

主論文の要旨

**Identification of intragenic methylation in the
TUSC1 gene as a novel prognostic marker of
hepatocellular carcinoma**

〔 肝細胞癌における新規予後マーカーとしての
TUSC1 遺伝子内メチル化の同定 〕

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

(指導：小寺 泰弘 教授)

清水 大

【背景】

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma; HCC) は、全世界において罹患数が 6 番目に多い悪性新生物であり、癌死患者数では第 3 位となっている。治癒切除後も高率に再発をきたし、その 5 年生存率は 0~14%と報告されている予後不良な疾患である。その一因として、他の癌腫と比較して全身治療の選択肢が限られていることが挙げられる。再発・転移を有する HCC に対するエビデンスレベルの高い全身治療法は分子標的治療薬ソラフェニブに限られており、しかもその予後延長効果は満足のいくものではない。そのため、新たな分子標的治療薬や予後・再発バイオマーカーの開発が急務であり、その候補となり得る新規 HCC 関連遺伝子の同定が不可欠である。Tumor suppressor candidate 1 (TUSC1) は 9 番染色体短腕 21.2 に存在し、2461 塩基対の単一エクソンから成る遺伝子である。これまで肺癌において腫瘍増殖に抑制的な機能を有するとの報告があるのみで、肝臓を含む消化器系臓器での発現や機能については明らかにされていない。本研究では、HCC における TUSC1 発現の臨床的意義と、その調節機序を調べることを目的とした。

【対象と方法】

68 歳女性の HCC 切除検体の癌部組織および非癌部組織から得た total RNA を対象とした microarray 解析で、癌部で発現抑制を認める遺伝子として TUSC1 を同定した。CpG Island Searcher (<http://cpgislands.usc.edu/>)を用いて TUSC1 DNA 上の CpG island を検索した。9 種の HCC 細胞株と、術前治療歴のない HCC 患者 94 例の肝切除標本から得られた癌部組織および非癌部組織を対象に、定量的 real time RT-PCR 法を用いて TUSC1 mRNA 発現量を調べるとともに、メチル化特異的 PCR 法を用いて TUSC1 DNA メチル化状態について検討した。DNA メチル化の発現への影響度を評価するために、HCC 細胞株に対し 5-aza-dC による脱メチル化処理を行い、その前後での TUSC1 mRNA 発現の変化を RT-PCR 法を用いて調べた。また、HCC 細胞株を対象に bisulfite sequence を行い、メチル化特異的 PCR 法の正確性を確認した。切除肝組織における TUSC1 DNA メチル化状態と TUSC1 mRNA 発現量、臨床病理学的因子および予後との相関性を検討した。さらに、良質な切片の得られた HCC 患者 35 例の組織切片において、TUSC1 蛋白発現度と肝組織内分布を免疫組織化学染色法により検討した。

【結果】

microarray 解析の結果では、非癌部組織に比べて癌部組織で TUSC1 mRNA 発現が低下していた (\log_2 ratio -3.4) (Table I)。患者由来の正常肝組織と比較して、9 種中 8 種の HCC 細胞株で TUSC1 mRNA 発現量の低下を認めた (Fig. 1A)。肝切除標本では、非癌部肝組織に比べて癌部組織で有意に TUSC1 mRNA 発現量は低下していた ($p < 0.001$) (Fig. 1B)。背景肝の状態による非癌部肝組織中 TUSC1 mRNA 発現量の比較では、肝硬変症例と非肝硬変症例の間に差を認めなかった (Fig. 1C)。TUSC1

遺伝子は単一エクソンから成り、エクソン内に CpG island を有していた (Fig. 2)。同部を対象としたメチル化特異的 PCR 法で、HCC 細胞株 9 種中 3 種で TUSC1 DNA メチル化を認め (Fig. 3A)、これらの細胞株においては TUSC1 mRNA 発現量の高度な低下と、脱メチル化処理による mRNA 発現の回復を認めた (Fig. 3B)。Bisulfite sequencing の結果から、メチル化特異的 PCR 法により DNA メチル化が正確に検出されていることが確認された (Fig. 3C)。癌部組織中に TUSC1 DNA メチル化を認める症例 (94 例中 29 例) では、メチル化を認めない症例と比べて有意に TUSC1 mRNA 発現量が低下しており ($p=0.007$) (Fig. 4A)、治癒切除術後の疾患特異的生存期間が有意に短縮していた ($p=0.031$) (Fig. 4B)。また、TUSC1 DNA メチル化は、進行病期と有意な相関性を認めた ($p=0.025$) (Table II)。免疫組織化学染色法において、TUSC1 蛋白は肝細胞の核および細胞質の双方に分布しており、その発現度は、TUSC1 mRNA 発現量、DNA メチル化状態と相関していた (Fig. 5)。

【考察】

本研究では、HCC における TUSC1 発現の臨床的意義、およびその調節機序について検討した。9 種中 8 種の HCC 細胞株で正常肝組織よりも TUSC1 mRNA 発現量の低下を認め、肝切除標本から得られた癌部組織では非癌部組織に比べて TUSC1 mRNA 発現量が有意に低下していたことから、TUSC1 は HCC において癌抑制遺伝子としての役割を有している可能性が示唆された。一方で、非癌部組織を用いた背景肝別の発現解析では、肝硬変の有無による TUSC1 mRNA 発現量に差を認めなかったことから、TUSC1 の発現抑制は HCC の発癌段階もしくはそれ以降の腫瘍進展に寄与しているものと考えられた。TUSC1 mRNA 発現量は、TUSC1 DNA メチル化が検出された HCC 細胞株で高度に低下されており、脱メチル化処理でその発現の回復が確認された。以上から、TUSC1 遺伝子は、遺伝子内 CpG island の DNA メチル化が主要な発現調節機序の 1 つであることが示唆された。また、肝切除標本中の癌部組織内で TUSC1 DNA メチル化を認めた症例では、治癒切除術後の疾患特異的生存期間が有意に短縮しており、TUSC1 DNA メチル化が HCC 治癒切除後の新規予後予測マーカーとなる可能性があるものと考えられた。一方で、TUSC1 DNA メチル化を伴わずに TUSC1 mRNA 発現が低下している細胞株および臨床検体が存在しており、遺伝子内 DNA メチル化以外の発現抑制機序の存在を考慮し、さらなる検討の必要性も示唆された。TUSC1 の存在する 9 番染色体短腕では、HCC においてヘテロ接合性喪失の頻度が高いとする報告もあり、TUSC1 mRNA 発現抑制機序としてヘテロ接合性喪失や欠失、転座も関与している可能性が考えられる。将来的には本研究で得られた知見から、HCC 細胞における詳細な TUSC1 の機能解析や、HCC 患者血清中 TUSC1 DNA メチル化検出の診断的有用性の検証へと発展することが期待される。

【結論】

HCC において TUSC1 は高頻度に発現が抑制されており、その発現調節機序として

DNA メチル化が重要な役割を担っているものと考えられた。TUSC1 DNA メチル化は、HCC の新たな予後予測マーカーとなる可能性が示唆された。