ B を抑制し、保護作用や癌化リスクの低下に関与すると考えられている。そのため、*ESR1* を抑制すると、ER $\alpha$  が減少し、エストロゲンの作用が抑制され、活性酸素、IL-6、AP-1、NF- $\kappa$ B 等の抑制がなくなり、その結果、肝細胞の癌化リスクが上がると考えられた。また、エストロゲンが HBV 遺伝子の転写を抑制するとの報告も認め、*ESR1* 発現低下と HBV 感染陽性とに有意な相関が認められたものと考えられた。

遺伝子のメチル化に関し、癌部、非癌部でもメチル化を認める症例を認めた。しかし、メチル化特異的 PCR のバンド濃度に差を認めており、前癌病変に既にプロモーター領域のメチル化の変化があり、癌化によりさらにメチル化が増加した症例が存在したと考えられ、その結果、癌部の遺伝子の mRNA 発現量の低下につながったものと考えられた。

### 【結論】

*ESR1* は HCC の癌抑制遺伝子の一つと考えられ、その発現制御機序に、プロモーター領域のメチル化が関係していることが示唆された。また、癌関連遺伝子の検出にトリプルアレイ法が有用であると考えられた。