

大腸直腸癌之致癌過程與 P16/CDKN2 基因高度甲基化之探討

計畫編號：NSC88-2314-B-002-231

執行期限：87 年 08 月 01 日至 88 年 07 月 31 日

主持人：張金堅教授 執行機構及單位名稱台大醫學院外科

一、中文摘要

背景/目標：

p16 基因之 promoter region 的過度甲基化可能與大腸直腸癌的致癌過程有關，然而其臨床與生物學意義仍隱晦不明。

研究材料及方法：

我們共收集了 84 例經根治切除後之 T3NoMo 期原發性大腸直腸癌。我們以甲基化特異性多聚合酵素鏈反應來評估 p16-hypermethylation 狀態，p53 基因的過度表現是以免疫螢光染色的方法來分析。K-ras 基因之第 12 號和第 13 號密碼子之突變是以限制酵素來做篩選。DCC 基因之喪失異合子性是用位於 DCC 基因 (18q21) 之特殊微小衛星引子所做之多聚合酵素鏈反應來做檢驗。DNA 複製錯誤則分別用位於 7 個不同染色體位置之微小衛星標記來偵測。

結果：

p16-hypermethylation 可在 28.6% (24/84) 的腫瘤中發現。換句話說，即有 28.6% 的偶發性 T3NoMo 期大腸直腸癌之 p16 基因喪失活性。我們發現 p16-hypermethylation 與包括年齡、性別、腫瘤位置、腫瘤大小、生長型態、腫瘤分化程度、黏液產生、血管和/或淋巴管侵犯、腫瘤中淋巴球浸潤、以及血清癌胚抗原濃度等臨床病理因子，並不具統計學上有意義之相關 ($p>0.05$)。p16-hypermethylation 亦與 K-ras 基因突變、p53 基因過度表現、以及 DCC 基因的喪失異合子性不具統計學上之關連 ($p>0.05$)。然而，p16-hypermethylation 卻與 DNA 複製錯誤具統計學顯著之相關 ($P=0.01$)。對病患之存活分析亦顯示 p16-hypermethylation 腫瘤比 non-p16-hypermethylation 腫瘤在預後方面顯著較差 ($p=0.0001$)。

結論：

本研究顯示 p16-hypermethylation 確實與某次群之大腸直腸癌致癌機轉有關，而且具 p16-hypermethylation 之 T3NoMo 期腫瘤，可以預測其術後存活率較差。

關鍵詞：p16、p16INK4a、MTS1、CDKN2A、甲基化、大腸直腸癌、甲基化特異性多聚合酵素鏈反應

Abstract

Background / Aims :

Hypermethylation in the promoter region of p16 gene was suspected to be involved in the tumorigenesis of colorectal cancers, although the clinical and biologic significance remains obscure.

Material and Methods :

We collected 84 T3NoMo stage primary colorectal cancers that were curatively resected. The clinicopathologic data were reviewed. The p16-hypermethylation was determined by methylation-specific polymerase chain reaction. The p53 overexpression was detected by immunocytochemistry. The point mutations in 12 and 13 codons of K-ras gene were screened by restriction enzyme analysis. Loss of heterozygosity of DCC (Deleted in Colorectal Cancer) gene was examined by polymerase chain reaction using primers of DCC (18q21) microsatellite marker. The DNA replication error was examined using 7 microsatellite markers at distinct chromosomal loci.

Results :

The p16-hypermethylation, regarded as an indication of p16 inactivation, was evident in 24 (28.6%) of the tumors. No correlation was observed between p16-hypermethylation and various clinicopathologic factors including age, sex, tumor location, tumor size, growth pattern, tumor differentiation, mucin production, vascular and/or lymphatic invasion, lymphocyte infiltration within the tumor, and serum level of carcinoembryonic antigen ($p>0.05$). There was no association between p16-hypermethylation and K-ras gene mutation, p53 overexpression, and loss of heterozygosity of DCC gene ($p>0.05$). However, p16-hypermethylation was significantly associated with DNA replication error ($p=0.01$). Survival analysis revealed a significant survival disadvantage of p16-hypermethylation than

non-p16-hypermethylation
($p=0.0001$).

tumors

Conclusions :

This study indicated that p16-hypermethylation plays a role in the carcinogenesis of a subset of colorectal cancers; and the presence of p16 hypermethylation predicts shorter survival in T3NoMo stage colorectal cancers.

Key words : p16、p16INK4a、MTS1、CDKN2A、methylation、colorectal cancers、methylation-specific PCR

二、緣由與目的

p16 基因亦稱為 MTS-1 (major tumor suppressor 1)、INK4a (inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a)、以及 CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), 其是特定作用在細胞週期中 G1 期的調節性基因 [Liggett et al. 1998]。在人類基因組中, p16 基因位於 9P21 且包括三個表現子 (exons), 其所控制合成的蛋白共含 156 個胺基酸, 且分子量約為 15.8kd。p16 蛋白會與 CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) 或 CDK6 結合, 因而抑制 cyclin D 的作用, 而使細胞週期停滯在 G1 期 [Kamb et al. 1994, Serrano et al. 1993]。cyclin D 的主要功能是藉由與 CDKs 的結合, 而變成一具活性的 cyclin D-CDK complex, 而將 pRB 蛋白磷酸化 (phosphorylation), 接著便導致 E2F 蛋白釋放以及造成許多細胞中重要調節基因的轉錄 (transcription), 於是乎細胞週期便向前啟動 [Sherr CJ, 1993]。因此, p16 基因一直便被認為具有抑制癌細胞成長作用, 而其主要的生化學上功能則是使細胞週期在停止在 G1 至 S 期的交界處。當 p16 基因喪失功能時, 細胞週期便無所節制地向前推進, 其會導致細胞之過度增殖, 終於造成癌症的產生。

就分子遺傳學的觀點而言, p16 基因可以透過同合子性刪除 (homozygous deletion) 或點突變 (point mutation) 的作用機轉而導致活性喪失, 而事實上在許多人類的原發性癌及這些癌瘤所培養出來的細胞株均證明 p16 基因可以透過這二種機轉而發生去活化 [Kamb et al. 1994, Nobori et al. 1994, Spruck et al. 1994, Cairns et al. 1995, Hussusian et al. 1994, Okamoto et al. 1994, Caldas et al. 1994, Wu et al. 1996, Igaki et al. 1995]。然而, 近年來的研究則更進一步指出 promoter region 之 5' CpG islands 的新生性甲基化 (de novo methylation), 或所謂過度甲基化 (hypermethylation), 可能是 p16 基因之轉錄喪失 (transcriptional inactivation) 的另一

項重要機轉 [Counts et al. 1995, Bird et al. 1992, Merlo et al. 1995, Gonzalez-Zulueta et al. 1995, Herman et al. 1995]。就大腸直腸癌而言, 過去的研究從未發現癌細胞株之 p16 基因發生 homozygous deletion [Kamb et al. 1994, Okamoto et al. 1994, Herman et al. 1995]。再者, p16 基因之點突變現象也從未在大腸直腸癌組織中發現過。這些研究結果顯示過度甲基化可能是大腸直腸癌之 p16 基因去活化的另一項機轉。然而, 目前文獻上報告有關大腸直腸癌之 p16 基因過度甲基化出現的比例仍差別甚大 [Cairns et al. 1995, Gonzalez-Zulueta et al. 1995, Herman et al. 1995, Herman et al. 1996]。因此, 大腸直腸癌之 p16 基因的過度甲基化狀態仍然隱晦未明。另外就臨床的觀點而言, p16 基因過度甲基化的預後意義仍付諸闕如。因此, 在大腸直腸癌中, p16 基因的過度甲基化狀態實在有進一步研究的必要。

在本研究中, 我們以 Herman 等人所發明之甲基化特异性多聚合酶鏈反應 (methylation-specific polymerase chain reaction, MSP) 來偵測原發性大腸直腸癌 p16 基因之過度甲基化現象 [Herman et al. 1996]。然後再將 p16 基因的過度甲基化狀態再與各項臨床病理因子以及包括 K-ras 基因突變, p53 基因過度表現 (overexpression)、DCC 基因的喪失異合子性 (loss of heterozygosity, LOH)、以及 DNA 複製錯誤 (replication error, RER) 等多項分子遺傳因子做關連分析。我們深信本研究將有助於了解 p16 基因之過度甲基化在 T3NoMo 期大腸直腸癌之臨床病理意義和致癌角色。

三、結果與討論

在所有 84 位偶發性大腸直腸癌的病患中, 出現 p16-hypermethylation 陽性的比例為 28.6% (24/84)。在 p16-hypermethylation 陽性的腫瘤中, 62.5% (15/24) 出現 p16-hypermethylation (M) 和 p16-unmethylation (U) 之 PCR 產物併存的現象 (圖 6.1), 而另外 37.5% (9/24) 之腫瘤僅產生 p16-hypermethylation 的 PCR 產物。每個大腸直腸癌組織之相對應的正常大腸黏膜組織均只產生 p16-unmethylation 的 PCR 產物。

這些經根治切除之腫瘤依其 P16 基因甲基化狀態被劃分成二群 (即 p16-hypermethylation 和 non-p16-hypermethylation) 並與臨床病理資料做關聯比較 (表 6.1)。p16-hypermethylation 與包括年齡、性別、腫瘤位置、腫瘤大小、生長型態、腫瘤分化、黏液產生、腫瘤細胞血管和/或淋巴管浸潤、腫瘤中淋巴球浸潤、以及血清癌胚

抗原 (CEA) 濃度等臨床病理因子並不具統計學上有意義的相關 ($p>0.05$)。p16-hypermethylation 亦與 K-ras 基因突變、p53 過度表現、DCC 基因之 LOH 不具統計學上有意義的關聯 ($p>0.05$)。然而，我們發現 p16-hypermethylation 卻明顯與 DNA replication error 有關 ($P=0.01$, two-tailed Fisher exact test)。

具 p16-hypermethylation 之腫瘤在預後方面顯然較差 ($P=0.0001$)：5 年存活率在 p16-hypermethylation 與 non-p16-hypermethylation 之腫瘤分別為 25% 與 72% (圖 6.2)

表 6.1 在 84 位 T₃NoMo 期大腸直腸癌中之 p16 基因過度甲基化現象與各種臨床病理表徵及分子遺傳因子的關連比較

	p16-hypermethylation (n=24)	non-p16-hypermethylation (n=60)	P value
Age (mean± SD)	62.5± 10.2	61.8± 8.0	NS
Gender			
male	13	32	NS
female	11	28	
Tumor location			
proximal	14	39	NS
distal	10	21	
Tumor size			
<5cm	21	47	NS
≥5cm	3	13	
Growth pattern			
polypoid	9	27	NS
ulcerative	15	33	
Tumor Differentiation			
Well	6	17	
Moderate	16	39	NS
Poor	2	4	
Mucin Production			
+	2	4	NS
-	22	56	

承上

	p16-hypermethylation (n=24)	non-p16-hypermethylation (n=60)	P value
Vascular/Lymphatic Invasion			
+	17	37	NS
-	7	23	
Lymphocyte Infiltration			
+	12	34	NS
-	12	26	
CEA (ng/mL)			
<3	11	37	
3.5~10	9	17	NS
>10	4	6	
K-ras mutation			
+	8	27	NS
-	16	33	
p53-overexpression			
+	14	31	NS
-	10	29	
LOH of DCC informative (n=52)			
+ (n=23)	7	16	NS
- (n=29)	7	22	
DNA replication error			
+	13	14	0.01
-	11	46	

Abbreviations : NS : not significant ; LOH : loss of heterozygosity

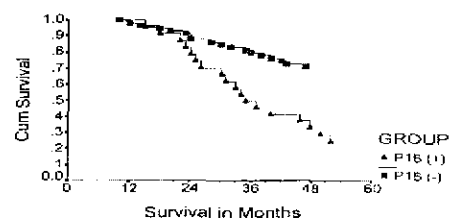


圖.2 經根治切除後之 T₃NoMo 期大腸直腸癌以 Kaplan-Meier 方法分析其存活狀況。p16 基因過度甲基化 (▲) 之病患比 p16 基因未過度甲基化 (■) 之病患，在存活率方面顯著較差 ($P=0.0001$, log-rank test)。

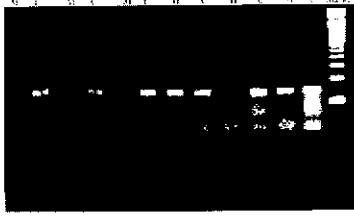


圖.1 用 MSP 的方法來分析大腸直腸癌組織(T)及相對應之正常大腸黏膜組織(N)的 p16 基因過度引基化狀況。PCR 的進行是採用二種引子組，放大未甲基化 p16 基因之引子記錄為(U)，而放大甲基化 p16 基因之引子則記錄為(M)。病患①屬 p16 基因過度甲基化陰性；而病患②和③則屬 p16 基因過度甲基化陽性。右列之電泳帶為 100-bp 之階梯標記。p16 基因過度甲基化與未過度甲基化的產生之 PCR 產物分別為 150-bp 與 151-bp。

在本研究中，我們以 MSP 的方法鑑定出 p16-hypermethylation 約可在 28.6% 之 T3NoMo 期原發性大腸直腸癌中發現。文獻上先前的研究已指出 p16-hypermethylation 約可在 10 至 40% 的原發性大腸直腸癌中發現 [Liggett et al. 1998, Gonzalez-Zulueta et al. 1995, Herman et al. 1995]。因此，本研究中 p16-hypermethylation 之比例應與上述之研究結果出入不致太大。大腸直腸癌中 p16-hypermethylation 之比例在各 series 中之所以變異這麼大可能導因於各研究所用的方法不同。以往 mapping 基因組 DNA 之 methylation regions 基本上均仰賴 Southern hybridization 的方法，其原理是當基因組 DNA 中含有一個以上之 methylated CpG sites 時，其便無法被 methylation-sensitive restriction enzyme 所切斷 [Merlo et al. 1995, Herman et al. 1995]。Southern blot 的方法可以對 CpG islands 之整個 methylation 狀態做一評估，而另外也能夠做一些甲基化狀態的定量分析 [Issa et al. 1994]。然而，Southern blot 的缺點是分析時需要較大量（通常需 5 μ g 以上）的高分子量 DNA、偵測的敏感度較差（只有對偶基因中出現某些比例以上之 methylation 時方能偵測到），以及只能偵測到 methylation-specific restriction enzyme 所能切割位置之 CpG island 的 methylation 情況（其他非 restriction enzyme 所能認識之 DNA 位置的甲基化狀態則無法評估）。另外一種偵測 methylation 較為敏感的方法則是併用 methylation-sensitive enzymes 和 PCR [Gonzalez-Zulueta et al. 1995]。在將 DNA 以限制酵素處理之後，methylated genomic DNA 由於不被限制酵素切割，因此其 DNA 尚屬完整而可以被特殊的 primer

黏上，然而再經 PCR 反應後，該 DNA 片段便可被放大而偵測出來。基本上，此種方法與 Southern blot 相同，因其亦僅能偵測出限制酵素切割位置之 CpG island 的 methylation 狀況。再者，在這些反應中，unmethylated DNA 必須經限制酵素分解完全，因一旦有任何未切割之 DNA 被 PCR 放大出來時，勢必產生偽陽性 (false positive) 結果。此種方法在某些情況下相當有用，例如在研究 imprinted genes [Tremblay et al. 1995, Razin et al. 1991, Stoger et al. 1993] 或 X chromosome-inactivated genes [Singer-sam et al. 1990] 時，由於這些我們有興趣的對偶基因中，有較高的比例會出現 methylation，故此種方法亦發揮相當不錯的偵測效果。然而，此種方法之缺點在於很難區別到底是限制酵素對 genomic DNA 分解不完全 (incomplete restriction) 抑或 genomic DNA 之對偶基因中只有少數發生 methylation，此項缺點使得此種方法變得不可靠，特別是在微量的組織檢體中分析抑癌基因的過度甲基化 (hypermethylation)、或者檢體 genomic DNA 中所含之 methylated alleles 比例甚低等二種情況下，會使 methylation 的分析結果變得不可信賴。西元 1996 年，Herman 等人提出一種新的 PCR 方法並取名為 MSP (methylation-specific PCR)，其能快速分析 CpG islands 的甲基化狀態 [Herman et al. 1996]。MSP 的原理是 methylated 和 unmethylated genomic DNA 在經 bisulfite 處理過後，其 DNA 序列便不同，於是在 PCR 過程能黏附上去之引子便各自不同，而若能設計上述能區別 methylated DNA 和 unmethylated DNA 的特殊引子，則便能藉助 PCR 之便而區分此二種 DNA。正如 Herman 等人之實驗所顯示的，MSP 確實比以前許多其他分析 methylation 的方法要好很多。MSP 在敏感度 (sensitivity) 方面顯然比 Southern blot 要好很多。因此，MSP 便能偵測到微量 DNA 檢體中之少數比例對偶基因之甲基化變化。再者，MSP 能檢驗所有 CpG islands 上的甲基化狀態，而非僅能分析限制酵素所能認識之少數切割點的甲基化變化。此種方法可以說對整個 CpG island 上之甲基化狀態做全盤、快速、且精緻的分析。就 p16 基因而言，Herman 等人指出即使 methylation 和 unmethylation 僅在 8-bp 的差別時，亦能用 MSP 的方法偵測出來 [Herman et al. 1996]。另外，MSP 亦可排除上述因限制酵素分解不完全所導致的偽陽性 (false positive) 情況，偽陽性是以前之 PCR 方法在偵測 genomic DNA 甲基化過程所無法避免的。

在本研究中，我們發現 MSP 實在是檢驗 CpG-rich region 甲基化狀態的一種簡易、敏感、且具專一性 (specific) 的方法。

值得一提的是 Gonzalez-Zulueta 等人卻發現正常的大腸黏膜細胞亦有可能會出現 p16-hypermethylation 的現象 [Gonzalez-Zulueta et al. 1995]。然而，Herman 等人卻並未發現正常大腸黏膜有任何過度甲基化的跡象 [Merlo et al. 1995, Herman et al. 1995]。這二個研究群針對此一實驗結果的不一致現象做深入討論，然而並未達到具體的結論。在控制組，也就是正常大腸黏膜中，我們並未發現 p16-hypermethylation 的存在。再者，我們發覺大部份具 p16-hypermethylation 之大腸直腸癌 (62.5%) 在進行 MSP 後卻出現 p16-hypermethylation 和 p16-unmethylation 這二種 PCR 產物。此種現象之原因有二：(1) 在腫瘤細胞中，p16-hypermethylation 的現象是異合子性的 (heterozygous)，即只存於半套的染色體 (hemizygous) 中而已；(2) 在受檢之腫瘤標本含有相當大量的正常黏膜細胞。曾有報告指出培養之癌細胞株中出現 p16-hypermethylation 的比例會比原發性腫瘤組織來得高 [Liggett et al. 1998, Herman et al. 1995]，其原因可能是實驗技巧上的差別，或者也可能原始之腫瘤所含的細胞群就 p16-hypermethylation 這一點而言具有很大的變異性 [Spruck et al. 1994, Cairns et al. 1994, Okamoto et al. 1994]。因此，為了闡明這些紛爭，我們可能還要針對這些具 p16-hypermethylation 的腫瘤進行細胞株培養，然後再進行 MSP 以資比對。事實上，我們也已著手利用 RT-PCR, ICC, 以及 Western blot 的方法來研究 p16 蛋白的表現情況。我們深信若能將 p16 基因組之 hypermethylation 型態與蛋白質表現狀態做進一步比對，則將有助於了解台灣地區大腸直腸癌之 p16 基因表現的地域特徵。

四、計畫成果自評

目前大概學者們均認為 RER+ 的大腸直腸癌在預後方面要比 RER- 者更佳 [Aaltonen et al. 1994, Ionov et al. 1993, Thibodeau et al. 1993, Kim et al. 1994]。然而，在本研究中我們發現 p16-hypermethylation 顯著與 RER 有關，可是這些 p16-hypermethylation 病患卻在 5 年存活率方面顯著較差。此研究結果實在耐人尋味！我們的解釋包括下列：(1) 既然 p16-hypermethylation 是屬 epigenetic 的變化，因此其便容易受環境以及發展過程之許多因子的影響。本研究中之具 p16-hypermethylation 腫瘤的預後較差可能正顯示東西方地域不同因而所產生之 CRCs 的生物行為亦不同；(2) p16-hypermethylation 可能顯示具備此種變化之癌細胞基因組特別容易發生 de novo methylation [Ahuja et al. 1997, Lengaur et al. 1997]。因此，此類癌細胞中所伴隨之一些

輔因子 (cofactors) 或多重基因的變化可能造成這些具 p16-hypermethylation 之腫瘤在生物學上特別具侵襲性；(3) 由於本研究中具 p16-hypermethylation 之腫瘤數目有限，而且統計學上亦使用單變數分析 (univariate analysis)，因此，為了更詳細闡明 p16-hypermethylation 的臨床預後意義，實在該進一步收集更多的病例來做多變數分析 (multivariate analysis)。從過去以來，關於 T3NoMo (Dukes' B2) 期 CRCs 之治療一直有爭論存在 [Mortel et al. 1995]。因此，若能對 T3NoMo 期 CRC 病患之預後情況做更準確的評估，則不論在術式的選擇或輔佐療法的選用均甚有幫忙。拜分子生物學技術快速發展之賜，目前分析 p16-hypermethylation 已變得簡易可行而能充當臨床實際治療病人的運用。

五、參考文獻

1. Liang JT, Chang KJ, Chen JC et al. Clinicopathology and carcinogenetic appraisal of DNA replication error in sporadic TsNoMo stage colorectal cancer after curative resection. *Hepato-Gastroenterol* 1999; 46: 883-890.
2. Liang JT, Chang KJ, Chen JC et al. hypermethylation of p16 gene in sporadic TsNoMo stage colorectal cancers: Association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 1999; 57: 149-156.