

学位論文の要旨

| 学位の種類 | 博士 | 氏名 | 坂本 淳 |
|--|----|----|------|
| 学位論文題目 | | | |
| Augmentation of the sensitivity of serum screening for the <i>p16</i> hypermethylation of colon cancer, by immunoprecipitation of nucleosomal DNA | | | |
| (ヌクレオソーム DNA 免疫沈降法を用いた, 大腸癌における血清メチル化 <i>p16</i> 遺伝子の高感度検出法に関する研究) | | | |
| 共著者名 藤谷幹浩, 岡本耕太郎, 渡 二郎, 綾部時芳, 斉藤裕輔, 蘆田知史, 高後 裕 | | | |
| 掲載学会雑誌名 未公表 | | | |
| 研究目的 | | | |
| <p>癌特異的な遺伝子異常を血液から検出して, 癌の発見診断に用いる試みが始まっている. この癌血液遺伝子診断には <i>p53</i> や <i>k-ras</i> 遺伝子の変異, <i>p16</i> 遺伝子のメチル化などを標的としているが, その検出感度は十分とは言えず, 現在まで臨床応用は実現していない^{1),2)}. 例えば血清からの <i>k-ras</i> 変異の検出率は膵癌で 27-81 %, 大腸癌で 7-43 %, <i>p53</i> 変異の検出率は大腸癌で 16 %である. また, メチル化 <i>p16</i> 遺伝子を標的とした血清診断の検出感度は, 食道癌 18 %, 胃癌 10-52 %, 大腸癌 27 %であり, 検出感度が低い主な原因は血清から十分量の異常遺伝子を回収, 抽出できないことにあるとされる³⁾.</p> <p>一方, メチル化された遺伝子では高率にヒストンの脱アセチル化を認めることが知られていることから³⁾, われわれは癌組織由来のメチル化 DNA は, ヒストンと強く結合しヌクレオソームを形成したまま, 血清中に遊離していると推測した. そこで抗ヒストン抗体による免疫沈降法を導入して, 血液中のヌクレオソームに含まれる DNA を選択的に抽出・濃縮して用いる新しい血清メチル化遺伝子診断法を考案した. 本研究では, 大腸癌症例を対象に血清メチル化 <i>p16</i> 遺伝子の新しい血清遺伝子診断法の有用性を明らかにすることを目的とした.</p> | | | |
| 材料・方法 | | | |
| Cell line と細胞可溶化材料の作製 | | | |

大腸癌細胞株 SKCO-1 (p16 遺伝子のメチル化が確認されている細胞株) から lysis buffer (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Pierce Biotech., Rockford, IL) を用いて細胞可溶化材料 (cell lysate) を作製した。分光光度計にて total DNA 量を測定し、蒸留水およびヒト正常血清にて種々の濃度に希釈した後、後述する方法にて DNA を抽出した。

大腸癌組織および血清

旭川医科大学付属病院にて切除した大腸癌 51 例 51 病変, 大腸腺腫 10 例 10 病変, 健常人 10 例を対象とした。対象例から切除前に血清を採取し -80 °C に保存した。また, 大腸癌および大腸腺腫症例では切除組織をホルマリン固定し保存した。切除大腸癌組織は病理組織学的に全て腺癌であり, TNM 分類に基づいて病期分類を行った。

なお, 本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得, 対象患者および健常人からは全て文書によるインフォームドコンセントが得られている。

DNA 吸着カラムによる DNA 抽出法 (従来法)

希釈した cell lysate, 患者血清および大腸癌組織から DNA 吸着ヒドロキシアパタイトカラム(QIAamp Blood Kit, Qiagen, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出した。

免疫沈降法による DNA 抽出法 (IP 法)

希釈した cell lysate (200 μ l) および患者血清 (400 μ l) に anti-histone (H1) monoclonal antibody (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) 20 μ g を加え室温で一時間混和した。その後, 我々が作製した anti-mouse IgG monoclonal antibody 結合セファロース 4B (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を 150 μ l 加え, 一時間室温で混和した。1000 rpm, 1 分間遠心後, 上清を除去し, PBS 洗浄を行った後, 従来法と同様に DNA 吸着ヒドロキシアパタイトカラムを用いて DNA を抽出した。

Polymerase chain reaction (PCR)

従来法および IP 法にて cell lysate から抽出した DNA 4 μ l をテンプレートとして, p16 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った。産物をアガロースゲルで電気泳動を行いエチジウムブロマイドで発色し, p16 遺伝子の検出限界を検討した。

定量的 PCR

Light CyclerTM (Idaho Technology Inc., Idaho Falls, ID) を用いて p16 遺伝子特異的プライマーにより定量的 PCR を行い, 従来法および IP 法にて cell lysate から抽出した p16 遺伝子の DNA 量を比較した。

Methylation specific PCR (MSP)

従来法および IP 法にて抽出した DNA 溶液 100 μ l に 30 μ l の 10 mM hydroquinone と, 520 μ l の 3 M sodium bisulfite を加えて 16 時間, 50 °C に保温して二硫化した後, 反応液を CpGenome DNA Modification Kit (Intergen, Purchase NY, USA) を用いて DNA を精製し PCR の材料とした。メチル化 p16 遺伝子に特異的な primer を用いて

PCRを行い²⁾, cell lysate 希釈液におけるメチル化 p16 遺伝子の検出限界, および大腸癌患者血清におけるメチル化 p16 遺伝子の検出感度, 特異度を比較検討した.

統計学的解析

従来法と IP 法によるメチル化 p16 遺伝子検出率の比較に関する統計学的解析方法として, one-sided McNemar test を用いた.

成 績

cell lysate からの p16 遺伝子およびメチル化 p16 遺伝子の検出

連続的に希釈した cell lysate を用いて PCR を行い p16 遺伝子の検出限界を検討した. その結果, 従来法では総 DNA 量 50 pg (0.25 pg/ μ l) の cell lysate 希釈液が p16 遺伝子の検出限界であった. 一方, IP 法を用いた場合, 総 DNA 量 5 pg (0.025 pg/ μ l) の cell lysate 希釈液まで p16 遺伝子を検出することが可能であった. また, 定量的 PCR にて cell lysate からの p16 遺伝子の抽出量を比較した結果, IP 法を用いた場合の p16 遺伝子の抽出量は, 従来法を用いた場合の 16.0 倍であった.

次に, cell lysate を用いて従来法および IP 法によるメチル化 p16 遺伝子の検出限界について検討した. 従来法では総 DNA 1 ng を含む cell lysate でメチル化 p16 遺伝子を検出することができたが, IP 法を用いた場合, 100 pg の総 DNA を含む cell lysate までメチル化 p16 遺伝子の検出が可能であった. すなわち, IP 法では従来法に比べ 10 分の 1 の総 DNA 量に希釈した cell lysate からメチル化 p16 遺伝子の検出が可能であった.

大腸癌組織および血清中のメチル化 p16 遺伝子の検出

大腸癌切除組織 51 病変中 27 病変 (53 %) でメチル化 p16 遺伝子が検出された. この 27 症例の患者血清を用いて従来法と IP 法とのメチル化 p16 遺伝子の検出感度を比較したところ, 従来法では 16 例 (59 %) で検出可能であったのに対し, IP 法では 22 例 (81 %) であり, IP 法を用いることで検出感度は有意に高率であった. なお, 従来法で検出された例は全て IP 法でも検出可能であった. 一方, 切除組織でメチル化 p16 遺伝子が検出されなかった 24 病変については, 従来法, IP 法ともに血清からのメチル化遺伝子は検出されなかった. また, 大腸癌 51 症例全体でみると, 従来法の検出感度は 31 % で以前の報告 (27 %) とほぼ同様であったが²⁾, IP 法では 43 % と有意に高率であった ($p < 0.05$).

大腸癌切除組織でメチル化 p16 遺伝子が検出された 27 病変について, 病期別に分けて検討した. Stage I 症例では従来法が 33 %, IP 法が 50 % で統計的有意差は無かったが, stage II 症例においては, 従来法では 45 % であったのに対し, IP 法では 91 % (2 倍) と高率であった ($p < 0.05$). Stage III 症例の検出感度は従来法, IP 法ともに 75 %, stage IV 症例ではともに 100 % であった.

大腸腺腫症例 (10 例) および健常者 (10 例) では, 従来法, IP 法ともに血清メチル化 p16 遺伝子は検出されなかった.

考 按

抗ヒストン抗体を用いた免疫沈降法により、血清からヌクレオソーム DNA を抽出して用いる、新しいメチル化遺伝子診断法(IP-MSP 法)を開発した。大腸癌細胞株を用いた基礎的検討から、本法は従来法に比べ 10 分の 1 量の異常メチル化 DNA を検出することができる鋭敏な検出法であると考えられた。また、大腸癌症例において、本法による血清メチル化 p16 遺伝子の検出感度(43 %)は、従来法のそれ (31 %)の 1.4 倍に向上した。

メチル化 DNA は高率にヒストンの脱アセチル化をとまなうことから、我々は血清中の癌由来のメチル化遺伝子はヒストンと強く結合してヌクレオソームの状態を保持したまま存在すると推測し、抗ヒストン抗体を用いて免疫沈降することで、メチル化 DNA を含んだヌクレオソームが選択的に抽出されるという仮説をたてこの研究を行った。

まず、大腸癌細胞から作製した cell lysate および大腸癌患者血清を用いて、IP-MSP 法の有用性を明らかにした。Methylation-specific PCR を行うには 1 ng 以上の genomic DNA あるいは 0.1 %以上のメチル化 DNA が必要とされており、従来の方法による血清メチル化遺伝子診断の感度が低い原因は、抽出した異常メチル化遺伝子の量が少ないことに起因すると考えられる³⁾。本研究の結果から、IP-MSP 法は十分なメチル化遺伝子を抽出できることが証明された。また、免疫沈降を行うことで、PCR 反応を阻害する短い DNA 断片を排除できたことも IP-MSP 法の検出感度を高める要因となった可能性がある。

次に、この方法を用いて、実際の臨床応用の可能性について、大腸癌症例で検討を行った。その結果、最も重要な点は、IP-MSP 法を用いることで、転移のない stage II 症例の 91 %で P16 メチル化遺伝子が検出でき、従来法と比較して、有意に高い感度が得られたことである。すなわち、この方法を用いることで、Stage II という完全治癒切除が可能な早い病期の大腸癌に対して、高い検出感度が得られたことになる。その上、大腸腺種症例や健常ボランティアでは異常メチル化 p16 遺伝子は検出されず、従来法と同様に非常に高い特異性を持つことが示された。従って、高い特異性を失うことなく、検出感度を向上させる IP-MSP 法を用いることで、血清遺伝子診断の臨床応用が可能になると考えられた。また、これらの結果は、p16 遺伝子を標的とした IP-MSP 法が、より高率にメチル化をおこす前立腺癌など他の癌の血清診断に応用可能なことが考えられた。また、潰瘍性大腸炎に認められる dysplasia や癌では、p16 遺伝子のメチル化が通常大腸癌に比べて高頻度であることが報告されていることから、潰瘍性大腸炎合併大腸癌のサーベイランス法としても応用可能であると考えられる。

今回の実験では、我々は大腸癌患者の血清における p16 メチル化遺伝子に注目した。一方、最近になって、E-カドヘリンや hMLH1 などの遺伝子が大腸癌において比較的高い頻度でメチル化されていることが知られており、このような癌特異的なメチル化遺伝子を標的として組み合わせることで IP-MSP 法の検出感度はさらに向上すると考えられる。そのうえ、本法は、血清のみではなく、尿や便、胆汁、膵液などその他の材料からもメチル化遺伝子を検出するのにこの方法を使用することができる。すなわち、大腸癌に限らず、その他の悪性腫瘍についても、それぞれメチル化の頻度が高い遺伝子を標的として組み合わせることで、癌のスクリーニング法として、あるいは治療効果判定や再発の診断法として有力な検査法となることが示唆された。

結 論

1) 本研究に用いた IP-MSP 法は、大腸癌細胞より抽出した DNA を用いた実験で、従来の方法に比較し約 10 倍の p16 遺伝子メチル化を検出する感度を有していた。

2) 組織中に p16 遺伝子メチル化を有する大腸癌症例の血清を用いた解析で, IP-MSP 法は 81 %の症例の遺伝子メチル化を血清診断可能であった. 従来法に比較し 1.4 倍の感度を有していた.

3) この感度の増加は, 主に stage II 症例における検出感度の増加によってもたらされていた.

これらの結果から IP-MSP 法(抗ヒストン抗体による免疫沈降を併用した MSP 法)は血清の中の癌抑制遺伝子のメチル化を検出するのに優れており, 癌の発見診断や腫瘍再発の有無を調べるための血液診断の新たな方法となる可能性があると結論した.




引用文献

- 1) Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62: 503-14, 1990.
- 2) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 9821-9826, 1996.
- 3) Zou HZ, Yu BM, Wang JYS, Cang H, Gao F, Li DH, Zhao R, Feng GG, Yi J. detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 8: 188-191, 2002.

参考論文

- 1) 斉藤祐輔, 渡二郎, 横田欽一, 藤谷幹浩, 岡本耕太郎, 稲場勇平, 坂本淳, 伊藤貴博, 前本篤男, 綾部時芳, 蘆田知史, 泉信一, 野村昌史, 高後裕. 上部消化管の炎症性疾患における X線検査の有用性. *胃と腸* 38; 947-960, 2003.
- 2) 藤谷幹浩, 斉藤祐輔, 渡二郎, 坂本淳, 伊藤貴博, 柴田直美, 三好恭子, 岡本耕太郎, 前本篤男, 安田淳美, 綾部時芳, 蘆田知史, 太田智之, 村上雅則, 折居裕, 高後裕. Ip・Isp型大腸癌の深達度診断—超音波内視鏡を中心として—. *胃と腸* 37; 1601- 1609, 2002.

学位論文の審査結果の要旨

| | | | |
|--|---------|-----|-------|
| 報告番号 | 第 号 | | |
| 学位の種類 | 博士 (医学) | 氏 名 | 坂 本 淳 |
| <p>審査委員長 <u>伊藤喜久</u> </p> <p>審査委員 <u>高後 裕</u> </p> <p>審査委員 <u>立野 正敏</u> </p> | | | |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> <p style="margin-top: 20px;">Augmentation of the sensitivity of serum screening for the p16 heypermenthylation of colon cancer, by immuno-precipitation of nucleosomal DNA (ヌクレオソームDNA免疫沈降法を用いた、大 腸癌における血清メチル化p16遺伝子の高感度検出法に関する研究)</p> | | | |
| <p>p16INK4a (以下, p16) はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の1つである。大腸癌を始め種々の原発性悪性腫瘍、癌細胞株において失活しており、癌抑制遺伝子として機能すると考えられている。この機序は、p16遺伝子プロモーター領域のCpGアイランドの過剰メチル化による遺伝子転写抑制に基づく。すなわち、この領域のメチル化結合蛋白群 (methyl binding proteins: MBPs) が、ヒストン脱アセチル化酵素群をリクルートしてヒストンを脱アセチル化し、この結果、ヒストンはDNAに強く結合し、近傍のクロマチン (遺伝子) を転写抑制状態にすると考えられる。</p> <p>近年癌診断の1つとして、血液中に遊離した癌遺伝子の変異・メチル化を同定する試みがおこなわれているが、異常遺伝子の回収、抽出等の問題から、特異性、検出能などに多くの問題が残されている。</p> | | | |

申請者はこれまでの研究報告から、メチル化p16遺伝子は脱アセチル化されたヒストンと強く結合し血中に存在していると推測し、抗ヒストン抗体を用いた免疫沈降法（IP法）とMethylation specific PCR（MSP）法とを組み合わせた癌遺伝子診断法を考案し、大腸癌をモデルに血清、組織中のメチル化p16遺伝子について本診断法の有用性を検索した。

メチル化p16遺伝子を含む大腸癌細胞株（SKCO-1）DNAを正常血清に添加しMSPの検出感度を検討した。従来法により抽出したDNAでは検出限界が1 ngに対し、IP法では100 pgと、メチル化p16遺伝子の検出感度が約10倍上昇する結果を得た。

パラフィン包埋大腸癌切除組織、その同一患者対応血清を用いて、実サンプルによる検証を進めた。対照として健常者、大腸腺腫を用いた。大腸癌組織では51例中 27例で検出され、この陽性症例の血清で従来法では16例が陽性であったのに対しIP法では22例と、より高感度に血清メチル化p16遺伝子が検出された。さらに病期別ではstage II症例においてメチル化陽性例が従来法5例（33.3%）からIP法10例（66.6%）と検出率が2倍に増加し

（ $p < 0.05$ ）、検出感度の増加を実証した。これに対して、組織内メチル化p16遺伝子陰性の大腸癌24例では、従来法・IP法いずれも血清中に検出されなかった。また、健常者10例、大腸腺腫10例でも同様に検出されなかった。

抗ヒストン抗体を用いた免疫沈降法により、高い回収率でDNAを得て、Methylation specific PCRを行うことにより、従来法に比べ高感度にターゲットとする遺伝子の特異的に検出できる癌検査診断法が、申請者により新たに確立された。治癒可能な早期段階での検出率の向上により、早期発見治療への道がさらに開かれた意義は極めて高い。今後、血清も含め種々の体液中における、悪性腫瘍の病態診断、治療フォロー、予後の推定になど、臨床的有用性の拡大が期待される。

発表後、研究解析法、解釈、また関連領域について質疑を行い適切かつ明快な回答が得られ、本学の博士を授与するのにふさわしい知識・見識を有すると考え、全員一致で合格と判断した。