

論文要旨

p16^{INK4a} and p14^{ARF} methylation as a potential biomarker for human bladder cancer

膀胱癌におけるバイオマーカーとしての p16^{INK4a} ならびに p14^{ARF} のメチル化の検討

川元 健

【序論および目的】

膀胱癌はしばしば多発し、再発を繰り返すこと（多中心性発生）が特徴である。初発患者の70-80%は組織学的深達度がTaまたはT1の表在癌であり、残りの患者はT2-T4の浸潤癌である。表在性膀胱癌の患者のうち約70%は2年以内に再発し、そのうちの1/3は異型度または深達度が進行する。形態が似た腫瘍であっても経過は異なり、現状ではどの患者が再発を起こし予後不良となるかを予測することは困難である。

細胞周期は癌の本質に関わっていると考えられており、細胞周期調節遺伝子の変化は腫瘍の再発や進行における有用な予測因子になりえる可能性がある。膀胱癌における細胞周期の調節因子としてはp16^{INK4a}、p14^{ARF}、MDM2、p53、p21、pRB、cdk4、cyclin D1などRB経路またはp53経路に関与するものが知られている。これらの中でp16^{INK4a}とp14^{ARF}はともに9番染色体短腕のp16^{INK4a}/p14^{ARF}遺伝子座にコードされ、エクソン2とエクソン3が共通な癌抑制遺伝子である。

DNAのプロモーター領域のメチル化は癌抑制遺伝子における不活化のメカニズムの一つであり、膀胱癌を含む多くの癌細胞で認められている。今回我々はp16^{INK4a}とp14^{ARF}のプロモーター領域のメチル化を検討し、メチル化と臨床病理学的因子との関係を解析した。さらにp16^{INK4a}とp14^{ARF}のメチル化が膀胱癌の進行と予後に関係するか検討を行った。

【材料および方法】

1997年3月から2002年12月までに経尿道的膀胱腫瘍切除術もしくは膀胱全摘除術を施行された45例の患者から得られた64検体を用いた。45例のうち8例は再発のなかった患者、19例は再発の認められた患者、18例は初回診断時に浸潤性膀胱癌と診断され、膀胱全摘除術を施行された患者であった。再発を起こした18例では初発時と再発時の検体を使用した。DNAはホルマリン固定を行ったパラフィン包埋から抽出した。10 μ mの厚さでスライドを作成し、HE染色したスライドを参考に癌の部分のみを顕微鏡下に採取した。1検体あたり15枚のスライドを使用し、QIAamp DNA Mini Kitを用いてDNAの抽出を行った。1 μ gのDNAをバイサルファイト処理して得られたDNAを用いてMethylation-specific PCR(MSP)法とBisulfite-sequencing法でメチル化の状態を検討した。

論文要旨

【結果】

45例におけるメチル化の頻度は p16^{INK4a} では 17.8% (8/45), p14^{ARF} では 31.1% (14/45) であった. p16^{INK4a} のメチル化の頻度は表在癌の 3.8% (1/26) に比べ浸潤癌では 36.8% (7/19) と有意に高かった. p14^{ARF} のメチル化も表在癌で 11.5% (3/26), 浸潤癌で 58.0% (11/19) と同様な結果であった. 今回の観察期間内に再発のなかった表在癌の患者においては p16^{INK4a}, p14^{ARF} いずれもメチル化は認めなかった. 膀胱全摘除術を受けた 22 例のうち 36.4% で p16^{INK4a} のメチル化が認められたが, 膀胱全摘除術を受けなかった 23 例ではメチル化は認められず, メチル化の有無と膀胱全摘除術の施行とは有意な相関がみられた. 一方, p14^{ARF} のメチル化は膀胱全摘除術を受けた患者の 45.5% (10/22), 膀胱全摘除術を受けなかった患者の 17.4% (4/23) で認められ, p14^{ARF} のメチル化と治療結果も相関する傾向がみられた. 再発が認められた 19 例におけるメチル化の状態は初発時と再発時において変化はなかった. 術後生存期間と p14^{ARF} のメチル化には有意な相関が認められた.

【結論及び考察】

p16^{INK4a} はサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質 (cyclin-dependent kinase inhibitor) であり Rb 経路の上流で機能し, 細胞を G1 期に止めることに関与する. 一方, p14^{ARF} は MDM2 に特異的に結合することにより MDM2 と p53 を安定化させ, p53 経路を介するアポトーシスにおいて重要な役割を担っている. これらの遺伝子は common reading frame を有しており, このような独自の構成は Rb 経路や p53 経路のバランスを保つために重要なのではないかと考えられている. これまでの報告によると膀胱癌患者において p16^{INK4a} は 15-18%, p14^{ARF} は 35-56% にメチル化があったとの報告がある. 今回の我々の検討ではメチル化の頻度はそれぞれ 18% と 31% であった. これらのことより p14^{ARF} のメチル化は p16^{INK4a} のメチル化より常に多い頻度で認められていることがわかる.

膀胱癌の再発は癌抑制遺伝子などの genetic または epigenetic な変化の集積に起因すると考えられている. 我々の検討では 19 例の初発時と再発時のメチル化の頻度は同等であった. このことは p16^{INK4a} と p14^{ARF} のメチル化は膀胱癌の形成において初期に起こっていることを示唆している. また表在性膀胱癌に比べ, 浸潤性膀胱癌では p16^{INK4a} と p14^{ARF} のメチル化の頻度が高いことを見出した. 同時に 8 例の表在性, 非再発性膀胱癌患者において p16^{INK4a} と p14^{ARF} のメチル化が認められなかったということは興味深い. 膀胱全摘除術が施行された 22 例における p16^{INK4a} のメチル化の頻度は膀胱全摘除術が施行されなかった 23 例に比べ有意に高かった. これらは p16^{INK4a} と p14^{ARF} のメチル化を有する膀胱癌はより悪性度の高い表現型であるということを示唆している. さらに p14^{ARF} のメチル化は術後生存期間と有意な相関があり, p16^{INK4a} も同様な傾向が認められた.

我々は膀胱癌の組織学的深達度や予後と p16^{INK4a}, p14^{ARF} のメチル化が関係することを初めて報告した. これらの遺伝子におけるメチル化の有無が膀胱癌の予後予測マーカーとなり得る可能性が示唆された.

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1455 号	氏名	川元 健
審査委員	主査	秋山 伸一	
	副査	米澤 傑	有馬 直道

p16^{INK4a} and p14^{ARF} methylation as a potential biomarker for human bladder cancer

(膀胱癌におけるバイオマーカーとしての p16^{INK4a} ならびに p14^{ARF} のメチル化の検討)

Biochemical and biophysical research communications 339(3):790-6,2006

癌化のメカニズムとしては従来、突然変異や欠失などによるがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活化が知られてきた。近年、これらジェネティックな変化に加え、DNA のメチル化に代表されるエピジェネティックな変化も重要であるといわれてきている。

今回著者らは細胞周期調節に関与するがん抑制遺伝子である p16^{INK4a} と p14^{ARF} のプロモーター領域のメチル化を解析し、これらのメチル化と臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。45 例、64 検体の膀胱癌患者を対象とし、ホルマリン固定を行ったパラフィン包埋検体から DNA を抽出。得られた DNA を用いて bisulfite 処理を行い、Methylation-specific PCR (MSP) 法と Bisulfite-sequencing 法によりメチル化の状態を確認した。

45 例におけるメチル化の頻度は p16^{INK4a} で 17.8%、p14^{ARF} で 31.1% であった。深達度別のメチル化の頻度は p16^{INK4a} では表在癌 3.8%、浸潤癌 36.8%、p14^{ARF} では表在癌 11.5%、浸潤癌 58.0% であり、両遺伝子とも浸潤癌において有意にメチル化の頻度が高い結果であった。今回の観察期間内に再発のなかった 8 例の表在癌の患者では p16^{INK4a}、p14^{ARF} のいずれにもメチル化は認められなかった。再発を起こした 19 例におけるメチル化の状態は初発時と再発時において変化はなく、p16^{INK4a} と p14^{ARF} のメチル化は膀胱癌の形成の初期に起こっていることが示唆された。膀胱全摘除術が施行された 22 例において p16^{INK4a} のメチル化を 36.4% に認めたが、膀胱全摘除術が施行されなかった 23 例ではメチル化は全く認められず、メチル化の有無と膀胱全摘除術の施行とは有意な相関がみられた。さらに p14^{ARF} のメチル化は術後生存期間と有意な相関があり、p16^{INK4a} も同様の傾向が認められた。

本論文は膀胱癌における p16^{INK4a}、p14^{ARF} のプロモーター領域のメチル化と臨床病理学的因子との関連を検討し、特に深達度に関しては両遺伝子のメチル化が、術後生存期間に対しては p14^{ARF} のメチル化が関与していることを明らかにしたもので臨床的にも意義深いものと考えられる。本研究によりこれらの遺伝子におけるメチル化の有無が膀胱癌の予後予測マーカーとなり得る可能性を示しており、今後の研究の発展が期待される。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1455 号	氏名	川元 健
審査委員	主 査	秋山 伸一	
	副 査	米澤 傑	有馬 直道

主査および副査の3名は、平成20年2月4日、学位請求者 川元 健 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- 質問 1) 同じ表在性膀胱癌であっても有茎性の膀胱癌と CIS とでは予後が異なる。表在性膀胱癌において腫瘍の形態によりメチル化の状態に違いがあるか否かということは検討していないのか？
 (回答) 今回の対象症例では CIS 例は除外しており検討は行っていない。ただご指摘のように臨床像を考えるとメチル化の状態に差がある可能性は考えられる。今後の検討としたい。
- 質問 2) Methylation specific PCR (以下 MSP) の結果においてメチル化と非メチル化の両方のバンドが出ている原因としては組織採取に laser capture microdissection (以下 LCM) を用いていないことによる正常間質細胞などの混入に起因すると考えられるのか？
 (回答) その通りと思われる。LCM を行い癌組織のみ採取できたならメチル化のみまたは非メチル化のみのバンドとなった可能性はあると考えられ、今後、同様の実験を行う際には可能なら LCM を用いた DNA 抽出を行いたい。ただし正常検体ではメチル化陰性と考えられるため実験系としては妥当と思われる。
- 質問 3) それぞれの遺伝子におけるメチル化の有無による術後生存率の比較を行っているが、対象となった症例における腫瘍の深達度は考慮されていない。深達度が同じ場合にメチル化の有無により術後生存率を検討した場合、違う結果が出る可能性はないか？
 (回答) ご指摘の通りであり、今後の課題としたい。
- 質問 4) 尿を使った検体でのメチル化の検討は行っていないのか？
 (回答) 尿を検体として用いたメチル化の有無が膀胱癌の診断に役立ったという報告例がある。当教室でも尿から採取した DNA でメチル化を確認しようとしたが、尿中微量 DNA からでは検出感度が低くメチル化の確認が難しかった。
- 質問 5) RB や p53 などの免疫組織染色の結果と今回調べた遺伝子のメチル化の状態との関連などは調べていないのか？
 (回答) 今回の実験では免疫組織染色は行っていない。大変興味深い観点であり今後の検討としたい。
- 質問 6) DNA のメチル化のみならずヒストンの変化に伴うエピジェネティックな変化の報告は膀胱癌の領域であるのか？
 (回答) 膀胱癌においても他領域の癌のように、遺伝子によっては DNA のメチル化とともにヒストンの脱アセチル化ががん抑制遺伝子の不活化に関与しているという報告はある。
- 質問 7) メチル化が起こるには何らかの酵素が関与しているのか？
 (回答) DNA のメチル化は DNA メチルトランスフェラーゼによって触媒されている。
- 質問 8) DNA のメチル化は可逆的な反応か？
 (回答) 癌に関する研究では「可逆的な反応」とされる。
- 質問 9) がん細胞でメチル化が起こっている場合も薬剤を用いて非メチル化にするのは可能か？
 (回答) DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤として 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) などがある。Cell line を用いた実験でこれらの薬剤を作用させることにより、メチル化した状態のがん抑制遺伝子が脱メチル化され、発現が回復する現象は膀胱癌においても報告されている。また海外においては血液癌における脱メチル化剤の臨床治験で有望な成績が得られている。

- 質問 10) p16^{INK4a} (以下 p16)、p14^{ARF} (以下 p14) のタンパクレベルでの発現はどうだったか？
(回答) 残念ながら本実験では確認していない。しかし免疫組織染色を用いて正常膀胱組織では p16 の発現がみられたが、メチル化を有する膀胱癌では p16 の発現がみられなかったという報告があり (参照文献 7)、p14 においても同様の結果となる可能性が考えられる。
- 質問 11) 多くの腫瘍における癌化のメカニズムとして変異などの関連も指摘されているが、膀胱癌においてもそのような報告はあるのか？
(回答) p53 遺伝子の存在する第 17 番染色体の欠失・変異が膀胱癌の発生と進展に関与している報告などあり、欠失や変異などの報告は膀胱癌においても多くみられる。
- 質問 12) partial methylation とは 2 対の遺伝子の片方がメチル化を起こして、片方がメチル化を起こしていないということか？
(回答) 今回の DNA 採取においては癌細胞のみではなく周囲の間質細胞も混入した可能性が高い。癌細胞はメチル化の状態であったが、周囲の間質細胞が非メチル化の状態であったことが、MSP で partial methylation がみられた原因と考えられる。
- 質問 13) p14 の方が術後の予後と関連しており p16 は関連がみられないという結果であったが、この原因としてはどういったものが考えられるか？
(回答) p16 は RB 経路に、p14 は p53 経路に関連した遺伝子である。膀胱癌においては p53 に関連した変化が数多く報告されており、一つの可能性としては膀胱癌の進展においては RB 経路より p53 経路のほうが重要な役割を担っている可能性が考えられる。
- 質問 14) MSP によるメチル化の結果をメチル化、非メチル化と分類しているが、両方ともバンドが出ている場合にはどちらに分類するのか？
(回答) 本実験ではメチル化と判断した。
- 質問 15) 非常に薄いバンドがメチル化のほうに出ているとしても、メチル化ありと判断したのか？
(回答) メチル化の判定は MSP とともにシークエンスで確認した。ご指摘のような MSP の結果の場合、シークエンスでメチル化がみられた場合にはメチル化ありと判定した。
- 質問 16) MSP においてメチル化のバンドが非常に薄い場合にはタンパクレベルにおいては発現している可能性があると思われる。そのため、非常にバンドの薄いもの場合には判断が難しいと思われる。
(回答) ご指摘のとおりだと考える。タンパクレベルでの確認が必要と思われ、今後の課題としたい。
- 質問 17) MSP とシークエンスの利点・欠点としてはどういうものが考えられるか？
(回答) MSP は簡便に多数の検体を確認でき、結果を早めに確認できる利点があるが、データの信憑性はシークエンスより低いと考える。シークエンスは MSP に比べると煩雑であり、結果を得るまで時間がかかる。コストもシークエンスの方が高い。しかしながらデータの信憑性は MSP より高く、現状では MSP とシークエンスはメチル化を確認するための相補的な実験方法と思われる。
- 質問 18) p16、p14 のメチル化が高い癌細胞においては他のがん抑制遺伝子のメチル化も高い可能性があると思われるが、p27 など多くの癌で発現が低下しているような他の遺伝子に関しては調べていないのか？
(回答) 今回の実験では p53 経路に関与する ATM 遺伝子についても調べたが、癌とメチル化の間に相関がなく今回の報告では述べていない。ただご指摘のように膀胱癌においてもその他の癌同様に多くのがん抑制遺伝子の発現低下にメチル化が関与しているという報告がある。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。