

原 著

肝細胞癌および慢性肝疾患における癌遺伝子 *c-myc*, *c-Ki-ras*, *c-Ha-ras* の脱メチル化に関する研究

愛場 信康, 南部 修二, 井上 恭一, 佐々木 博
富山医科薬科大学内科学第 3 教室

Demethylation of the *c-myc*, *c-Ki-ras* and *c-Ha-ras* oncogenes in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease

Nobuyasu AIBA, Shuji NAMBU, Kyoichi INOUE and Hiroshi SASAKI

Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

Key words : oncogene, demethylation, hepatocellular carcinoma, chronic liver disease

要 旨

癌遺伝子の脱メチル化がヒト肝癌発生にどのように関与しているかを明らかにするため、本研究では、肝癌症例の肝癌組織と非癌部肝組織、肝癌を合併しない慢性肝疾患組織、コントロール肝組織を対象として、それらにおける三種の癌遺伝子 *c-myc*, *c-Ki-ras*, *c-Ha-ras* のメチル化状態を比較検討した。肝癌組織18例中13例(72.2%), 非癌部肝組織34例中29例(85.2%), 肝癌を合併しない慢性肝疾患組織34例中25例(73.5%)において *c-myc* 遺伝子の第2エクソンの CCGG 部位の完全脱メチル化を認めた。一方、コントロール肝組織31例中3例においてのみ同 CCGG 部位の完全脱メチル化を認め、残りの28例に部分的脱メチル化を認めた。完全脱メチル化を認めた患者3例は、0, 14, 23歳の若年者であり、一方部分的脱メチル化を認めた患者28例は25歳から83歳であり、これは肝癌患者および慢性肝疾患患者とほぼ同様の年齢分布であった。また完全脱メチル化を有する頻度は、肝硬変で肝癌を合併するか否かで明らかな差を認めず、慢性活動性肝炎でも同様であった。肝癌組織18例中7例(38.9%)に *c-myc* 遺伝子第3エクソンの脱メチル化が生じており、13例(72.2%)に *c-Ki-ras* 遺伝子の脱メチル化が生じており、非癌部肝組織、慢性肝疾患組織、コントロール肝組織においては脱メチル化が生じていなかった。肝癌組織13例(72.2%)において同じ症例の非癌部肝組織と比較して *c-Ha-ras* 遺伝子の脱メチル化が生じていた。また肝癌組織18例中16例(88.9%)において、三つのうちいずれかの癌遺伝子に脱メチル化が生じていた。

c-myc 遺伝子第2エクソンの CCGG 部位の脱メチル化は、持続する肝細胞壊死とそれに対する代償的な再生をきたす慢性肝疾患における病態と関連を有すると考えられる。そこに肝癌が発生する過程で *c-myc* 遺伝子の第3エクソンあるいは *c-Ki-ras*, *c-Ha-ras* 遺伝子の脱メチル化等が生じると考えられるが、これらの癌遺伝子の脱メチル化が肝癌発生の原因であるのか結果であるのかは、本研究では明らかにすることが出来なかった。

はじめに

脊椎動物の DNA はメチル化による修飾を受けている。この修飾は、DNA トランスメチラーゼによ

る酵素反応を介し、DNA 構成塩基の一つであるシトシンが、5-メチルシトシンに変化することにより起こるものである^{1, 2)}。ほ乳類の DNA においては、5-メチルシトシンのみが、メチル化の修飾を

受けた塩基であり, 5-メチルシトシンの90%以上はCG(シトシン・グアニン)の塩基配列に認められる。またCGの塩基配列部分の50~70%はメチル化しているとされ, このため特にCG配列のシトシンのメチル化の修飾が意義があるとされている。

DNAのメチル化の生物学的な意義としては, 遺伝子の転写の調節やクロマチン構造の変化などがあげられており, DNAのメチル化の程度の低下, すなわち脱メチル化により, 遺伝子の転写活性が高まることが示唆されている¹⁻³⁾。また近年, 種々の臓器の癌細胞や癌組織において, 特定の遺伝子の脱メチル化が認められることより, DNAの脱メチル化と発癌との関連性が示唆されるようになってきた^{2, 4)}。

一方, 発癌過程において細胞癌遺伝子の活性化が重要な役割を果たしていると考えられている⁵⁾。近年ヒト肝細胞癌(肝癌)組織においても, *lca*⁶⁾, *hst*⁷⁾, *N-ras*⁸⁾といったトランスフォーミング遺伝子が見出され, 加えて*c-myc*遺伝子⁸⁻¹¹⁾と*ras*遺伝子^{8, 10)}の発現の増加も報告されている。しかしながら, ヒト肝癌発生における癌遺伝子の役割については, まだ完全に明らかにされたわけではない。いくつかの遺伝子の活性化には, DNAのメチル化の程度の変化も関与しているとされ⁴⁾, 最近肝癌組織における上皮成長因子受容体遺伝子¹²⁾の脱メチル化が, 加えて*c-myc*遺伝子^{12), 13)}の脱メチル化が報告されている。

肝癌は慢性肝疾患とりわけ肝硬変にしばしば合併し, 肝硬変を肝癌の前癌病変とみなす考え方もある。肝硬変あるいは慢性肝炎である非癌部肝組織において, *c-myc*遺伝子の脱メチル化^{12), 13)}が報告されているが, 肝癌発生の高危険群としての, 肝癌を合併しない慢性肝疾患組織においてはメチル化状態が検討されていない。また, *c-myc*遺伝子によってコードされる蛋白質は核内に存在し, DNAの複製に関与するとされている¹⁴⁾。一方, *ras*遺伝子は, そのコードされる蛋白質が細胞膜の内側に存在し, 細胞の外から中への情報伝達に関与するとされており¹⁵⁾, これも肝癌発生に何らかの関与をしている可能性が考えられる。

そこで癌遺伝子の脱メチル化が肝癌発生にどのように関与しているかを明らかにする第一歩として, 本研究では, 肝癌症例の肝癌組織と非癌部肝組織, 肝癌を合併しない慢性肝疾患組織, コントロール肝

組織を対象として, それらにおける三種の癌遺伝子, *c-myc*, *c-Ki-ras*, *c-Ha-ras*のメチル化状態を比較検討した。

対 象

肝癌患者34症例, 肝癌を合併しない慢性肝疾患患者34症例および他疾患の患者31症例より, 針生検, 剖検あるいは外科手術により得られた肝組織を対象とした。肝癌患者18例については肝癌組織およびその近傍の非癌部肝組織の両方を検索し, 残りの16例については非癌部肝組織のみを検索した。各組織は, その一部を病理組織標本作製のために供し, 残りの組織はDNA抽出に用いるため, 液体窒素で急速凍結したのち, 使用時まで-80℃にて保存した。組織学的には, 非癌部肝組織は肝硬変26例, 慢性活動性肝炎8例であった。また肝癌を合併しない慢性肝疾患組織は, 肝硬変14例, 慢性活動性肝炎14例, 慢性非活動性肝炎6例であった。さらに他疾患の患者より得られた肝組織は軽微な変化を呈するにとどまり, コントロールとして使用した。

方 法

1) DNAの抽出

高分子DNAは, Shafritzらの方法¹⁶⁾により調製した。すなわち各組織を50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1.0% sodium dodecyl sulfate(SDS)内でホモジナイズした後, プロテイナーゼKを終濃度500μg/mlとなるように加え, 37℃, 4時間反応させた。ついで, フェノール抽出, エタノール沈殿を行った後, 得られた核酸を50mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 2mM EDTAに溶解した。次に加熱処理をしたRNase Aを終濃度30μg/mlとなるように加え, 37℃, 2時間反応させてRNAを除いた。さらに, プロテイナーゼKを終濃度50μg/mlとなるように加え, RNase Aを不活化させた後, フェノール抽出, エタノール沈殿を行い, 適量の10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTAに溶解し, 使用時まで4℃で保存した。

2) 制限酵素処理, 電気泳動, Southern blotting

得られたDNAの約15μgを, まず制限酵素*Hpa*II(タカラ酒造)または*Msp*I(ニッポン・ジーン)で

処理した。処理は、各供給会社の指定条件下、20U/ μ g DNA の濃度で約16時間行った。制限酵素による消化が完全であるか否かは、制限酵素の量を10, 15, 20U/ μ g DNA の濃度で段階的に増量し、電気泳動のパターンに変化がないことにより確認した¹⁷⁾。さらに *c-myc* 遺伝子の第2, 第3エクソンのメチル化状態を検索するために、*Hpa* II または *Msp* I で処理した DNA を *Eco*R I (タカラ酒造) で処理した。反応は指定条件下に10U/ μ g DNA の濃度で行った。制限酵素により処理された DNA は、40mM Tris-acetate, 20mM sodium acetate, 2mM EDTA (pH 7.9) の緩衝液中において0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、分子量の大きさにより DNA 断片を分離した。さらにアルカリ変性により DNA を一本鎖にしたのち中和し、Southern の方法¹⁸⁾によりニトロセルロース膜に転写したのち、それを真空下80℃で焼き付けを行うことによって DNA を固着させた。

3) 使用プローブ

本研究においては、4種類のプローブを使用した。すなわち *c-myc* 遺伝子のコーディング領域を含む第2, 第3エクソンを検索するため Ryc-7.4^{19,20)} (ヒト *c-myc* 遺伝子の cDNA の一部分のクローン, Dr. C. M. Croce より供与, Fig.1) を、*c-myc* 遺伝子の2カ所の転写プロモーターが存在する第1エクソン周辺のメチル化状態を検索するため Probe-1²¹⁾ (ヒト *c-myc* 遺伝子の第1エクソンを含む *Pst* I - *Sac* I 断片, Oncor 社; Fig.1) を、*c-Ki-ras* 遺伝子を検索するため pSW11-1²²⁾ (ヒト *c-Ki-ras* 遺伝子の cDNA クローン, Oncor 社; Fig.4-b) を、*c-Ha-ras* 遺伝子を検索するため pT24-C3²³⁾ (ヒト *c-Ha-ras* 遺伝子のゲノム DNA クローン, Oncor 社; Fig.5-b) を使

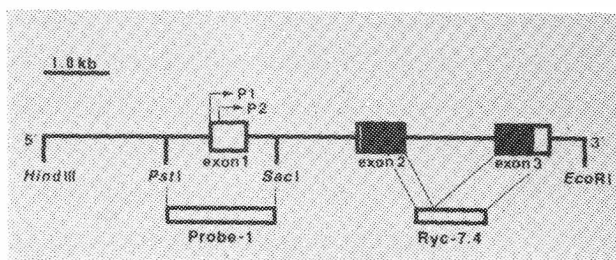


Fig.1 Structural map of the human *c-myc* gene and two probes used in this study. The boxes represent exons, the black marks translational reading frames. P1 and P2 denote the two promoters of the *c-myc* gene.

用した。これらのプローブは、インサートの部分を切り出したのち、Feinberg らの方法^{24),25)}により (α -³²P)dCTP (Amersham) でラベルして使用した。

4) ハイブリダイゼーション

まず、DNA を固定したニトロセルロース膜を50%ホルムアミド、4×SSC (1×SSC = 150mM NaCl, 15mM sodium citrate), 50mM HEPES-OH (pH7.0), 10×Denhardt solution, 25 μ g/ml yeast RNA, 25 μ g/ml 熱変性サケ精子 DNA を含む溶液中で42℃, 6時間プレハイブリダイゼーションを行ったのち、³²P でラベルしたプローブを加え、同一溶液中で42℃, 18~20時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、室温にて2×SSC, 0.1% SDS 中で10分間2回洗浄し、さらに50℃にて0.2×SSC, 0.1% SDS 中で20分間3回洗浄した。風乾したのち、-80℃にて増感紙を用いてオートラジオグラフィーを行った。

5) メチル化の状態の検出原理

本研究においては、制限酵素 *Hpa* II と *Msp* I の使用と Southern 法¹⁸⁾を組み合わせることによりメチル化の状態を検討した。その原理はつぎのとおりである。制限酵素 *Hpa* II と *Msp* I は、CG 配列を含む塩基配列 CCGG を認識し、切断するが、*Hpa* II は CCGG 配列の内側の C がメチル化されているとこの配列を切断できない²⁶⁾。したがって、もしある遺伝子内あるいはその近傍の CCGG の内側の C がメチル化されていれば *Hpa* II で処理した DNA のほうが *Msp* I で処理した DNA よりも大きな遺伝子 DNA 断片を生じることになる。このようにして、遺伝子のメチル化の状態は *Hpa* II または *Msp* I を用いて DNA を切断し Southern 法を行うことによって解析できる。

結 果

1) *c-myc* 遺伝子の第2, 第3エクソンの CCGG 部位のメチル化

肝癌組織、非癌部肝組織、慢性肝疾患組織、コントロール肝組織のいずれの DNA においても、*Msp* I + *Eco*R I で消化したとき、Southern 法による解析では約 2.2kb と 1.0kb のバンドが検出された (Fig.2-a)。この2本のバンドは、おそらく、Fig.2-b

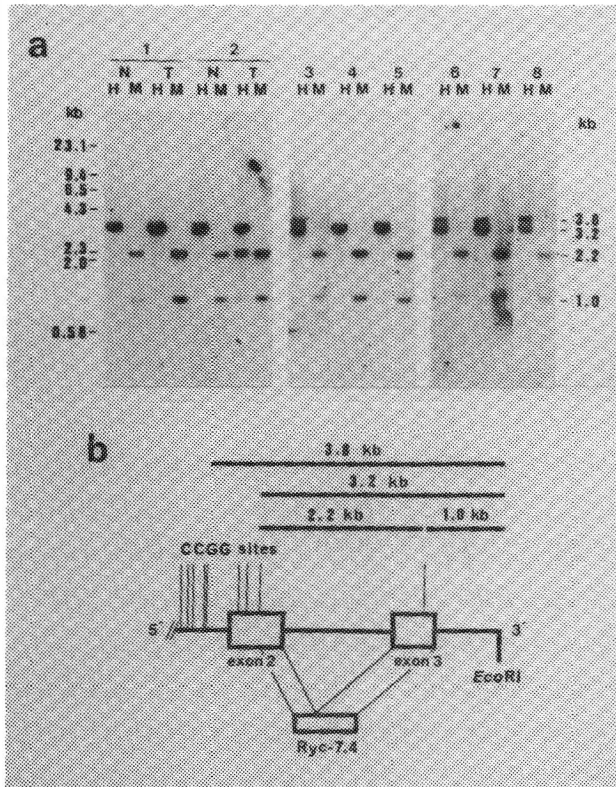


Fig.2 Methylation at the CCGG sites in the second and third exons of the *c-myc* gene in each liver tissue group.

a) Representative autoradiographs of Southern hybridization patterns of *Hpa* II + *Eco*R I-digested (H) and *Msp* I + *Eco*R I-digested (M) DNAs from the liver tissues are shown. Nos. 1 and 2 are HCC cases. N = non-tumor liver tissue. T = HCC tissue. Nos. 3, 4 and 5 are chronic liver disease without HCC. Nos. 6, 7 and 8 are control livers. b) Map of the region containing the second and third exons of the *c-myc* gene, showing the *Hpa* II-*Msp* I sites (CCGG) and Ryc-7.4 probe and indicating how the observed fragments can be generated.

に示した CCGG 部位^{27), 28)}と 3' 側の *Eco*R I 部位が切断されたために検出されたものと考えられた。一方, 同一の DNA を *Hpa* II + *Eco*R I で消化したとき, Southern 法による解析では 3.8kb, 3.2kb, 2.2kb, 1.0kb の 4 本のバンドの組み合わせからなるパターンでバンドが検出された (Fig. 2-a)。この 4 本のバンドはおそらく, 3' 側の *Eco*R I 部位と Fig. 2-b に示すような CCGG 部位が脱メチル化しているため *Hpa* II により切断され検出されたものと考えられた。しかしながら, Southern 法は DNA の大きさの違いがわずかな場合, 両者の区別は不能であるので, 第 2 エクソンの 3 ケ所の CCGG 部位と第 1 イントロンの 3' 側の CCGG 部位については

いずれの CCGG 部位が脱メチル化されているかは判定できなかった。

以上の結果より, 第 2, 第 3 エクソンの CCGG 部位はメチル化による修飾を受けていることが明らかとなった。また肝組織の *c-myc* 遺伝子は第 2, 第 3 エクソンの CCGG 部位のメチル化状態の異なる複数の subpopulation から構成されていることが示唆された。すなわち *Hpa* II + *Eco*R I の消化により, 3.8kb と 3.2kb の 2 本のバンドを示す肝組織は, 2 種類のメチル化状態の異なる細胞集団からなり, 組織レベルでは, 第 2 エクソンが部分的に脱メチル化し, 第 3 エクソンは脱メチル化していないとみなされる。3.2kb の 1 本のバンドを示す肝組織は, 1 種類のメチル化状態の細胞集団からなり, 組織レベルでは, 第 2 エクソンが完全に脱メチル化し, 第 3 エクソンは脱メチル化していないとみなされる。3.2kb, 2.2kb, 1.0kb の 3 本のバンドを示す肝組織は, 2 種類のメチル化状態の異なる細胞集団からなり, 組織レベルでは, 第 2 エクソンが完全に脱メチル化し, 第 3 エクソンは部分的に脱メチル化しているとみなされる。このようにして *c-myc* 遺伝子の第 2, 第 3 エクソンの CCGG 部位のメチル化の状態を検討した。

2) *c-myc* 遺伝子の第 2 エクソンの CCGG 部位のメチル化の程度の比較

肝癌組織 18 例中 13 例 (72.2%), 非癌部肝組織 34 例中 29 例 (85.2%), 肝癌を合併しない慢性肝疾患組織 34 例中 25 例 (73.5%) において第 2 エクソンの CCGG 部位の完全脱メチル化を認めた。さらに, 肝癌患者 18 例中 4 例において, 肝癌組織で第 2 エクソンの CCGG 部位の部分的脱メチル化を認め, 同一患者より得られた非癌部肝組織で完全脱メチル化を認めた。一方, コントロール肝組織 31 例中 3 例においてのみ, 同 CCGG 部位の完全脱メチル化を認め, 残りの 28 例に部分的脱メチル化を認めた。完全脱メチル化を認めた患者 3 例は若年者, すなわち 0, 14, 23 歳であった。部分的脱メチル化を認めた患者 28 例は 25 歳から 83 歳であり, これは, 肝癌患者 (39 歳から 86 歳) および慢性肝疾患患者 (34 歳から 80 歳) とほぼ同様の年齢分布であった。

さらに, 非癌部肝組織および慢性肝疾患組織を組

Table 1. Methylation State in the second Exon of the *c-myc* Gene

Group	Full demethylation (%)	Partial demethylation (%)
HCC tissue	13/18 (72.2)	5/18 (27.8)
Non-tumor tissue from HCC patient	29/34 (85.3)	5/34 (14.7)
Cirrhosis	22/26 (84.6)	4/26 (15.4)
CAH	7/8 (87.5)	1/8 (12.5)
Chronic liver disease without HCC	25/34 (73.5)	9/34 (26.5)
Cirrhosis	11/14 (78.6)	3/14 (21.4)
CAH	10/14 (71.4)	4/14 (28.6)
CIH	4/6 (66.7)	2/6 (33.3)
Control	3/31 (9.7)	28/31 (90.3)

HCC ; hepatocellular carcinoma
CAH ; chronic active hepatitis
CIH ; chronic inactive hepatitis

Table 2. Methylation State in the third Exon of the *c-myc* Gene

Group	No demethylation (%)	Partial demethylation (%)
HCC tissue	11/18 (61.1)	7/18 (38.9)
Non-tumor tissue from HCC patient	34/34 (100.0)	0/34 (0.0)
Chronic liver disease without HCC	34/34 (100.0)	0/34 (0.0)
Control	31/31 (100.0)	0/31 (0.0)

HCC ; hepatocellular carcinoma

組織型で分類し、第2エクソンのメチル化状態を検討した (Table 1)。それによると慢性非活動性肝炎および慢性活動性肝炎の多くの症例で第2エクソンの CCGG 部位の完全脱メチル化を認めた。また、完全脱メチル化を有する頻度は、肝硬変で肝癌を合併するか否かで明らかな差を認めず、慢性活動性肝炎についても同様であった。

3) *c-myc* 遺伝子の第3エクソンの CCGG 部位のメチル化の程度の比較

肝癌組織18例中7例 (38.9%) において 3.2kb, 2.2kb, 1.0kb の3本のバンドを認めた。非癌部肝組織、慢性肝疾患組織、コントロール肝組織のいずれの DNA においても、Southern 法による解析では 3.2kb の1本のバンドか、3.8kb と 3.2kb の2本のバンドを認めた。これらの結果より、非癌部肝

組織, 慢性肝疾患組織, コントロール肝組織では第3エクソンの CCGG 部位は脱メチル化しておらず, 肝癌組織の約40%において部分的に脱メチル化しているといえた (Table 2)。

4) *c-myc* 遺伝子の第1エクソン周辺の CCGG 部位のメチル化の程度の比較

肝癌組織, 非癌部肝組織, 慢性肝疾患組織, コントロール肝組織のいずれの DNA においても, *Msp* I で消化したとき, Southern 法による解析では約 0.6kb と 0.8kb のバンドが検出された (Fig. 3-a)。この2本のバンドは, おそらく, Fig. 3-b に示した CCGG^{28), 29)} が切断されたために検出されたものと

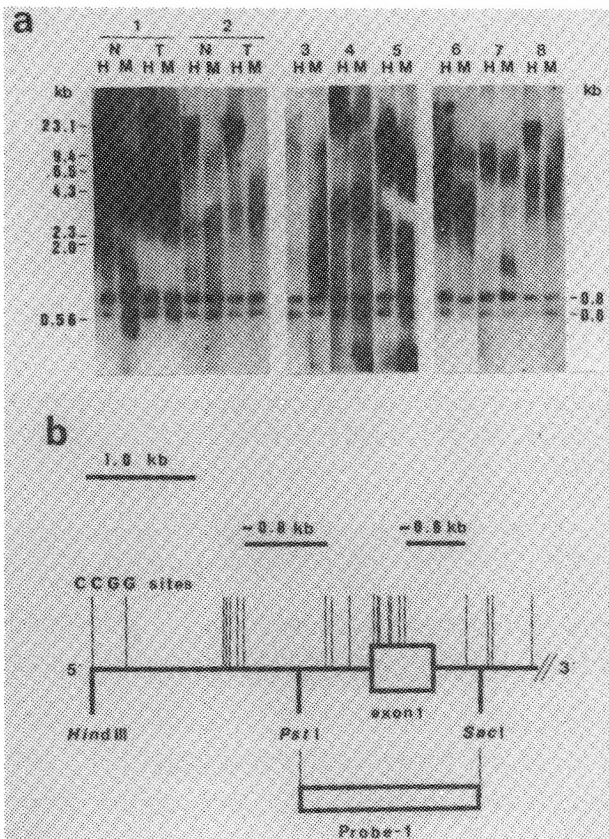


Fig. 3 Methylation at the CCGG sites in the area surrounding the first exon of the *c-myc* gene in each liver tissue group. a) Representative autoradiographs of Southern hybridization patterns of *Hpa* II-digested (H) and *Msp* I-digested (M) DNAs from the liver tissues are shown. Nos. 1 and 2 are HCC cases. N = non-tumor liver tissue. T = HCC tissue. Nos. 3, 4 and 5 are chronic liver disease without HCC. Nos. 6, 7 and 8 are control livers. b) Map of the area surrounding the first exon of the *c-myc* gene, showing the *Hpa* II-*Msp* I sites (CCGG) and Probe-1, and indicating how the observed fragments can be generated.

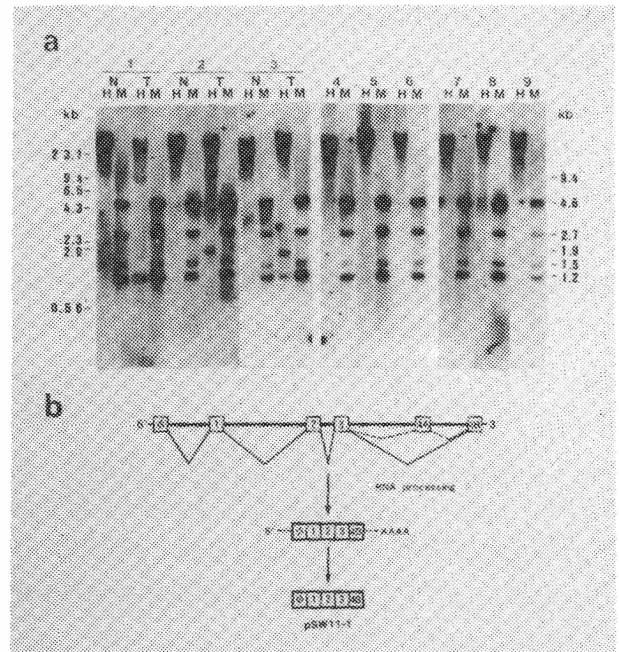


Fig. 4 Methylation at the CCGG sites of the *c-Ki-ras* gene in each liver tissue group.

a) Representative autoradiographs of Southern hybridization patterns of *Hpa* II-digested (H) and *Msp* I-digested (M) DNAs from the liver tissues are shown. Nos. 1, 2 and 3 are HCC cases. N = non-tumor liver tissue. T = HCC tissue. Nos. 4, 5 and 6 are chronic liver disease without HCC. Nos. 7, 8 and 9 are control livers.

b) Map of the *c-Ki-ras* gene and human *c-Ki-ras* cDNA clone pSW11-1.

考えられた。また, 制限酵素地図よりこのほかにも分子量の小さなバンドが検出されるはずであるが, その大きさが非常に小さいためにハイブリッドの形成が悪く, Southern 法では検出できなかったものと考えられた。一方, 同一の DNA を *Hpa* II で消化したとき, Southern 法による解析では約 0.6kb と 0.8kb のバンドが検出された (Fig. 3-a)。

以上の結果より, いずれの肝組織においても第1エクソン周辺の CCGG 部位のうち少なくとも4ヶ所が脱メチル化しており, *c-myc* 遺伝子のメチル化の程度については, 肝癌組織, 非癌部肝組織, 慢性肝疾患組織, コントロール肝組織の間に顕著な相違はないと考えられた。しかし, いずれの CCGG 部位が脱メチル化しているかについては, この領域には多くの CCGG 部位が近接して存在しているため, Southern 法による解析はできなかった。

5) *c-Ki-ras* 遺伝子の CCGG 部位のメチル化の程度の比較

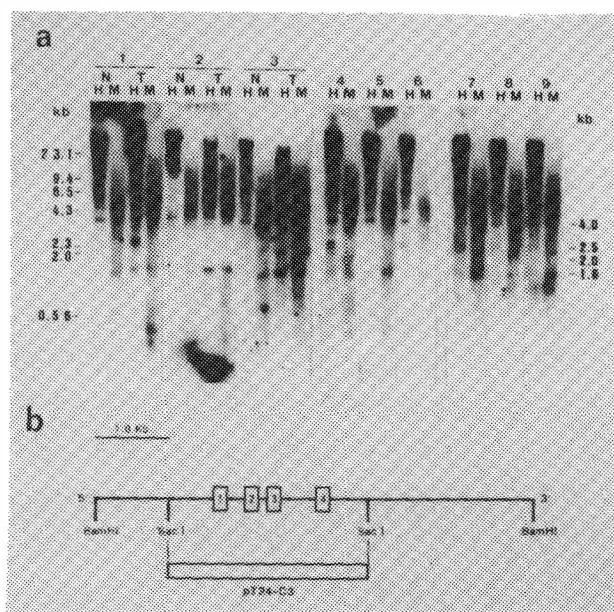


Fig.5 Methylation at the CCGG sites of the *c-Ha-ras* gene in each liver tissue group.

a) Representative autoradiographs of Southern hybridization patterns of *Hpa* II-digested (H) and *Msp* I-digested (M) DNAs from the liver tissues are shown. Nos. 1, 2 and 3 are HCC cases. N = non-tumor liver tissue. T = HCC tissue. Nos. 4, 5 and 6 are chronic liver disease without HCC. Nos. 7, 8 and 9 are control livers.

b) Map of the *c-Ha-ras* gene and human *c-Ha-ras* genomic clone pT24-C3.

肝癌組織, 非癌部肝組織, 慢性肝疾患組織, コントロール肝組織のいずれの DNA においても, *Msp* I で消化したとき, Southern 法による解析では約 4.6kb, 2.7kb, 1.5kb, 1.2kb の 4 本のバンドが検

出された。一方, 同一の DNA を *Hpa* II で消化したとき, Southern 法による解析では 24kb より大きなバンド, 9.4kb, 1.9kb, 1.2kb の 4 本のバンドの組み合わせからなるパターンでバンドが検出された (Fig. 4-a)。非癌部肝組織, 慢性肝疾患組織, コントロール肝組織のいずれの DNA においても, 24kb より大きなバンドのみが認められた。一方, 肝癌組織 18 例中 13 例 (72.2%) において 24kb より大きなバンドに加えて, 9.4kb, 1.9kb, 1.2kb の 3 種類のバンドのうち 1 本のみ, あるいは 2 本, あるいは 3 本というようにいくつかのバンドの組合せで認められた。残りの 5 例の肝癌組織については, 24kb より大きなバンドのみを認めた。9.4kb, 1.9kb, 1.2kb の 3 種類のバンドの組合せについては, とくに明らかな規則を認めなかった。これらの結果より, 非癌部肝組織, 慢性肝疾患組織, コントロール肝組織では *c-Ki-ras* 遺伝子の CCGG 部位は脱メチル化しておらず, 肝癌組織の約 70% においてある程度脱メチル化しているといえた。しかし, *c-Ki-ras* 遺伝子のどの CCGG 部位が特異的に脱メチル化しているかは, 今回用いたプローブでは決めることができなかった (Table 3)。

6) *c-Ha-ras* 遺伝子の CCGG 部位のメチル化の程度の比較

肝癌組織, 非癌部肝組織, 慢性肝疾患組織, コントロール肝組織のいずれの DNA においても, *Msp* I で消化したとき, Southern 法による解析では明

Table 3. Methylation State of the *c-Ki-ras* Gene

Group	No demethylation (%)	Partial demethylation (%)
HCC tissue	5/18 (27.8)	13/18 (72.2)
Non-tumor tissue from HCC patient	34/34 (100.0)	0/34 (0.0)
Chronic liver disease without HCC	34/34 (100.0)	0/34 (0.0)
Control	31/31 (100.0)	0/31 (0.0)

HCC ; hepatocellular carcinoma

Table 4. Serum HbsAg, gross anatomic Types, anaplastic Grades of Edmondson and Methylation States of the Oncogenes from HCC

Case No.	Serum HBSAg	Gross Anatomic Types	Anaplastic Grades	Hypomethylation of			
				<i>myc 2</i>	<i>myc 3</i>	Ki- <i>ras</i>	Ha- <i>ras</i>
1	—	nodular	II	+	+	+	+
2	—	diffuse	II	+	+	+	+
3	—	diffuse	II	+	—	—	+
4	—	nodular	II	+	—	+	+
5	—	nodular	III	+	—	+	+
6	—	nodular	III	+	+	+	—
7	—	nodular	III	—	—	+	+
8	+	nodular	II	—	—	+	+
9	—	nodular	III	+	—	—	—
10	—	massive	II	+	+	+	+
11	—	nodular	II	+	—	—	—
12	—	nodular	II	+	+	—	+
13	—	diffuse	II	+	+	—	—
14	+	massive	II	—	—	+	+
15	+	nodular	II	+	—	+	+
16	—	nodular	I	—	—	+	+
17	—	nodular	I	—	—	+	—
18	—	nodular	III	+	+	+	+

HCC ; hepatocellular carcinoma

myc 2 ; the second exon of the c-*myc* gene*myc 3* ; the third exon of the c-*myc* gene

瞭なバンドは検出されなかった。一方、同一の DNA を *Hpa* II で消化したとき、24kb より大きなバンドおよび症例により若干異なる数本のバンドの組み合わせからなるパターンで検出された (Fig. 5-a)。*Hpa* II および *Msp* I による消化で、c-Ki-*ras* 遺伝子に比較して明瞭なバンドが得られなかったのは、c-Ha-*ras* 遺伝子上に切断部位が多数あるためと考えられた³⁰⁾。肝癌組織18例中13例 (72.2%) において同じ症例の非癌部肝組織には認められない、より低分子のバンドが認められ、c-Ha-*ras* 遺伝子上の部位は決められないが、いずれかの CCGG 部位が肝癌組織において非癌部と比較してより脱メチル化しているとみなされた。残りの5例の肝癌組織については、同じ症例の非癌部肝組織に認められたものと同様なバンドの組み合わせからなるパターンで検出された。

7) c-*myc*, c-Ki-*ras*, c-Ha-*ras* 遺伝子の CCGG 部位のメチル化の程度の同時比較

肝癌組織18例中4例 (22.2%) において、c-*myc* 遺

伝子第3エクソン、c-Ki-*ras*, c-Ha-*ras* 遺伝子の脱メチル化を同時に認めた。一方、18例中16例 (88.9%) において、三つのうちいずれかの癌遺伝子に、脱メチル化が生じていた。以上より癌遺伝子の脱メチル化は、慢性肝疾患から肝癌が発生する過程において高頻度に生じる遺伝子の変化の一つであると考えられた。それぞれの癌遺伝子の脱メチル化の有無と、肝癌の肝臓内の進展度をあらわす肉眼分類³¹⁾、肝癌細胞の分化度の指標である Edmondson の細胞異型度³²⁾、および慢性肝疾患と肝癌の発生に B 型肝炎ウイルスがかかわっているか否かの指標である血清 HBs 抗原の有無の間に明らかな傾向を認めなかった (Table 4)。

また今回対象とした肝癌症例の大多数は、量、投与方法に個々の違いはあるにせよ、アドリアマイシン、マイトマイシン C 等の抗癌剤の投与を肝組織採取前に受けていた。抗癌剤投与の有無により癌遺伝子の脱メチル化にちがいがあがるかどうかの、ヒト肝癌組織における検討は実際上困難と思われるため、

今後そのような検索を行う場合、ラットの実験肝癌などが適していると考えられる。

考 察

本研究において、若年者のコントロール肝組織において *c-myc* 遺伝子第2エクソンの CCGG 部位はメチル化されていなかったが、中高年齢層のコントロール肝組織においてはすべて部分的にメチル化されていた。これと同様な傾向は、マウスの正常肝の *c-myc* 遺伝子においても報告されている³³⁾。加えて、ヒト胎児肝の *c-myc* 遺伝子の第2エクソンがメチル化されていないことも認められている¹²⁾。これらの事より *c-myc* 遺伝子のこの部位は、ヒト正常肝においても加齢によりメチル化の修飾を受けているといえよう。一方、非癌部肝組織、慢性肝疾患組織の両方において、第2エクソンの CCGG 部位が、中高年齢層のコントロール肝組織に比べて、より強く脱メチル化していた。非癌部肝組織と肝癌を合併しない慢性肝疾患組織の間でこの部位の脱メチル化の頻度に明らかな差を認めなかった。

以上の結果より、*c-myc* 遺伝子の第2エクソンの CCGG 部位の脱メチル化は慢性肝疾患に本質的に関係しており、肝癌の合併の有無に影響されないのではないかと考えられる。また、正常肝が慢性肝疾患におかされると、おそらくそのメチル化状態は幼児期あるいは胎児期の肝のメチル化状態にもどるのではないかと考えられる。

何例かの肝癌組織において *c-myc* 遺伝子の第3エクソンと *c-Ki-ras* 遺伝子の CCGG 部位の脱メチル化が認められたが、非癌部肝組織、慢性肝疾患組織、コントロール肝組織においては認められなかった。また何例かの肝癌組織において、同じ症例の非癌部肝組織と比較して、*c-Ha-ras* 遺伝子の CCGG 部位が、より脱メチル化していた。このことより、肝癌が発生する過程で *c-myc* 遺伝子の第3エクソンと *c-Ki-ras*, *c-Ha-ras* 遺伝子の CCGG 部位の脱メチル化が生じるのではないかと考えられる。加えて、何例かの肝癌組織において二つもしくは三つの癌遺伝子が脱メチル化していたことは、トランスフォーメーションに複数の癌遺伝子の活性化が必要であるということ³⁴⁾と関係があるかもしれない。

肝癌のみならず慢性肝疾患において、どのように

して DNA の脱メチル化が起きるかは、以下のように考えられる。DNA 上の CG 部位のメチル化状態のパターンは DNA 合成後もトランスメチラーゼによって維持され、一旦確立されると、次の細胞にも引き継がれる^{35,36)}。慢性肝疾患すなわち肝硬変と慢性肝炎は、持続する肝細胞壊死とそれに対する代償的な再生を病態とする。この結果として起こる細胞分裂と DNA 合成の亢進が、DNA のメチル化の低下を引き起こす可能性がある。事実、化学発癌によってできたラット肝の前癌病変^{37,38)} および肝癌組織³⁷⁾のみならず、部分肝切除後の再生肝^{37,38)}においても DNA のメチル化の低下が認められている。

ここで、はたして脱メチル化された癌遺伝子が肝癌および慢性肝疾患において活性化されているか否かという疑問が生じる。DNA の脱メチル化は遺伝子の転写活性を高めたり、クロマチン構造を変化させたりすることにより、癌の発生に影響を及ぼしているとされている³⁹⁾。しかし一方、DNA の脱メチル化は遺伝子の活性化にいたる多くのステップのひとつであり、ある種の遺伝子の活性化のためには必要条件となるが十分条件とはならないとも考えられている⁴⁰⁾。本研究では *c-myc* 遺伝子に関しては、第2、第3エクソン、すなわち *c-myc* 蛋白に翻訳される部分においては肝癌あるいは慢性肝疾患において脱メチル化を認めたものの、転写プロモーターが存在する第1エクソン付近は、それぞれの組織の間で差異を認めなかった。加えて、*c-Ki-ras*, *c-Ha-ras* 遺伝子に関しては、遺伝子のどの部位で脱メチル化が生じているのかまでは明らかに出来なかったため、これらの癌遺伝子において脱メチル化が転写活性の増大に関与しているのではないかという有力な結果は得られなかった。

最近、肝癌組織および非癌部肝硬変組織において、正常肝および慢性肝炎組織に比較して *c-myc* 遺伝子の発現が増加しており、肝癌組織と非癌部肝硬変組織のあいだでは明らかな差が認められないという報告がされている¹¹⁾。一方、本研究では肝硬変と慢性肝炎のあいだで *c-myc* 遺伝子の第2エクソンの CCGG 部位の脱メチル化の頻度に明らかな差が認められず、当教室の南部ら¹³⁾がすでに指摘したように肝癌組織においてのみ *c-myc* 遺伝子の第3エクソンの CCGG 部位の脱メチル化が認められた。それゆ

え, *c-myc* 遺伝子の脱メチル化と発現は必ずしも結びついておらず, 第2, 第3エクソンのCCGG部位の脱メチル化は *c-myc* 遺伝子の活性化の十分条件とはなっていないのではないかと考えられる。

c-myc 遺伝子第2エクソンのCCGG部位の脱メチル化は, 持続する肝細胞壊死とそれに対する代償的な再生をきたす慢性肝疾患における病態と関連を有しており, そこに肝癌が発生する過程で *c-myc* 遺伝子の第3エクソンあるいは *c-Ki-ras*, *c-Ha-ras* 遺伝子の脱メチル化等が生じることが考えられるが, これらの癌遺伝子の脱メチル化が肝癌発生の原因であるのか結果であるのかは, 本研究では明らかにすることが出来なかった。それゆえ, この研究に加えてさらに以下のことが行われるべきである。

第一に, 肝癌および慢性肝疾患における癌遺伝子の発現増加の有無を Northern 法や免疫組織化学的方法により検討すること, また, 脱メチル化された癌遺伝子にトランスフォーミング活性があるか否かもトランスフェクション法によって検討する必要がある。

第二に, 実験肝癌における肝癌組織および前癌病変, あるいはヒトの他臓器の癌組織と前癌病変, 例えば大腸癌組織と大腸ポリープ等を対象として, どの段階で癌遺伝子の脱メチル化が生じるかを見ること, 加えてラットの部分肝切除後の再生肝でヒトの慢性肝疾患と類似した癌遺伝子の脱メチル化が見られるか否かの確認が必要となろう。

第三に, 本研究では *c-myc* 遺伝子に関しては, 第1から第3エクソンまでの範囲を検討し, *c-Ki-ras*, *c-Ha-ras* 遺伝子に関しては, 遺伝子のどの部位で脱メチル化が生じているかまでは言及できなかったが, 一般に転写活性の調節には遺伝子の5'側が関係しているとされているので, 今後プローブを工夫してこれらの遺伝子の5'側のメチル化状態を検討する必要がある。

第四に, 今回メチル化の修飾に意義を有するとされるCG配列のうち, 制限酵素 *Hpa* II を用いてCCGG配列のみを見ているが, これのみですべてのCG配列を検討したとはいえない。そこで, GCGC配列のメチル化状態を検討できる制限酵素 *Hha* I なども用いる必要がある。

第五に, 本研究では対象として肝組織を用いたが,

肝組織には肝細胞以外の細胞も若干含まれているため, 肝細胞のメチル化状態をより明瞭に見るために, 今後肝組織から分離された肝細胞あるいは cell line を用いることも考慮すべきであろう。

また, 本研究では, *c-Ki-ras* および *c-Ha-ras* 遺伝子の脱メチル化を肝癌組織において比較的高頻度に認めたが, 肝癌の分子生物学的診断という臨床的な立場からも, 遺伝子の脱メチル化に限らず, 感受性および特異性の高い癌遺伝子の変化を今後検索してゆくべきであろう。

本研究を行うにあたり, 終始適切な助言を頂いた富山医科薬科大学和漢薬研究所病態生化学部門, 荻田善一教授に深謝致します。さらに Ryc-7.4 プローブを供与して頂いた The Wistar Institute, Dr. C. M. Croce, 肝組織を提供して頂いた富山医科薬科大学病理学第1, 第2教室, 外科学第1, 第2教室に感謝いたします。

文 献

- 1) Razin A. and Szyf M.: DNA methylation patterns. Formation and function. *Biochim. Biophys. Acta* **782**: 331-342, 1984.
- 2) Riggs A. D. and Jones P. A.: 5-Methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv. Cancer Res.* **40**: 1-30, 1983.
- 3) Reeves R.: Transcriptionally active chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* **782**: 343-393, 1984.
- 4) Hoffman R. M.: Altered methionine metabolism, DNA methylation and oncogene expression in carcinogenesis. A review and synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **738**: 49-87, 1984.
- 5) Land H., Parada L. F. and Weinberg R. A.: Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* **222**: 771-778, 1983.
- 6) Ochiya T., Fujiyama A., Fukushima S., et al.: Molecular cloning of an oncogene from a human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4993-4997, 1986.
- 7) Nakagama H., Ohnishi S., Imawari M., et

- al. : Identification of transforming genes as *hst* in DNA samples from two human hepatocellular carcinomas. Jpn. J. Cancer Res. **78** : 651- 654, 1987.
- 8) Gu J. R., Hu L. F., Cheng Y. C. and Wan D. F. : Oncogenes in human primary hepatic cancer. J. Cell. Physiol. **129** (Suppl. 4) : 13-20, 1986.
- 9) Su T. S., Lin L. H., Lui W. Y., et al. : Expression of *c-myc* gene in human hepatoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. **132** : 264-268, 1985.
- 10) Zhang X. K., Huang D. P., Chiu D. K. and Chiu J. F. : The expression of oncogenes in human developing liver and hepatomas. Biochem. Biophys. Res. Commun. **142** : 932-938, 1987.
- 11) Himeno Y., Fukuda Y., Hatanaka M. and Imura H. : Expression of oncogenes in human liver disease. Liver **8** : 208-212, 1988.
- 12) Kaneko Y., Shibuya M., Nakayama T., et al. : Hypomethylation of *c-myc* and epidermal growth factor receptor genes in human hepatocellular carcinoma and fetal liver. Jpn. J. Cancer Res. **76** : 1136-1140, 1985.
- 13) Nambu S., Inoue K. and Sasaki H. : Site-specific hypomethylation of the *c-myc* oncogene in human hepatocellular carcinoma. Jpn. J. Cancer Res. **78** : 695-704, 1987.
- 14) Iguchi-Ariga S. M. M., Itani T., Kiji Y. and Ariga H. : Possible function of the *c-myc* product : promotion of cellular DNA replication. EMBO J. **6** : 2365-2371, 1987.
- 15) Kamata T. and Feramisco J. R. : Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of *ras* oncogene proteins. Nature **310** : 147-150, 1984.
- 16) Shafritz D. A., Shouval D., Sherman H. I., et al. : Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. N. Engl. J. Med. **305** : 1067-1073, 1981.
- 17) Cheah M. S. C., Wallace C. D. and Hoffman R. M. : Hypomethylation of DNA in human cancer cells : a site specific change in the *c-myc* oncogene. JNCI **73** : 1057-1065, 1984.
- 18) Southern E. M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98** : 503-517, 1975.
- 19) Nishikura K., ar-Rushdi A., Erikson J., et al. : Differential expression of the normal and of the translocated human *c-myc* oncogenes in B cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** : 4822-4826, 1983.
- 20) Watt R., Stanton L.W., Marcu K. B., et al. : Nucleotide sequence of cloned cDNA of human *c-myc* oncogene. Nature **303** : 725-728, 1983.
- 21) Alitalo K., Schwab M., Lin C. C., et al. : Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (*c-myc*) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80** : 1707-1711, 1983.
- 22) McCoy M. S., Bargmann C. I. and Weinberg R. A. : Human colon carcinoma *Ki-ras2* oncogene and its corresponding proto-oncogene. Mol. Cell. Biol. **4** : 1577-1582, 1984.
- 23) Pulciani S., Santos E., Lauver A. V., et al. : Transforming genes in human tumors. J. Cell. Biochem. **20** : 51-61, 1982.
- 24) Feinberg A. P. and Vogelstein B. : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. Anal. Biochem. **132** : 6-13, 1983.
- 25) Feinberg A. P. and Vogelstein B. : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. Addendum. Anal. Biochem. **137** : 266-267, 1984.

- 26) Waalwijk C. and Flavell R. A. : *Msp* I, an isoschizomer of *Hpa* II which cleaves both unmethylated and methylated *Hpa* II sites. *Nucleic Acids Res.* **5** : 3231-3236, 1978.
- 27) Battey J., Moulding C., Taub R., et al. : The human *c-myc* oncogene : structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* **34** : 779-787, 1983.
- 28) Colby W.W., Chen E. Y., Smith D. H. and Lewinson A. D. : Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the *v-myc* oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29. *Nature* **301** : 722-725, 1983.
- 29) Siebenlist U., Henninghausen L., Battey J. and Leder P. : Chromatin structure and protein binding in the putative regulatory region of the *c-myc* gene in Burkitt lymphoma. *Cell* **37** : 381-391, 1984.
- 30) Capon D. J., Chen E. Y., Levinson A. D., et al. : Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* **302** : 33-37, 1983.
- 31) Eggel H. : Über das primäre Carcinom der Leber. *Beitr. z. Path. Anat. u. z. allgem Pathol.* **30** : 506-504, 1901.
- 32) Edmondson H. A. and Steiner P. E. : Primary carcinoma of the liver. A study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* **7** : 462-503, 1954.
- 33) Ono T., Tawa R., Shinya K., et al. : Methylation of the *c-myc* gene changes during aging process of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139** : 1299-1304, 1986.
- 34) Land H., Parada L. F. and Weinberg R. A. : Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating cocogenes. *Nature* **304** : 596-601, 1983.
- 35) Pollack Y., Stein R., Razin A. and Cedar H. : Methylation of foreign DNA sequences in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** : 6463-6467, 1980.
- 36) Wigler M., Levy D. and Perucho M. : The somatic replication of DNA methylation. *Cell* **24** : 33-40, 1981.
- 37) Lapeyre J. N. and Becker F. F. : 5-Methylcytosine content of nuclear DNA during chemical hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87** : 698-705, 1979.
- 38) Kanduc D., Ghoshal A., Quagliariello E. and Farber E. : DNA hypomethylation in ethionine-induced rat preneoplastic hepatocyte nodules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150** : 739-744, 1988.
- 39) Goelz S. E., Vogelstein B., Hamilton S. R. and Feinberg A. P. : Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* **228** : 187-190, 1985.
- 40) Jones P. A. : DNA methylation and cancer. *Cell* **46** : 461-466, 1986.