

論文の内容の要旨

論文題目

大腸癌予後・診断バイオマーカーとしての 組織中 *RAD54B* および血漿遊離 DNA *LINE-1* の役割

永井雄三

【研究の目的】

大腸癌の罹患数は本邦でも増加傾向にあり、治療成績の向上に寄与するバイオマーカーの開発が望まれている。治療方針決定に有用な予後マーカー (predictive marker)、および早期発見・治療を可能とする診断マーカー (diagnostic marker) の開発は特に重要である。本論文では、第1章において大腸癌組織における *RAD54B* 遺伝子発現の予後マーカーとしての有用性を、また第2章において大腸癌患者血漿中の遊離 DNA (Circulating cell-free DNA; cfDNA) における *LINE-1* 遺伝子の低メチル化レベルの診断マーカーとしての有用性を明らかにすることを目的とした。

第1章 大腸癌予後マーカーとしての大腸癌組織における *RAD54B* 遺伝子発現の解析

【背景】

RAD54B は *RAD54* の homolog として同定された SWI/SNF superfamily に属するタンパクであり、DNA 相同組み換え修復機構において重要な役割を果たしている。この機構の異常はゲノム不安定性を惹起して発癌に関与するとされているが、2014年に HCT116 大腸癌細胞株を含む cell line の実験によって、*RAD54B* が MDM2-MDMX コピキチンリガーゼ複合体に直接作用して p53 の分解に寄与することで、相同組み換え修復とは異なる機構で癌の発生・進行に関与している可能性があることが報告された。この結果を踏まえ、*RAD54B* の高発現が大腸癌患者の予後不良因子として機能するのではないかという仮説を立て、大腸癌における *RAD54B* 遺伝子発現を解析することとした。本研究では大腸癌の予後不良因子として既存の報告があった *RAD51* 遺伝子発現も同一検体で調べた。さらに *RAD54B* が *in vivo* でも p53 の分解に関与しているかどうかの検討も行った。

【対象と方法】

東京大学医学部附属病院大腸肛門外科で手術を施行した 212 例の大腸癌患者を対象とし、123

例を training set、89 例を validation set として解析した。切除検体から大腸癌組織を採取し、*RAD54B*、*RAD51* の遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量し、臨床病理学的因子や患者の予後との関連性を調べた。*RAD54B* と p53 の関連性の検討は、p53 の標的遺伝子のひとつである *CDKN1A* に注目し、*RAD54B* と *CDKN1A* の発現の関連性を解析することで行った。なお、p53 は変異型では転写活性が低下することが知られており、p53 変異型を含めると解析が困難となることが予想されたことから、この解析は大腸癌における *TP53* 遺伝子変異のホットスポットに変異のない症例を cDNA sequencing で選別して施行した。

【結果】

RAD54B は training set の 94.3% (116/123 例) の大腸癌組織において正常粘膜に比べ発現が上昇しており (中央値 2.60)、また Stage I-III における術後遠隔転移再発例で有意に発現が高値であった。Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析を用いて患者を *RAD54B* 高発現群と低発現群に層別化すると、高発現群は遠隔転移無再発生存率が有意に低く、*RAD54B* 高発現は多変量解析でも独立した予後不良因子であった (ハザード比 4.31、 $P = 0.006$)。validation set でも同様に再現性のある結果が認められた (ハザード比 3.627、 $P = 0.021$)。一方、*RAD51* は *RAD54B* よりも大腸癌組織における発現量が低く (中央値 1.15)、患者の予後との間にも有意な関連性は認められなかった。*CDKN1A* と *RAD54B* の発現量には *RAD54B* 発現量が 1.00 以上 3.00 未満の症例において弱いながらも有意な負の相関関係が認められ ($\rho = -0.29$, $P = 0.027$)、さらに MDM2 を介したユビキチン化による分解をより受けやすいとされる p53 の Arg72 の多型を持つ症例に限定して解析すると、*RAD54B* 発現量が 6.00 未満の症例においてより強い負の相関関係が認められた ($\rho = -0.44$, $P = 0.0099$)。

【考察】

RAD54B 高発現が大腸癌術後の遠隔転移再発における予後不良因子であることが初めて示された。*RAD54B* 発現量の高低で再発リスクを予測し、高値例では再発フォローアップをより慎重に行うなど、予後マーカーとしての臨床的な有用性が期待される。また、間接的にはあるが *in vivo* でも *RAD54B* が MDM2 を介した p53 の分解に関与して大腸癌患者の予後不良因子として働く可能性が示唆された。

第2章 大腸癌診断マーカーとしての血漿遊離 DNA における *LINE-1* 低メチル化レベルの解析

【背景】

担癌患者の血液中に存在する癌組織由来の cfDNA は非侵襲的に解析可能であり、liquid biopsy として注目されている。本研究では、エピジェネティック異常として重要な DNA の低メチル化異常 (hypomethylation) に注目した。DNA の低メチル化異常は、*LINE-1* などのゲノム内に多数のコピーを有する遺伝子配列を中心に生じ、ゲノム不安定性を惹起し発癌に関与するとされている。*LINE-1* の低メチル化は大腸癌発生の早期段階で生じると報告されていることから、血液中の cfDNA における *LINE-1* の低メチル化レベルを調べ、大腸癌の早期発見に有用な非侵襲的な診断マーカーとしての可能性を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

東京大学医学部附属病院大腸肛門外科で手術を施行した 114 人の大腸癌患者、および対照群として 53 人の健常人から血液を採取し、血漿を分離した。血漿 500 μ l から cfDNA を抽出して cfDNA 濃度を Quani-iT PicoGreen dsDNA assay で定量し、また *LINE-1* の低メチル化レベルをリアルタイム PCR による absolute quantitative analysis of methylated alleles (AQAMA 法) で解析した。*LINE-1* hypomethylation index (LHI) を、 $LHI = \text{非メチル化コピー数} / (\text{メチル化コピー数} + \text{非メチル化コピー数})$ 、と定義し解析に用いた。

【結果】

大腸癌患者の cfDNA LHI は 6.0 cm 以上の腫瘍径 ($P = 0.04$)、N2 以上の高度なリンパ節転移 ($P = 0.01$)、および遠隔転移を有する M1 症例 ($P = 0.03$) において、他の症例と比べ有意に高値であった。健常人と大腸癌患者の比較では、大腸癌患者の cfDNA 濃度および cfDNA LHI はともに健常人より有意に高値を示した (cfDNA 濃度: 中央値 11.1 vs. 7.7 ng/ml, $P = 0.0003$ 、cfDNA LHI: 0.371 vs. 0.332, $P < 0.0001$)。早期診断への有用性を検討するため、原発巣にのみを限局した Stage I/II を早期群 ($n = 57$)、リンパ節や他臓器に転移をきたした Stage III/IV を進行群 ($n = 57$) と定義して大腸癌患者を層別化して解析した。cfDNA 濃度および cfDNA LHI は両群においてともに健常人よりも有意に高値であった (Stage I/II cfDNA 濃度: 9.8 vs. 7.7 ng/ml, $P = 0.03$ 、cfDNA LHI: 0.369 vs. 0.332, $P < 0.0001$) (Stage III/IV cfDNA 濃度: 11.5 vs. 7.7 ng/ml, $P = 0.0006$ 、cfDNA LHI: 0.372 vs. 0.332, $P < 0.0001$)。大腸癌識別能を ROC 解析で評価すると、Stage I/II の早期群において、cfDNA LHI は cfDNA 濃度よりも高い AUC を示した (AUC 0.79 vs. 0.64, $P = 0.037$)。また Stage I/II の早期群において、cfDNA は CEA よりも高い感度を示した (cfDNA LHI 63.2% vs. CEA 40.4%)。

【考察】

cfDNA LHI は Stage I/II の大腸癌症例においても健常人よりも有意に高値であり、cfDNA 濃度や CEA よりも高い大腸癌識別能を示し、早期大腸癌を含めた大腸癌の非侵襲的な診断マーカーとしての

有用性が示唆された。AQAMA 法による *LINE-1* 低メチル化レベルの解析は、血漿中の微量な cfDNA を対象とした場合でも定量に十分な鋳型 DNA を得ることができ、liquid biopsy に適した方法であると考えられた。一方、*LINE-1* の低メチル化は大腸癌特異的な異常ではないこと、単一コホートによる限られた症例数による解析であり他のコホートでの validation が必要であること、等が本研究の限界として考えられた。

【結論】

大腸癌組織における *RAD54B* 遺伝子の発現量は、大腸癌術後の再発予測マーカーとして有用である可能性があり、また大腸癌患者の血漿遊離 DNA における *LINE-1* 低メチル化レベルは、大腸癌の早期発見を可能とする診断マーカーとして有用である可能性があることが示された。