

論 文 内 容 要 旨

題目 Frequent silencing of the candidate tumor suppressor *TRIM 58* by promoter methylation in early-stage lung adenocarcinoma

(早期肺腺癌において癌抑制遺伝子 *TRIM 58*はプロモーター領域のメチル化により高頻度に抑制される)

著者 Koichiro Kajiura, Kiyoshi Masuda, Takuya Naruto, Tomohiro Kohmoto, Miki Watanabe, Mitsuhiro Tsuboi, Hiromitsu Takizawa, Kazuya Kondo, Akira Tangoku, Issei Imoto
平成 28 年 12 月 1 日発行 Oncotarget, 第 8 巻, 第 2 号
pp: 2890-2905 に発表済

内容要旨

肺腺癌の死亡率を減少させるためには早期発見もしくは個別化治療のさらなる進歩が必要である。今回我々はエピジェネティックな診断と治療のターゲットとなる遺伝子を同定することを目的とし, stage I の早期肺腺癌の正常と癌部のペア検体 12 例を用いて, 癌化により DNA メチル化を起こす遺伝子をゲノムワイドに探索した。R package-Illumina Methylation Analyser 法にて CpG island (CGI) 毎の DNA メチル化の平均値を算出し, 癌部と正常部を比較した。FDR<0.05 かつ β -Difference (メチル化の差) >0.25 の条件を満たす CGI は 113 個あり, その有意差の上位 10 個の CpG island (9 遺伝子に annotation された) を抽出した。①正常肺組織で mRNA の発現量 (The Cancer Genome Atlas (TCGA) データ参照) があること, ②11 例の臨床検体と 14 種類の肺癌細胞株での癌部組織での mRNA の発現低下, ③肺癌細胞株 (A549, H358, H441) にて 5-aza 処理を行い, 脱メチル化した際の遺伝子の発現回復の 3 条件を満たした遺伝子は TRIM58 のみであった。TRIM58 を DNA メチル化により発現が制御されている癌抑制遺伝子候補とした。TRIM58 のプロモーター領域を promoter assay を行って同定し, その部位をターゲットとして pyrosequencing を行った。臨床検体では 45/46 例 (98%) にて癌部は正常部に比較して DNA メチル化が増加していた。肺癌細胞株においても DNA メチル化率が高いほど mRNA の発現量が低い傾向にあった。TCGA データにおける RNA-seq と DNA メチル化マイクロアレイのデータを参照しても TRIM58 は DNA メチル化により発現が調節されていることが証明できた。免疫組織学的染色では肺胞上皮細胞の細胞質において TRIM58 は染色されており, 癌部では染色がなかった。

様式(8)

ついで、TRIM58の機能解析を *in vitro* と *in vivo* で行った。TRIM58はユビキチンリガーゼ活性を持つリングフィンガードメインを含んでおり、TRIM58の wild type (WT) をトランスフェクションした細胞株と、リングフィンガードメインの histidine33 を alanine に変換し、ユビキチン活性を欠如させた mutant (Mut) 細胞株を作成した。Colony-formation assay や 3D proliferation assay, MTT assay においては TRIM58-WT は TRIM58-mock や Mut よりも増殖速度がゆるやかであった。FACS では TRIM58-WT は mock や Mut と比較して G0-G1 期において細胞が増加し、S 期と G2-M 期の細胞が減少していた。TRIM58 は G1-S 期のチェックポイントにおいて肺腺癌細胞の細胞周期をユビキチンリガーゼの働きで停止させていると推測された。ついで、SCID マウスに A549-TRIM58-mock, Mut, WT を皮下移植した。移植 28 日後の腫瘍体積ならびに重量は A549-WT にて小さく、Ki-67 の活性も少なかった。A549-WT と mock をマイクロアレイにかけ、発現変化している遺伝子群を Gene ontology 解析した。TRIM58 は細胞間接着もしくは細胞-細胞外基質の接着に関与している可能性があった。

癌抑制遺伝子 TRIM58 は肺腺癌においてほぼすべての症例で発現低下しており、予後因子よりは早期診断マーカーとして有用であると思われる。また、将来的に TRIM58 活性を含むユビキチン活性の pathway は肺腺癌の標的治療の候補となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1328 号	氏名	梶浦 耕一郎
審査委員	主査 島田 光生 副査 西岡 安彦 副査 常山 幸一		

題目 Frequent silencing of the candidate tumor suppressor *TRIM 58* by promoter methylation in early-stage lung adenocarcinoma

(早期肺腺癌において癌抑制遺伝子 *TRIM 58*はプロモーター領域のメチル化により高頻度に抑制される)

著者 Koichiro Kajiura, Kiyoshi Masuda, Takuya Naruto, Tomohiro Kohmoto, Miki Watanabe, Mitsuhiro Tsuboi, Hiromitsu Takizawa, Kazuya Kondo, Akira Tangoku, Issei Imoto
 平成 28 年 12 月 1 日発行 Oncotarget 第 8 巻第 2 号 2890 ページから 2905 ページに発表済
 (主任教授 丹黒 章)

要旨 肺腺癌の死亡率減少には早期発見や個別化治療のさらなる進歩が必要である。

申請者らは、肺腺癌のエピジェネティックな診断と治療のターゲットとなる遺伝子の同定を目的とし、ステージ I の早期肺腺癌の正常部と癌部のペア検体 12 例と 14 種類の肺癌細胞株を用いて、癌化により DNA メチル化を起こす遺伝子をゲノムワイドに探索した。

CpG island (CGI) 毎の DNA メチル化の平均値を癌部と正常部で比較し、 $FDR < 0.05$ かつ $\beta\text{-difference} > 0.25$ の条件を満たす有意差の上位 10 個を抽出したところ、mRNA が正常部で発現し、癌部で低下し、肺癌細胞株の脱メチル化で発現が回復したものは *TRIM58* のみであり、*TRIM58* を DNA メチル化により発現が制御されている癌抑制遺伝子候補とした。

臨床検体 45/46 例にて癌部は正常部に比して DNA メチル化が増

加していた。細胞株でも DNA メチル化率が高いほど mRNA の発現量が低い傾向にあった。免疫染色では TRIM58 は肺胞上皮細胞の細胞質に陽性であり、癌部では陰性であった。

TRIM58 の wild type をトランスフェクションした細胞株 (TRIM58-WT) は TRIM58-mock やユビキチン活性を欠如させた mutant 細胞株 (Mut) よりも増殖速度が緩やかであり、G0-G1 期の細胞が増加し S 期と G2-M 期の細胞が減少していた。TRIM58 は G1-S 期のチェックポイントで細胞周期をユビキチンリガーゼの働きで停止させていると推測された。

SCID マウスに A549-TRIM58-moc、Mut、WT を皮下移植した 28 日後の腫瘍体積・重量は A549-WT にて小さく、Ki-67 陽性細胞も少なかった。A549-WT と mock で発現変化している遺伝子群の Gene ontology 解析では TRIM58 が細胞間接着や細胞-細胞外基質の接着に関与している可能性があった。

癌抑制遺伝子 TRIM58 は肺腺癌のほぼすべての症例で発現低下しており、早期診断マーカーならびに分子標的として有用であると考えられた。

本研究は、肺腺癌の早期診断・分子標的治療開発に有益な示唆を与えており、その臨床的意義は大きく学位授与に値すると判断した。