

氏名	横山和武
(ふりがな)	(よこやま かずたけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 号
学位審査年月日	平成25年1月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	<i>Apoptotic Speck Protein-Like(ASCL)</i> is hypermethylated in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases (肝癌、肝炎組織における <i>Apoptotic Speck Protein-Like(ASCL)</i> 遺伝子のメチル化について)
論文審査委員	(主) 教授 樋口 和秀 教授 岡田 仁克 教授 辻 求

### 学位論文内容の要旨

#### 《背景と目的》

DNAのメチル化は発生、分化に深く関わっているが、近年では、癌の進展とDNAのメチル化異常との関連性が注目されている。消化器癌においては癌組織のみならず、慢性炎症組織などの癌の発生母地においてもプロモーター領域の CpG island がメチル化をおこし、発現抑制されている遺伝子が多数報告されている。肝癌においては *p16INK4a*、*E-cadherin*、*SFRP1*、*DLC*、*GSTP*、*RASSF1A*、*SOCS-1*、*SOCS-3*などが癌組織特異的にメチル化され、それらの発現が抑制されていることが知られている。本研究に注目した *Apoptotic Speck Protein-Like(ASCL)*も肝癌において特異的にメチル化される遺伝子のうちの一つであることが報告されている。ASCLは pyrin domain を持ち、caspase3 を活性化することによりアポトーシスを促進させること、さらに NF- $\kappa$ B や procaspase-1 の活性

を抑制することが知られている。しかし、肝細胞癌の発生母地であるウイルス性肝炎を含む背景肝における *ASCL* のメチル化を定性的にも、定量的にも評価した論文はない。本研究の目的は、定量的 real time PCR 法を用いて、肝癌発癌の高危険群である慢性肝疾患における *ASCL* 遺伝子のメチル化の程度を正常肝や肝癌組織のそれらと比較することにより、*ASCL* のメチル化がウイルス感染の有無や肝癌の発生や発育、進展とどのような関連性があるのかを検討することである。

#### 《対象及び方法》

2006 年から 2011 年における大阪医科大学附属病院一般・消化器外科での手術による臨床切除標本（肝癌切除標本 40 例、正常肝標本 10 例）を対象とした。そのうち HBV 抗原陽性 17 例、抗 HCV 抗体陽性 11 例であった。組織学的な慢性肝炎の程度や肝線維化の程度に関しては Knodell らの HAI (histological activity index) に準じて点数化した。*ASCL* 遺伝子の CpG island のメチル化解析は以下の方法を用いて行った。

- 1) 各組織から抽出した genome DNA を bisulfite 処理する。
- 2) *ASCL* 遺伝子の特定領域に対してメチル化特異的および非メチル化特異的プライマーを用いて real time PCR を行い、PCR 産物は内在性遺伝子 ( $\beta$ -actin) による標準化を行い半定量化する。
- 3) メチル化の程度は、以下の式で算出した値 (Methylation Index: M.I.値) であらわす。  
メチル化 DNA 量 / (メチル化 DNA 量 + 非メチル化 DNA 量) × 100

#### 《結 果》

*ASCL* の M.I.値は、肝細胞癌症例での背景肝組織（非腫瘍部組織）よりも高値であった。 $(p < 0.05)$  しかしながら、非腫瘍部組織と正常肝組織の M.I.値には有意差は認められなかった。非腫瘍部組織においては、ウイルス感染を有する組織では正常肝組織に比し M.I.値は上昇していたが  $(p < 0.05)$ 、ウイルスタイプ間には M.I.値に有意な差は認められなかった。また腫瘍の背景肝組織（非腫瘍部組織）では、HAIscore の増加と M.I.値の上昇との間に

は正の相関関係が認められ( $r=0.4313$ 、 $p<0.05$ )、組織学的な炎症所見が高度になれば *ASCL* のメチル化も進行していることが判明した ( $r=0.3783$ 、 $p<0.05$ )。さらに、組織学的な肝線維化の程度 (HAI IV) と M.I.値にも正の相関関係が認められた ( $r=0.3535$ 、 $p<0.05$ )。肝癌においては、臨床病期が進行するほど、また腫瘍径が大きくなるほど M.I.値は増加する傾向にあったが、それらの間には明らかな相関関係は認められなかった。

#### 《考 察》

*ASCL* のメチル化は肝癌組織だけでなく癌の発生母地である慢性肝炎、肝硬変組織においてもみられ、さらに慢性炎症や線維化が進行するにつれてメチル化も進行することが判明した。また、肝癌組織においては臨床病期の進行や腫瘍径とメチル化の程度には有意な関連は認められなかった。以上より、*ASCL* のメチル化は前癌状態から発癌早期において重要な役割を持つものと考えられた。*ASCL* CpG island のメチル化は今後の更なる検討により肝癌発癌のリスクマーカーとして臨床応用できる可能性が考えられた。

#### 《結 語》

*ASCL* は肝臓癌組織のみならず癌の発生母地となる慢性肝疾患においてもメチル化異常が高率に認められた。*ASCL* のメチル化異常は肝癌における発癌だけでなく、慢性肝疾患とも密接に関連していることが示唆された。*ASCL* のメチル化異常は肝癌における早期発見、早期診断につながる可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

慢性肝炎や肝硬変等の慢性肝疾患は肝癌の高危険群であることが知られている。肝癌において、*Apoptotic Speck Protein-Like (ASCL)* の CpG island のメチル化が高頻度に発生し、*ASCL* の発現を抑制することが報告されている。しかし、慢性肝疾患組織における *ASCL* のメチル化の頻度に関しては明らかでない。本研究は *ASCL* のメチル化が正常肝組織、慢性肝炎組織、肝癌組織は亢進しているのか、さらに慢性肝炎や肝線維化が進行するにつれてメチル化が亢進するのかについて、肝切除手術標本を用いて検討している。その方法として定量的 real time PCR 法を施行し、*ASCL* のメチル化の程度は Methylation Index (M.I.値) として表わし、組織学的な炎症所見や線維化の程度 (HAIscore) と比較検討した。

その結果、*ASCL* の M.I.値は肝癌症例での背景肝組織 (非腫瘍部組織) と正常肝組織との間には有意差は認めていないが、非腫瘍部組織に比べ腫瘍部組織では有意に高値であった。また、ウイルス感染を有する慢性肝炎組織では、ウイルスタイプによる差は認めないものの、正常肝組織よりも有意に M.I.値が高値であった。さらに、肝癌においては臨床病期の進行と *ASCL* の M.I.値の間には有意な関連性は認められなかったが、慢性肝炎の炎症所見の進行や、線維化の進行に伴い *ASCL* の M.I.値は増加していた。

本研究は *ASCL* CpG island のメチル化は肝癌組織だけでなく前癌病変である慢性肝炎、肝硬変組織においても高頻度に発生しており、慢性炎症や線維化が進行するにつれてメチル化も進行することを示している。*ASCL* CpG island のメチル化は前癌状態から発癌早期において重要な役割を持つものと考えられ、肝癌発癌のリスクマーカーとしての可能性を示唆している。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Bulletin of the Osaka Medical College 58(1,2): 35-43, 2012