

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

田村 知大

専攻分野：病理病態学

コース：

指導教授：高木 正之

主論文の題目：

大腸 sessile serrated adenoma/polyp における Bcl-2 ファミリータンパク質の発現低下と DNA メチル化との関連

共著者：

小泉 宏隆、渡邊 嘉行、遠藤 陽、高橋 真紀子、久保田 学、及川 律子、伊東 文生、高木 正之

緒言

大腸癌の発生には DNA メチル化などのエピジェネティックな変化が関与している。DNA メチル化は、様々な遺伝子のプロモーター領域の CpG island に起こり、これによる遺伝子発現抑制に関連して発生する腫瘍は CpG island methylator phenotype (CIMP) と呼ばれ、sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) はその代表的疾患のひとつである。我々は最近、SSA/P ではアポトーシスの発生が高度に抑制され、その成因として Bcl-2 ファミリータンパク質 (Bcl-2、Bax、Bim、Bad) の発現減少が関与する可能性を報告した。しかし、SSA/P における Bcl-2 関連タンパク

質の発現低下にどのような分子異常が関与するのかは、いまだに不明である。

本研究で我々は、さらに多数の SSA/P 例を用いて Bcl-2 ファミリータンパク質の発現様式の再検討を行い、また、SSA/P は CIMP を呈することから、病変における *Bcl-2*、*Bax*、*Bim*、*Bad* のプロモーター領域のメチル化状態を解析した。

対象および方法

2006 年 4 月から 2013 年 3 月までに聖マリアンナ医科大学病院にて内視鏡的粘膜切除術により採取された“細胞異型を伴わない SSA/P”の 85 例を対象とし、正常粘膜 24 例を対照群とした。ホルマリン固定パラフィン包埋材料から tissue microarray を作製し、Bcl-2、Bax、Bim、Bad の免疫組織染色を行った。染色結果の統計解析には Mann-Whitney U test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。また、SSA/P における Bcl-2 ファミリータンパク質群の発現低下と遺伝子転写抑制との関連を知るために、免疫染色で Bcl-2、Bax、Bim、Bad の全てが著明に発現低下をしていた SSA/P 25 例と、それらの発現を保った正常組織 5 例を無作為に選択し、Bcl-2、Bax、Bim、Bad 上流の CpG island 領域を PCR で増幅後、パイロシーケンス法を用いて DNA メチル化の定量解析を行った。

なお、本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承諾を得て行った（承諾番号第 2204 号）。

結果

Tissue microarray を用いた免疫組織染色では、SSA/P は正常粘膜に比べ Bcl-2、Bax、Bim および Bad の発現が著明に低下し、以前の報告

と同様であることが確認された。

パイロシーケンス解析で、*Bcl-2* のメチル化値は正常粘膜で $3.0 \pm 0.7\%$ 、SSA/P では $5.2 \pm 5.1\%$ 、*Bax* は正常粘膜で $3.4 \pm 0.9\%$ 、SSA/P では $3.4 \pm 2.9\%$ 、*Bim* は正常粘膜で $6.8 \pm 1.9\%$ 、SSA/P では $6.5 \pm 2.2\%$ 、*Bad* は正常粘膜で $6.2 \pm 2.2\%$ 、SSA/P では $4.9 \pm 4.7\%$ であった。SSA/P における各遺伝子のメチル化値は、正常粘膜とほぼ同程度に低く、プロモーター領域に明らかな DNA メチル化は起きていないと考えられた。

考察

我々は、今回の研究と以前の報告を合わせて 100 例余りの SSA/P において *Bcl-2*、*Bax*、*Bim* および *Bad* の発現が高度に抑制されていることを示したが、パイロシーケンシング法による検索では、*Bcl-2*、*Bax*、*Bim*、*Bad* のいずれにもプロモーター領域の明らかなメチル化は認めなかった。よって、SSA/P における *Bcl-2* ファミリータンパク質の発現低下に、DNA メチル化による転写抑制は関連しないと思われた。しかし、他の機序 — 例えば、何らかの遺伝子調節タンパクの異常 — による転写抑制の可能性は否定できない。また、SSA/P と同様に高率な *BRAF*^{V600E} を示す悪性黒色腫では、変異 *BRAF* により BRAF-MEK 経路が活性化され、ポリユビキチン修飾された *Bim* がプロテアソームにより認識されタンパク質分解を受けることが知られている。SSA/P でも大部分の症例で *BRAF*^{V600E} がみられることから、悪性黒色腫と同様な現象が起きている可能性は十分に考えられる。

今後は SSA/P における *Bcl-2*、*Bax*、*Bim*、*Bad* mRNA の検出を行い、各タンパク質の発現抑制の原因が転写前・後のいずれにあるのかを知り、また、30 以上ある *Bcl-2* ファミリー遺伝子の発現様式を DNA microarray を用いて網羅的に解析し、アポトーシス抑制への関与を明らかにしたい。

結語

免疫組織染色にてSSA/PにおけるBcl-2ファミリータンパク質の著明な発現低下が確認されたが、この現象にDNAメチル化による遺伝子転写抑制が関与する可能性は低いと考えられた。