

Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杜, 春平 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2899

博士(医学) 杜 春平

論文題目

Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer

(胃がんにおけるシトシン修飾の厳密な定量と関連酵素の発現変化)

論文の内容の要旨

[はじめに]

胃がんにおける腫瘍抑制遺伝子や遺伝子不安定性に関わる遺伝子のプロモーター領域のシトシンのメチル化(5-メチル化シトシン, 5-mC)についての研究は多数あるが、このメチル化は生体内で可逆的であり、酸化されて 5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC)の状態を経て、5-フォルミルシトシン(5-formylcytosine, 5-fC)、さらに 5-カルボキシシトシン(5-carboxycytosine, 5-caC)となり、チミン DNA グリコシラーゼ(Thymine DNA glycosylase, TDG)によって塩基除去修復を受けて、もとのシトシンにもどる。この前半の酸化を司る酵素群が ten-eleven translocation (TET) family タンパク質ファミリーであり、この酸化反応は生体内の 2 価の鉄イオンや α -ケトグルタル酸に依存する。後者の生成にはイソクエン酸デヒドロゲナーゼ IDH1, 2 が関与する。

本研究は、胃がんおよび胃粘膜における、これらのシトシン修飾物を、厳密な定量法、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(LC-MS/MS)によって解析し、さらに関連する酵素 TET1-3, TDG, IDH1, 2 を定量的 RT-PCR で測定して、種々の病理学的な指標と比較したものである。

[材料ならびに方法]

胃がんおよび周辺粘膜は浜松医科大学医学部附属病院の病理検体から採取し、液体窒素で固定、 -70°C で保存した。58 例の内訳は男性 35 例、女性 23 例で、平均年齢は 66.9 才(標準偏差 11.9 才)。病理学的には 26 例が腸型、32 例が弥漫型で、いずれも手術可能例で、stage は I, II, III 期である。本研究は浜松医科大学遺伝子解析研究倫理委員会で承認済みである(23-91)。5-mC, 5-hmC, 5-fC, 5-caC は LC-MS/MS によって同位体標準品を用いて測定した。うち 42 例については TET1-3, TDG, IDH1-2 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR で腫瘍部・非腫瘍部のペアで定量した。18 例については、TET1-3 の coding 領域の塩基配列を決め、体細胞変異や多型の有無を検索した。また、TET1-3 の全長プラスミドや、既知の TET2 の酵素活性領域の変異体プラスミドを合成して、細胞株 HEK293T に導入し、これらの変異体のシトシン修飾への影響を調べた。さらに、hmC の定量については、LC-MS/MS 法と、従来よく使用されている hmC に対する抗体を用いた dot blot による半定量測定と比較してみた。結果の数値は Mann-Whitney U-test, Student t-test, one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test, Pearson chi-square, Fisher exact test, linear regression analysis を

用いて統計的解析を行った。

[結果]

LC-MS/MS で測定すると胃粘膜あるいは胃がん組織中 10^4 個のシトシンあたりの 5-mC は 292.00 から 430.62 個であり、5-hmC は 1.63 から 19.54 個であった。5-mC の中央値は非腫瘍部で 377.92、腫瘍部で 366.66 であり腫瘍部でやや少なかった ($P=0.021$)。いっぽう 5-hmC の中央値はそれぞれ 9.63 と 3.32 であり腫瘍部での著しい減少がみられた ($P<0.001$)。Real time RT-PCR では TET1, TET2, TET3, TDG, IDH2 は腫瘍部で有意に発現が低下していた。IDH1 の発現は腫瘍部と非腫瘍部とで変化はなかった。TET1 の発現低下は腫瘍部位と関連があり、また、IDH2 の低下はリンパ節転移や腫瘍の深達度と関連したが、TET2, TET3, TDG, IDH1 についてはとくに病理学的要素との関連は見られなかった。TET1, TET2, TET3 を HEK293T に導入して 5-hmC の量をはかると、TET1, TET2 は有意に 5-hmC の量を増加させたが、TET3 の影響は中程度であった。我々は胃がん患者において、TET2 の酵素活性領域にある 2 つのミスセンス変異(c.5162T>G (p.L1721W), c.5284A>G [p.I1762V]) の存在を確認するとともに、あらたな TET3 の多型(c.3000C>T) も見いだした。既知の変異体 Y1148* と F1706fs*13 をふくめ、HEK293T に導入してテストしたが、この 2 つの胃がん患者に見いだされた TET2 の多型 p.L1721W, p.I1762V は 5-hmC の量を変化させるものではなかった。また、TET1-3 の体細胞変異は見いだされなかった。

[考察]

本論文で我々は、LC-MS/MS 法で、種々のシトシン修飾の量をヒト胃粘膜および胃がん組織で明らかにした。5-hmC の腫瘍における減少は 5-mC の減少に比べても顕著であった。これらは個体間の差が大きいことも明らかにした。病理学的所見との比較、たとえば 5-hmC の減少が噴門部のがんで顕著であることや、腫瘍の早期で見られて、転移の著しい例などではむしろ 5-hmC の量が変わらないという現象の解釈は今後の研究を待たねばならない。また、この変化に対応する酵素群も相応の変化をしていたが、特に TET1 の寄与が大きかった。

[結論]

胃がんのシトシン修飾は、関連酵素の増減に関連し、発がんの初期にかかわっている可能性がある。