

主論文の要旨

***Dynamin 3* a new candidate tumor suppressor
gene in hepatocellular carcinoma detected by triple
combination array analysis**

〔 *Dynamin 3* トリプルアレイ法により同定した
肝細胞癌の新規癌関連遺伝子 〕

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)

猪川 祥邦

【背景】

肝細胞癌(以下 HCC)は様々な治療手段があるにも関わらず予後不良な疾患である。そのためこの疾患の発癌メカニズムを解明することは重要である。当教室ではこれまでに肝切除標本を用いて発現アレイと Single Nucleotide Polymorphism (以下 SNP)アレイを行い癌関連遺伝子を抽出する方法であるダブルアレイ法を考案し、HCCにおける癌関連遺伝子を報告してきた。この方法では遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化が発現低下の原因であるという仮説をもとに検討を開始してきた。それに加えてさらにメチル化の関与を確実にするためにメチル化アレイを追加したトリプルアレイ法を開発した。この方法により *Dynamin 3* (以下 *DNM3*)遺伝子を同定し得たが、この遺伝子はこれまでに悪性疾患との関連を述べられたことがほとんどなく、また HCC との関連を調べた報告はみられない。今回、この遺伝子の HCC におけるメチル化および発現について検討した。

【方法】

本研究ではまず当科にて切除術を行った慢性 C 型肝炎を背景にもつ 68 歳女性の HCC 切除検体を用いて、癌部および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 細胞株と当科で切除された HCC48 例について切除検体を用いて検討した。切除検体を用いて定量 RT-PCR を行った。HCC の細胞株および 48 例の検体の癌部、非癌部を用いて Methylation specific PCR (以下 MSP)を行った。Bisulfite sequence analysis によって MSP の妥当性を検討した。5-aza-2'-deoxycytidine (以下 5-aza-dC)によってメチル化阻害を行った細胞株と行っていないもので RT-PCR を行い発現について比較した。HCC48 例を用い臨床病理学的所見との相関を検討した。

【結果】

1 番染色体に存在する *DNM3* 遺伝子は発現アレイにおいて癌部で Log2 ratio-1.0 と発現の低下を認め(Table 1)、半定量 RT-PCR によって同症例の癌部における発現低下を確認した(Figure 1A)。SNP アレイでは遺伝子座 1q24.3 のコピー数は正常であり(Figure 1B)、また *DNM3* の配列内において非癌部が AB call である SNP site を 3 ヶ所認めたが、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)は認めなかった(Table 2)。メチル化アレイでは、メチル化値 (0 ~1.0) が非癌部で 0.213、癌部で 0.879 と癌部で強いメチル化を認め(Table 3)、MSP によって同症例の癌部における強いメチル化が確認された(Figure 1C)。これらの結果から、*DNM3* の癌部における発現低下はプロモーター領域のメチル化が原因であると考えられた。

半定量 RT-PCR では、3 種類の細胞株において 5-aza-dC 処理により発現の回復が確認された(Figure 2A)。9 種類の細胞株での MSP では、HuH2 で完全なメチル化、他

に 7 種類で部分的なメチル化がみられ、PLC/PRF/5 ではメチル化を認めなかった (Figure 2B)。Bisulfite sequence analysis によって、MSP で完全メチル化と判定された HuH2 では CG、非メチル化と判定された PLC/PRF/5 cells は TG となっており、MSP が正しく働いていることが確認された (Figure 3)。48 例の HCC 切除標本について検討を行った。MSP では癌部で 48 例中 33 例 (68.7%) にメチル化を認め、非癌部では 48 例中 13 例 (27.0%) であり有意に多く癌部のメチル化を認めた (Figure 4A, B)。48 例において定量 RT-PCR を行い、癌部の値と非癌部の値の比を発現 Index として、癌部のメチル化がある症例、およびない症例で比較すると、メチル化症例において発現 Index が低い傾向を認めた (Figure 5)。DNM3 の発現と 48 例の背景因子との関連については、浸潤性発育の因子のみが発現との相関を認めたが、他は関連がみられなかった (Table 4)。切除後予後については DN M3 の発現が癌部で低下している症例が上昇している症例よりも有意に疾患特異的生存率が不良であった (Figure 6)。単変量解析では肝障害度、肝硬変有無、DN M3 発現低下が予後因子として抽出されたが、多変量解析では有意とはならなかった (Table 5)。

【考察】

HCC においてこれまでにいくつかのプロモーター領域のメチル化を伴う遺伝子が同定されてきている。当教室ではこれまでに HCC の新規癌関連遺伝子の抽出のためにダブルアレイ法およびトリプルアレイ法を考案してきた。今回はトリプルアレイ法によって DN M3 を癌抑制遺伝子の候補として同定した。DN M3 はエンドサイトーシスに関わる dynamin ファミリー的一种であるとされ、悪性疾患との関連についてはごく少数しか報告されておらず、HCC との関連について調べた報告はみられない。DN M2 について検討した報告では、DN M2 は子宮頸癌において癌部での発現低下がリンパ節転移陽性、腫瘍径増大と関連しており、さらに DN M2 の downregulation によって、matrix metalloproteinase-2 (以下 MMP2) 蛋白の発現亢進が認められた。MMP2 は IV 型コラーゲンを分解する酵素であり、HCC を含め様々な癌の増殖、進展に関わることが知られている。このことから HCC において DN M3 はプロモーター領域のメチル化によりその発現が低下し、MMP2 の過剰発現を介して HCC の増殖、進展に関わっている可能性が考えられた。臨床的な意義としては、DN M3 の発現低下が HCC 切除後予後のマーカーとなりうる可能性や、DN M3 遺伝子のメチル化症例に対する抗メチル化剤が有用である可能性が考えられた。

【結語】

DN M3 遺伝子は HCC の新規癌関連遺伝子の一つと考えられ、その発現制御にはメチル化が関与していることが示唆された。DN M3 遺伝子を同定し得たトリプルアレイ法は、癌関連遺伝子の検索に有用な手法であると考えられた。