

論 文 内 容 要 旨

題目 Prognostic significance of GAD1 overexpression in patients with resected lung adenocarcinoma

(肺腺癌患者の予後予測における GAD1 過剰発現の有用性)

著者 Mitsuhiro Tsuboi, Kazuya Kondo, Kiyoshi Masuda, Shoichiro Tange, Koichiro Kajiura, Tomohiro Kohmoto, Hiromitsu Takizawa, Issei Imoto, Akira Tangoku  
令和元年発行 Cancer Medicine に掲載予定

内容要旨

申請者らは早期肺腺癌手術症例の癌部・非癌部に対して網羅的メチル化解析を行い、いくつかの癌特異的メチル化を来たす候補遺伝子を同定してきた。そのうちのひとつである GAD1 遺伝子に着目した。GAD1 は抑制性神経伝達物質である GABA の合成に関わる触媒タンパクとして知られている。その一方で、GAD1 の発現亢進がいくつかの悪性腫瘍にみられる報告がなされているが、肺癌についてはいまだ明らかになっていない。GAD1 の DNA メチル化、mRNA 発現、タンパク発現と臨床背景、予後との関連について明らかにする目的で研究を行った。

対象と方法

1999 年 4 月から 2013 年 11 月に当院で切除した腺癌症例を対象とし、162 例に対して免疫染色を行い、GAD1 タンパク発現を臨床背景や予後情報と比較した。そのうちの 33 例に対して bisulfite- pyrosequencing 及び RT-PCR を行い DNA メチル化と mRNA 発現を癌部・非癌部の各々で測定した。さらに、The Cancer Genome Atlas (TCGA) と Gene Expression Omnibus (GEO) の公共データベースを用いた検討を行った。研究は徳島大学病院倫理委員会の承認のもとに行われた(承認番号 3048)。

結果

1) 以前の網羅的メチル化解析で抽出された CpG island は GAD1 遺伝子内の chr2:171676552-171676980 の領域であったが、私たちはその近傍の CpG site (cg15126544) で、最も癌部と非癌部のメチル化の差が大きくみられることに着目した。この CpG site は GAD1 遺伝子の CCCTC-binding factor (CTCF)-binding site に含まれていることがわかった。

## 様式(8)

2) 33例の肺腺癌サンプルで GAD1 遺伝子の DNA メチル化、mRNA 発現を測定し癌部、非癌部で比較したところ、いずれも癌部で高 DNA メチル化 ( $P < 0.001$ )、mRNA 高発現 ( $P = 0.002$ ) を認めた。mRNA 発現と DNA メチル化の間には正の相関を認めた ( $\rho = 0.251$ ,  $P = 0.042$ )。

3) TCGA データベースより抽出した DNA メチル化、mRNA の発現での検討でも同様の結果が得られた。

4) 162例に対して免疫染色を行い、GAD1 タンパク発現の亢進群(112例)、非亢進群(50例)の2群に分類した。発現と臨床背景の関連をみたところ、発現亢進群で進行病理病期(II/III期)、胸膜浸潤、リンパ管浸潤が有意に高頻度であった。

5) 発現と予後の関連をみたところ、発現亢進群では無再発生存率(DFS,  $P < 0.001$ )と癌特異的生存率( $P = 0.031$ )で有意に予後不良であった。

6) TCGA、GEO それぞれのデータセットでは GAD1 mRNA の高発現群で OS が有意に不良であった(それぞれ  $P = 0.012$ ,  $P < 0.001$ )。

7) 自験例の Cox 比例ハザード回帰解析では、リンパ節転移陽性と GAD1 高発現が DFS における独立予後不良因子であった。TCGA データベースでの Cox 解析では OS において年齢、リンパ節転移、GAD1 高発現が独立予後不良因子であった。

## 考察

今回の結果では、GAD1 の高発現群で進行病理病期、胸膜浸潤、リンパ管浸潤が多くみられた。GAD1 発現と腫瘍細胞の浸潤能の関係について、これまでに、口腔扁平上皮癌細胞株を用いた実験で GAD1 ノックダウン細胞において  $\beta$  カテニンの核内移行抑制及び MMP7 の発現減弱を認め、それに伴い両処理細胞群においては、細胞浸潤能及び遊走能の低下を認めたとの報告がなされている。肺癌においても、GAD1 発現亢進が腫瘍の浸潤能増強に関わる可能性がある。

通常、DNA メチル化は遺伝子の発現を抑制することが知られているが、今回の結果からは高メチル化サンプルで mRNA の高発現を認めた。これに関して、近年、GAD1 遺伝子の CTCF-binding site のメチル化が、①インスレーターである CTCF の結合を阻害、②ポリコム抑制複合体 2 (PRC2) のプロモーター領域への動員の阻害により PRC2 によるヒストン H3K9 のトリメチル化を阻害することを引き起こし、これらの機序により発現亢進を来すという報告がされている。今回得られた結果の一因として、以上の機序が考えられた。

## 結論

GAD1 の高発現は肺腺癌切除症例の独立した予後予測因子であり、術後経過を予測する有効なバイオマーカーとなりうる。

## 論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1423</b> 号	氏名	坪井 光弘
審査委員	主査 島田 光生 副査 西岡 安彦 副査 常山 幸一		

題目 Prognostic significance of GAD1 overexpression in patients with resected lung adenocarcinoma

(肺腺癌患者の予後予測における GAD1 過剰発現の有用性)

著者 Mitsuhiro Tsuboi, Kazuya Kondo, Kiyoshi Masuda, Shoichiro Tange, Koichiro Kajiura, Tomohiro Kohmoto, Hiromitsu Takizawa, Issei Imoto, Akira Tangoku  
 令和元年発行 Cancer Medicine に掲載予定  
 (主任教授 丹黒 章)

要旨 GAD1 は抑制性神経伝達物質である GABA の合成に関わる触媒タンパクとして知られている。その一方で、GAD1 の発現亢進がいくつかの悪性腫瘍で報告されているが、肺癌についてはいまだ明らかになっていない。

申請者らは、当院で切除した肺腺癌症例を対象とし、33 例に対して bisulfite-pyrosequence 及び RT-PCR を行い DNA メチル化と mRNA 発現を癌部・非癌部の各々で測定した。また 162 例に対して免疫染色を行い、GAD1 発現亢進群(112 例)、非亢進群(50 例)の 2 群に分類し GAD1 発現を臨床背景や予後と比較検討した。さらに、The Cancer Genome Atlas (TCGA)と Gene Expression Omnibus (GEO)の公共データベースを用いた検討を行った。

得られた結果は以下の如くである。

1) 33 例の肺腺癌サンプルで GAD1 遺伝子の DNA メチル化、mRNA

発現を測定し比較したところ、いずれも癌部で高 DNA メチル化、mRNA 高発現を認めた。また mRNA 発現と DNA メチル化の間には正の相関を認めた。

- 2) TCGA データベースより抽出した DNA メチル化、mRNA の発現での検討でも同様の結果が得られた。
- 3) 自験 162 例において GAD1 タンパク発現亢進群は進行病理病期(II/III 期)、胸膜浸潤、リンパ管浸潤が有意に高頻度であった。
- 4) GAD1 タンパク発現亢進群では無再発生存率と癌特異的生存率が有意に不良であった。また多変量解析では、リンパ節転移陽性と GAD1 高発現が無再発生存率における独立予後不良因子であった。
- 5) TCGA、GEO それぞれのデータセットにおいても GAD1 mRNA の高発現群で生存率が有意に不良であった。さらに TCGA データベースを用いた多変量解析では年齢、リンパ節転移、GAD1 高発現が独立予後不良因子であった。

以上から GAD1 高発現は肺腺癌の独立した予後予測因子であり、術後経過を予測する有効なバイオマーカーとなりうる事が証明された。本研究は肺腺癌の治療に寄与するところ大であり学位授与に値すると判定した。