

DNA methylation analysis in malignant pheochromocytoma and paraganglioma

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-05-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大石, 敏弘 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3338

博士(医学) 大石 敏弘

論文題目

DNA methylation analysis in malignant pheochromocytoma and paraganglioma
(悪性褐色細胞腫および悪性パラグングリオーマの DNA メチル化解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

褐色細胞腫(PCC)・パラグングリオーマ(PGL)は年間発症率が人口 30 万人に 1 人とされる比較的稀な腫瘍であり、悪性例はその中で約 10%と更に稀である。副腎および傍神経節のクロマフィン細胞の腫瘍である PCC および PGL が非クロマフィン組織へ転移もしくは浸潤することで悪性と診断され、病理や画像検査で良性・悪性の判断はできないこと、初回手術から悪性 PCC/PGL と診断されるまでの期間が平均 8.5 年と長いことなどが特徴として挙げられる。近年、様々な悪性腫瘍で CpG サイト(シトシンの次にグアニンが現れる DNA 配列)のメチル化異常が同定され、腫瘍の悪性化に CpG メチル化異常が重要な役割を果たしていることがわかってきた。PCC/PGL の悪性化と CpG メチル化異常の関係についてはこれまで報告は少なく、今回本研究で検討を行った。

[対象]

1991 年から 2015 年の間に浜松医科大学附属病院およびその関連病院で外科的治療を受けた 19 名の PCC/PGL 患者の手術検体の凍結検体もしくはホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから DNA を抽出し、またパラフィン包埋ブロックを用いて免疫染色を行った。19 名の内訳は女性 12 名/男性 7 名、PCC 15 名/PGL 4 名、悪性 9 名/良性 10 名である(術後 11 年経過して転移がないものを良性と定義)。各病院で施設内倫理委員会の承認を受け、患者本人ないしはその家族から書面による同意を得た。

[方法]

19 例のうち、原発巣、転移巣をとともに入手できた 2 名の悪性 PCC/PGL 患者の DNA サンプルを用いて、Infinium HumanMethylation450 BeadChip array (Illumina 450 K、48 万ヶ所以上の CpG サイトのメチル化状態を網羅的に評価可能)で解析し、原発巣と比較し転移巣で過剰もしくは低メチル化となっている CpG サイトを選択、更に、その中から良性 PCC/PGL 患者 3 名と原発巣と同様のメチル化傾向となっているものを候補 CpG サイトとして絞り込んだ。次に、良性および悪性 PCC/PGL 患者 19 名のサンプルを用いて、上記候補 CpG サイトにおけるメチル化レベルを下記の 2 つの方法で定量的に評価した。①メチル化依存性 DNA 切断酵素で処理後に目的の CpG サイトが含まれるよう PCR を行う PTMR (PCR following treatment with a methylation-dependent restriction enzyme)。②バイサルファイト処理後に目的の CpG サイトが含まれるよう PCR で増幅後にシーケンスし変換されたか否かを確認するバイサルファイトシーケ

ンス法。

[結果]

悪性 PCC/PGL 患者 2 名における原発巣、転移巣間での Illumina 450 K 検討で、悪性化に伴う過剰メチル CpG サイト 12、低メチル CpG サイト 16 が候補 CpG として挙げられた。更に良性 PCC/PGL 患者 3 名の Illumina 450 K での結果と合わせ、過剰メチル CpG サイトでは 4 つ、低メチル CpG サイトでは 5 つの合計 9 つの CpG サイトを絞り込み、そのうち PTMR で 6 つの CpG サイトを、バイサルファイトシーケンス法では 9 つ全ての CpG サイトを評価した。その結果最終的に過剰メチル CpG サイトでは cg02119938、低メチル CpG サイトでは cg26870725 を悪性化に伴い有意なメチル化変化を伴う CpG サイトと決定した。これらはそれぞれ *ACSBG1* (acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1) 遺伝子、*MAST1* (microtubule associated serine-threonine kinase 1) 遺伝子と関連する CpG サイトであった。*ACSBG1* の免疫染色では、良性群 9/10(90%)、悪性原発巣群 3/3 (100%)、悪性転移巣群 6/9 (66.7%) が陽性であり、悪性転移巣群では良性群と比較し陽性率が有意に低かった ($p=0.020$)。 *MAST1* の免疫染色を行ったところ、良性群 0/10 (0%)、悪性原発巣群 0/3 (0%)、悪性転移巣群 6/9 (66.7%) が陽性であり、悪性転移巣群では良性群と比較し陽性率が有意に高かった ($p=0.003$)。

[考察]

これまでの悪性腫瘍のメチル化異常に関する報告は、悪性腫瘍検体と、別の個人の正常組織もしくは良性腫瘍検体とを比較検討しているものがほとんどである。本研究では同一患者の原発巣と転移巣を比較することで、個体間のメチル化状態の差異を排除することが可能となった。一方この場合同一個体における加齢に伴うメチル化状態の変化を解析に考慮する必要がある。

メチル化解析には複数の方法が知られているが、そのうちバイサルファイト処理を利用したものについては、処理に伴うサンプル DNA の量、質の劣化が問題とされている。今回解析にバイサルファイト処理を伴わない方法として PTMR 解析も併用しており、二つの手法を用いることにより信頼性の高い解析を行うことが可能となった。

今回、悪性化に伴い有意なメチル化変化を伴う CpG サイトの関連遺伝子である *ACSBG1* 遺伝子、*MAST1* 遺伝子を確認した。前者はスフィンゴ脂質の代謝に関わる酵素の一つである *ACSBG1* タンパク質をコードしているが、遺伝子異常もしくはメチル化異常が腫瘍のがん化に関わるという報告はこれまでみられない。一方 *MAST1* 遺伝子は *MAST* キナーゼファミリーの一つで、正常な細胞分裂に関連する *MAST1* タンパク質をコードしている。本遺伝子の異常は有糸分裂異常を引き起こし、発がんの一因になると報告されている。また別の報告では乳がんの 3~5% に *MAST1* と *MAST2* の遺伝子融合が認められ、これらの遺伝子が過剰発現することで細胞増殖が促進されたとしている。

[結論]

ACSBG1 遺伝子のメチル化に伴うサイレンシングおよび *MAST1* 遺伝子の脱メチル化に伴う過剰発現が *PCC/PGL* の悪性転化に関与している可能性が示された。*PCC/PGL* の悪性化における *ACSBG1*、*MAST1* の役割の解明には、*ACSBG1* のノックアウト、および *MAST1* を過剰発現によるさらなる検討が有用である。これらの遺伝子・タンパク質が悪性褐色細胞腫の早期診断マーカーの確立や治療標的遺伝子として、診断や治療に寄与していく可能性があると考ええる。