

氏名	なかにし ひろふみ 中西啓文
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第510号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Loss of imprinting of PEG1/MEST in lung cancer cell lines (肺癌細胞株における PEG1/MEST のゲノム刷り込みの消失)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤建三 (副査) 押村光雄 清水英治

## 学位論文の内容の要旨

ゲノム刷り込みとは、後成的 (epigenetic) な修飾による遺伝子発現の制御機構であり、父方アレルか母方アレルかによってインプリント遺伝子の発現レベルが異なる現象である。この現象は正常な胚成長や行動発達において重要な役割を担っているが、加えて、近年の報告ではゲノム刷り込み異常が腫瘍形成に関与している可能性が示唆されている。PEG1/MEST のゲノム刷り込みの消失 (LOI) は乳癌や直腸癌組織で高頻度に認められており、最近、肺腺癌組織においても高頻度にみられたことが報告された。臨床的に肺癌は、小細胞肺癌と非小細胞肺癌に大別されるが、手術検体の入手が困難な小細胞肺癌において PEG1/MEST の LOI は検討されていない。本研究では、小細胞肺癌の細胞株を含む肺癌細胞株を用いて、in vitro における PEG1/MEST の LOI の検討をおこなった。

## 方法

ヒト肺癌細胞株 50 株 (腺癌細胞株 14 株、扁平上皮癌細胞株 9 株、大細胞癌細胞株 7 株、巨細胞癌細胞株 2 株、小細胞癌細胞株 18 株) は、ダルベッコ変法イーグル培地 (非働化 10% 牛胎仔血清、100U/ml ペニシリン、100µg/ml ストレプトマイシンを含む) 中にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。ゲノム DNA は QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。総 RNA は ISOGEN (Nippon Gene) を用いて抽出した。ゲノム DNA より PEG1/MEST をプライマー 5'-CACTGATGCAGAAAGACGTTTC-3' (HP1F) および 5'-CAGCACCATTTGCTCATAGG-3' (HP1R) を用いて Polymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅し、制限酵素 AflIII で処理後、電気泳動にて 792 bp のバンドおよび 409 bp と 383 bp のバンドが同時に検出された細胞株をヘテロ接合体と判定した。これらの細胞株の総 RNA より

Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) を用いて、one-step reverse transcription-PCR (RT-PCR) を行い、RT-PCR 産物は PCR 産物と同様に制限酵素処理および泳動をおこなった。792 bp のバンドのみ、または 409 bp と 383 bp のバンドのみが検出された細胞株を片アレル発現 (ゲノム刷り込みは正常) と判定した。一方、792 bp のバンドおよび 409 bp と 383 bp のバンドが同時に検出された細胞株を両アレル発現 (ゲノム刷り込みの消失) と判定した。

## 結 果

肺癌細胞株における PEG1/MEST のゲノム DNA の多型は 50 細胞株で検討され、20 株 (40%) がヘテロ接合体、30 株 (60%) がホモ接合体であった。ヘテロ接合体の内訳は腺癌細胞株 4 株、扁平上皮癌細胞株 5 株、大細胞癌細胞株 4 株、小細胞癌細胞株 7 株であった。

続いて、ヘテロ接合体の細胞株において PEG1/MEST のアレル特異的な発現を検討した。ヘテロ接合体 20 株において 9 株 (45%) で両アレル発現がみられ、残り 11 株 (55%) は片アレル発現であった。ゲノム刷り込みの消失 (両アレル発現) を示した細胞株は、非小細胞肺癌では 13 株中 8 株 (62%) であったが、小細胞肺癌では 7 株中 1 株 (14%) と有意な頻度の違いがあった ( $P=0.043$ )。

## 考 察

原発性肺癌の多くは、組織学的に腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌に分類されるが、臨床的には、前 3 者は一括して非小細胞肺癌として扱われる。さらに、肺癌における遺伝子異常の報告は多いが、その際にも非小細胞癌と小細胞癌とに大別されることが多い。実際、種々の遺伝子異常の頻度は非小細胞癌と小細胞癌との間で大きく異なる。今回の *in vitro* の検討で、非小細胞肺癌細胞株における PEG1/MEST のゲノム刷り込みの消失は 13 株中 8 株 (62%) と比較的高頻度に検出され、非小細胞肺癌において一般的な現象であることが示唆された。各組織型では腺癌細胞株で 4 株中 3 株、扁平上皮癌細胞株で 5 株中 3 株、大細胞癌細胞株で 4 株中 2 株であった。各々のヘテロ接合体の数が少なく断定的ではないが、組織型による偏りは明らかでないと考えられた。大部分の小細胞肺癌は手術適応とならないため、組織検体の入手が困難であり、小細胞肺癌組織におけるゲノム刷り込みの消失の報告はない。したがって、本研究で小細胞肺癌細胞株を用いたゲノム刷り込みの消失の検討の意義は大きいと考えられる。小細胞癌細胞株における PEG1/MEST のゲノム刷り込みの消失は 7 株中 1 株 (14%) でみられるのみで、小細胞肺癌細胞株において PEG1/MEST のゲノム刷り込みの消失は、非小細胞肺癌細胞株と比較して低頻度であり、その病態への関与は低いと考えられた。

## 結 論

PEG1/MEST のゲノム刷り込みの消失は非小細胞癌細胞株において高頻度に見られた。このことは、非小細胞肺癌の病態に PEG1/MEST が関与する可能性を示唆する。本研究で同定された

PEG1/MEST のゲノム刷り込みの消失を有する細胞株は有用な研究材料と期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は小細胞肺癌株を含む肺癌細胞株 50 株を用いて、ゲノム DNA において PCR-RFLP 法にて PEG1/MEST について多型を示す細胞株より RNA を抽出し、同様に PCR-RFLP 法にて RNA レベルにおける PEG1/MEST のアレル特異的な発現を調べることにより、*in vitro* における PEG1/MEST の loss of imprinting (LOI) の頻度を検討したものである。その結果、PEG1/MEST の LOI は非小細胞肺癌では 13 株中 8 株 (62%) であったが、小細胞肺癌では 7 株中 1 株 (14%) と有意な頻度の差がみられた ( $P=0.043$ )。本論文の内容は、非小細胞肺癌の病態に PEG1/MEST が関与する可能性を示唆するものであり、本研究で同定された PEG1/MEST の LOI を有する細胞株は今後有用な研究材料となることが期待され、明らかに学術水準を高めたものと認める。