

氏名	栗田 聡
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博(医)第1721号
学位授与の日付	平成20年1月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Progression of hypermethylation of the p16 ^{INK4A} gene from normal liver to non-tumorous liver and hepatocellular carcinoma-An evaluation using quantitative PCR analysis (正常肝から肝細胞癌の背景肝, 肝細胞癌への進展に伴うp16遺伝子のメチル化の進行について一定量PCRによる評価)
論文審査委員	主査 教授 木南 凌 副査 教授 青柳 豊 副査 教授 味岡 洋一

博士論文の要旨

【背景と目的】

p16(INK4a)はCDK / cyclin 複合体に作用し、cell cycle のG1→S1期の進行を制御する癌抑制遺伝子として知られている。このp16遺伝子のメチル化は多くの癌で認められ、肝細胞癌でも35~72.7%に認められると報告されている。しかし、肝細胞癌を発生した背景肝においてこのp16遺伝子のメチル化を検討した論文は少なく、また、定量的に評価した論文はほとんど無い。本研究の目的はこれら肝細胞癌の高危険群である慢性肝疾患におけるp16遺伝子プロモーター領域のCpG islandのメチル化の程度を定量 real-time PCR を用い定量化し、正常肝のそれと比較することでこれが肝細胞癌の発生母地としての肝高発癌状態のマーカーとなりうるか検討することである。

【対象および方法】

肝細胞癌 28 例、それに対応した癌背景肝 29 例、慢性ウイルス性肝炎組織 10 例、正常肝 12 例を対象とし、以下の方法を用いて p16 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を解析した。①定量 Real-time methylation specific PCR(以下 Real-time MS-PCR) : 各組織から抽出した DNA を bisulfite 処理した後、メチル化されたまたはメチル化されない p16 遺伝子領域に各々特異的なプライマーを用い real-time PCR を施行した。この際、SYBR Green I を用いたインターカラー

ター法と、TaqMan プローブ法の 2 種法を施行した。各々の方法において既知濃度の Control template との比較からメチル化の程度を定量化し、メチル化 index(methyl/methyl+unmethyl : 以下 MI と略)を算出することで p16 のメチル化程度の数値的指標とした。②bisulfite sequencing : メチル化に関係ない部位のプライマーを用い PCR を行った後、その産物をクローニングし、その複数のクローンを解析することでメチル化されている CG site の数、部位を解析した。③ RT-PCR : p16mRNA の発現量を定量 PCR を用いて測定し、p16 遺伝子のメチル化との相関を比較検討した。

【結果】

1. メチル化頻度および methylation index(MI)

メチル化頻度の解析では SYBR 法で肝細胞癌 71%、癌背景肝 55%、正常肝 33% のメチル化を認めた。また TaqMan プローブ法では各々 64%、28%、0% のメチル化を認め、これら組織間で有意差を認めた($p < 0.01$)。また MI の解析では SYBR 法で肝細胞癌 6.121、癌背景肝 0.437、正常肝 0.027、TaqMan プローブ法で各々 15.000、1.759、0 であり両方法において組織間に有意差を認めた(ともに $p < 0.01$)。

SYBR 法と TaqMan プローブ法ではメチル化頻度、メチル化指数に差を認めた。これは SYBR 法が両端のプライマーのみに存在するメチル化、非メチル化 CG site を反映しているのに対し、TaqMan プローブ法ではプライマーおよびプローブ双方に存在するメチル化、非メチル化 CG site を反映しており、よりアニーリングの条件が厳しいためと考えられた。従って SYBR 法は感度に勝り、TaqMan プローブ法は特異度に勝る測定法であると考えられた。

肝細胞癌では stage が進行するほど、また癌背景肝では線維化の進行した群においてメチル化頻度および MI の高い傾向を認めたが、有意差を認めなかった。

etiology 別の検討では TaqMan プローブ法において、B 型、及び非 B 非 C 型に比して C 型肝炎ウイルス感染を背景とした肝細胞癌で各々メチル化頻度および MI が有意に高値であった($p=0.024, p=0.037$)。

2. bisulfite sequencing の結果

肝細胞癌ではほとんどの CG site でメチル化を認めたのに対し、癌背景肝、正常肝では 10 ヶ所の CG site を含む 10 クローンのうち各々 1 ヶ所、2 ヶ所の CG site のみメチル化を認め、両者において差を認めなかった。

3. real-time RT-PCR の結果

癌背景肝、正常肝における p16mRNA の発現を調べた結果、両組織間において有意差を認めなかった。

【考察と結論】

定量的 Real-time MS-PCR で正常肝、癌背景肝、肝細胞癌の順に p16 のメチル化頻度、及び MI の増加を認めた。従って、肝発癌の背景肝では正常肝に比して p16 のメチル化の程度が上昇しており、いわゆる高発癌状態に関係している可能性があることがわかった。しかし癌背景肝、正常肝における bisulfite sequencing を用いた比較では p16 のメチル化の頻度に差がなく、これらにおける p16 のメチル化された細胞数の違いはごくわずかであると推測された。また、p16mRNA の発現レベルはほとんど差がなくこの結果を反映していると考えられた。

一方、肝細胞癌ではより stage の進行した群で p16 のメチル化頻度および MI が高く、今後この MI を指標とした腫瘍進展度や予後予測に有用な情報を与えてくれるものと期待したい。また上述の如く、癌背景肝、慢性肝炎などの前癌病変の状態においては正常肝に比して、p16 CpG island に部分的メチル化頻度の亢進を認めるが、増加している細胞はごくわずかであり、従って慢性肝炎の p16 CpG island のメチル化と肝発癌の関係については今後更なる検討が必要であると考えられた。

(論文審査の要旨)

慢性肝疾患は肝細胞癌の高危険群である。そこで申請者らは、p16 がん抑制遺伝子プロモーター領域の CpG island のメチル化が慢性肝疾患肝では正常肝と比べ、亢進しているかどうかを検討した。すなわち、このメチル化の程度の比較評価が肝高発癌状態のマーカーとなりうるかどうかを検討している。その方法として、定量 real-time PCR 及び bisulfite sequencing を用いた。

結果：p16 メチル化の頻度は正常肝に比し癌背景肝で有意に高く、またメチル化の定量を反映するメチル化指数も組織間に有意差を認めた。しかし、bisulfite sequencing では、多くの CG site でメチル化を認めた肝細胞癌に対し、癌背景肝、正常肝ではごく少数の CG site のみメチル化を認め、両者において有意差は認められなかった。同様に real-time RT-PCR でも、癌背景肝、正常肝における p16mRNA の発現に有意差を認められなかった。

以上の結果から申請者は以下のような推論を行なっている。肝癌背景肝では正常肝に比し p16 遺伝子のメチル化の程度が上昇しており、高発癌状態に関係している可能性があることがわかった。しかし、メチル化された細胞数はごくわずかであり、慢性肝炎の p16-CpG island のメチル化と肝発癌の関係については更なる研究が必要であると考えている。この点に学位論文としての価値を認めた。