

平成22年2月

## 三宅孝典 学位論文審査要旨

主 査 林 一 彦  
副主査 村 脇 義 和  
同 池 口 正 英

### 主論文

Expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1, 3a and 3b proteins in human hepatocellular carcinoma

(ヒト肝細胞癌におけるDNAメチルトランスフェラーゼ1, 3a, 3b蛋白の発現)

(著者：三宅孝典、遠藤財範、本城総一郎、広岡保明、池口正英)

平成22年 Yonago Acta medica 掲載予定

### 参考論文

1. Free jejunal graft reconstruction after resection of neck cancers: Our surgical technique

(頸部癌切除後の遊離空腸再建術：我々の手術手技)

(著者：池口正英、三宅孝典、松永知之、山本学、福本陽二、山田敬教、福田健治、齋藤博昭、建部茂、辻谷俊一)

平成21年 Surgery Today 第39巻 925頁～928頁

# 学 位 論 文 要 旨

## Expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1, 3a and 3b proteins in human hepatocellular carcinoma

(ヒト肝細胞癌におけるDNAメチルトランスフェラーゼ1, 3a, 3b蛋白の発現)

DNAメチル化は遺伝子発現の調節に重要な役割を果たしており、プロモーター領域CpGアイランドの異常な高メチル化によって遺伝子のサイレンシングがヒトの癌において高頻度に起きている事が知られている。DNAメチルトランスフェラーゼ (DNMT) はプロモーターCpGアイランドにメチル化を起し、多くの癌抑制遺伝子がプロモーターCpGアイランドのメチル化により、サイレンシングされている。DNMTは3つの異なったファミリーがコードされており、DNMT1はメチル化の維持、DNMT3a, 3bはメチル化を形成することが知られている。DNMT2の機能に関してはまだ分かっていない。3つのDNMTが相互作用することでDNAメチル化の維持や再メチル化の機構となっていると考えられてきている。肝細胞癌においてもCpGアイランドの異常な高メチル化と、多くの癌抑制遺伝子がサイレンシングされている事が報告されている。本研究では、ヒト肝細胞癌においてDNMT1, 3a, 3bの異常な蛋白発現の意義を調べるために、DNMT蛋白発現と肝細胞癌の臨床病理学的因子および患者予後との関連性を検討した。

## 方 法

1989年から2002年までに研究室で得た肝細胞癌患者95人を対象とした。切除標本の腫瘍部のパラフィン包埋切片を作製し、抗DNMT1, 3a, 3b抗体を一次抗体として免疫組織染色を行った。核の染色強度を4段階 (0 : 陰性、1 : 軽度、2 : 中等度、3 : 強度) に、陽性細胞の比率を5段階 (0 : 陰性、1 : 10%以下、2 : 10%以上33%以下、3 : 33%以上、66%以下、4 : 66%以上) にスコア化して加算したものを4つのグレード (- : 0、1+ : 1、2、2+ : 3-5、3+ : 6、7) に分けた。3種のDNMT蛋白発現と肝細胞癌の臨床病理学的因子との関連を検討した。また、患者予後との関連に関してはDNMT蛋白発現が2+以上のものを陽性 (過剰発現群)、1+以下のものを陰性として検討した。さらに3つのDNMTの関連と患者予後を検討するため、DNMT1が陽性でDNMT3a, 3bが陰性の群、DNMT1が陽性でDNMT3a, 3bどちらかが陽性の群、DNMT1が陽性で3a, 3bどちらとも陽性の群の3群に分けて検討した。

## 結 果

核における DNMT 蛋白発現は肝細胞癌組織内で認められ、非癌部肝組織および正常肝組織では認めなかった。3つの DNMT 蛋白発現と腫瘍の分化度、肝内転移との間に有意な関連性が認められた(共に  $P < 0.05$ )。DNMT3a 蛋白発現は、門脈浸潤とも有意な関連性を認めた ( $P < 0.05$ )。一方、DNMT 蛋白発現は年齢、性別、腫瘍径、被膜浸潤などとは有意な関連性を認めなかった。術後フォローアップ期間は、平均 63.7 ヶ月であった。DNMT1 蛋白過剰発現群では陰性群に対して予後不良の傾向はあるものの有意差は認めなかった ( $P = 0.1038$ )。DNMT3a, 3b 蛋白過剰発現群は陰性群に対して各々有意に予後不良であった ( $P = 0.003$ ,  $P = 0.0034$ )。さらに DNMT1, 3a, 3b すべての蛋白が過剰発現した群では予後が非常に不良であった ( $P = 0.0009$ )。

## 考 察

本研究において、肝細胞癌患者の DNMT 蛋白発現を免疫組織化学的検討を行い、腫瘍分化度や肝内転移と関連があり、DNMT3a においては門脈浸潤とも関連を認めた。また、DNMT3a, 3b 過剰発現群は肝細胞癌の予後不良因子であり、さらに DNMT1, 3a, 3b すべての蛋白が過剰発現した群ではさらに予後が不良であることが示された。このことは DNMT 蛋白発現が脈管浸潤による血行性転移に関与している可能性を示唆している。また、近年、DNMT1 と DNMT3a, 3b が協調して作用して DNA メチル化のために複合体として機能している可能性があるとの報告があり、本研究でも 3つの DNMT が協調作用している可能性が示唆された。DNA メチル化は可逆性変化として知られており、DNMT 拮抗剤が DNMT によるメチル化を阻害することが示され、悪性血液疾患などで適用されている。今回の研究で DNMT 蛋白発現と患者予後の関係が明らかになり、DNMT 蛋白過剰発現している肝細胞癌患者には将来的に DNMT 拮抗剤による治療が重要な役割を果たす可能性があることも示唆された。

## 結 論

本研究において肝細胞癌患者の DNMT 蛋白過剰発現は予後不良群の予測因子なる可能性が示唆された。さらに DNMT は新たな予後マーカーと今後の肝細胞癌治療における標的になり得る可能性も示唆された。