



## Mechanisms for inactivation of the galanin receptor 1 (GALRI) in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 植田, 洋 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1219">http://hdl.handle.net/10271/1219</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 366号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	植田 洋		
論文題目	Mechanisms for inactivation of the galanin receptor 1 (GALR1) in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) (頭頸部扁平上皮癌におけるガラニンレセプター1の不活化の機序に関する研究)		

博士(医学) 植田 洋

## 論文題目

Mechanisms for inactivation of the galanin receptor 1 (GALR1) in head neck squamous cell carcinomas (HNSCC)  
(頭頸部扁平上皮癌におけるガラニンレセプター1の不活化の機序に関する研究)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

我々はすでに頭頸部扁平上皮癌における第18番染色体長腕の欠失が腫瘍の進行と生命予後を左右する一因であることを報告し、頭頸部癌細胞株で第18番染色体長腕におけるヘテロ接合性の欠失を42サテライトマーカーを用い調べたところ、最大75%の欠失を18q23に位置するマーカー D18S70に認めた。この部位に相当して頭頸部癌に重要な癌抑制遺伝子の存在が強く示唆された。この部位に存在する遺伝子にGタンパクのひとつであるガラニンに關与する、Gタンパク連結型受容体のガラニンレセプター1がある。このGタンパク連結型受容体の中には甲状腺刺激ホルモンレセプターのように腫瘍化に関するものが発見されており、また他の重要な癌抑制遺伝子と同様、非常に多くのCG配列をそのプロモータ領域に認めた。そのためそのガラニンレセプターに癌抑制遺伝子の可能性みて、頭頸部癌でのガラニンレセプター1の発現様式を調べた。するとヘテロ接合性欠失のある細胞株の多くに発現が認められなかった。その不活性化のメカニズムとして遺伝子の変異やプロモータ領域におけるメチル化の有無などを分析した上で、ガラニンレセプター1の癌抑制遺伝子としての可能性を考察した。

### 〔材料ならびに方法〕

細胞株：ミシガン大学で確立された頭頸部扁平上皮癌11細胞株とケラチノサイトを用いた。細胞株はUM-SCC-11A、-11B(喉頭癌)、-12(喉頭癌)、-14A、-14B(口腔)、-17A、-17B(喉頭癌)、-22A、-22B(下咽頭癌)、-74A、-74B(舌癌)で数字は同一患者を示し、Aは初発癌、Bは再発癌あるいは転移を示す。ケラチノサイトはコントロールとして用いた。

タンパク発現：細胞株よりタンパクを抽出、ウエスタン・ブロッティング法にて確認した。一次抗体としてガラニンレセプター1には抗マウスガラニンレセプター1抗体を用いた。

遺伝子変異解析：それぞれの細胞株よりゲノムDNAを抽出し、ガラニンレセプター1遺伝子のすべてのエクソンを含むようデザインした4対のプライマーを用い、PCR法にて増幅し遺伝子配列解析を行った。すべての解析は複数回行い確認した。

プロモータ領域におけるメチル化の解析：亜硫酸水素塩ナトリウムによるDNA処理：DNA上のメチル化されていないすべてのシトシンを亜硫酸水素塩ナトリウムにてウラシルに変換。プロモータ上の転写因子接合部位の直後にメチル化、非メチル化シトシンそれぞれに対応する特異的プライマーを作成。処理されたDNAをそれら特異的プライマーを用いてメチル化特異的PCR、非メチル化特異的PCR法にて増幅することによりメチル化の有無を確認した。またそれぞれを遺伝子配列解析することにより最終的に確認した。

### 〔結果〕

頭頸部癌におけるガラニンレセプター1の発現様式：ウエスタン・ブロッティング法にて頭頸部癌とケラチノサイトにおけるガラニンレセプター1の発現を約50・54kDaに二重のバンドとして認めた。正常コントロールであるケラチノサイトは50kDaに弱い発現を認めた。頭頸部癌では54kDaに4細胞株にて強発現を、1細胞株にて弱い発現を確認した。あとの6頭頸部癌では50kDaに軽度の発現かあるいは発現を認めなかった。マイクロサテライトマーカーD18S70のヘテロ接合性の欠失と発現の関係をみるとヘテロ接合性の欠失のある6細胞株で弱い発現かあるいは発現を認めず、欠失のない3細胞株では発現をみた。欠失のある2細胞株でも発現をみた。

遺伝子解析：1細胞株においてエクソン3領域に点変異を認めた。他の細胞株では認められなかった。メチル化解析：弱発現の7細胞株では4細胞株に強く、3細胞株に中等度のメチル化特異的PCRのバンドを得た。最も強く発現していた4細胞株ではいずれも弱いメチル化特異的PCRのバンドであった。ケラチノサイトにはメチル化は認めなかった。非メチル化特異的PCRのバンドはそれぞれの細胞株でメチル化に相反する強度のバンドを得た。

### 〔考察〕

現在様々な癌抑制遺伝子が発見されているが、発癌の形式として「two-hit theory」が重要とされる。その原因として、遺伝子のホモ接合体の消失、ヘテロ接合性の欠失、遺伝子変異、メチル化など様々な要因があげられている。特に遺伝子変異やプロモーター領域のメチル化は重要な原因のひとつとされp16、VHLなどの癌抑制遺伝子で多くの悪性腫瘍にメチル化が認められている。

我々の過去のデータより頭頸部癌における癌抑制遺伝子の存在の可能性を第18染色体長腕に見出しており、今回の11細胞株のうち8細胞株(72.7%)がD18S70マーカーにヘテロ接合性の欠失を認めるが、その部位に存在する遺伝子のガラニンレセプター1に遺伝子の変異やメチル化が多くみられ、頭頸部癌でのガラニンレセプター1の発現パターンはそれら変異やメチル化に呼応して各細胞株で異なっていた。特にこれらの細胞株ではメチル化による発現抑制が主要なメカニズムと考えられ、この遺伝子が頭頸部癌において癌抑制遺伝子としての重要な働きを担っている可能性を示唆された。

### 〔結論〕

頭頸部癌における新たな癌抑制遺伝子の可能性としてガラニンレセプター1の発現不活化のメカニズムを見たところ、それはヘテロ接合性の欠失に加えて遺伝子の変異やメチル化によるものであった。これは他の癌抑制遺伝子の不活化機序と同様の機構と考えられ、ガラニンレセプター1が頭頸部癌において癌抑制遺伝子のような重要な役割を担っているものと示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)の第18番染色体長腕の欠失が腫瘍の進行と生命予後に関与することから、このヘテロ接合性欠失(LOH)を42サテライトマーカーを用いて調べたところ、最大75%の欠失を18q23に位置するマーカーD18S70に認め、同部位における癌抑制遺伝子の存在が強く示唆された。この部位には、多くのCG配列をプロモーター領域に持つGタンパク連結型受容体のガラニンレセプター1(GALR1)がある。

申請者は、GALR 1に癌抑制遺伝子の可能性があると考え、HNSCCのGALR 1の発現様式を調べた。

#### 〔材料ならびに方法〕

細胞株：ミシガン大学で確立されたHNSCC 11細胞株(初発6細胞株、再発・転移5細胞株)を用い、ケラチノサイトを対照とした。

タンパク発現：細胞株よりタンパクを抽出し、SDS-PAGE電気泳動後、ウエスタン・プロテイング法(一次抗体は抗マウスGALR 1)で確認した。

遺伝子変異解析：各細胞株よりゲノムDNAを抽出し、GALR 1遺伝子のすべてのエクソンを含むようにデザインした4対のプライマーを用い、PCR法で複数回遺伝子配列解析を行った。

プロモーター領域におけるメチル化の解析：DNA上のメチル化されていないすべてのシトシンを亜硫酸水素ナトリウムでウラシルに変換。プロモーター上の転写因子接合部位の直後にメチル化・非メチル化シトシンを含むそれぞれの配列に対応する特異的プライマーを用いて、処理されたDNAをメチル化特異的PCR法・非メチル化特異的PCR法で増幅させることでメチル化の有無を確認し、さらにPCR産物の遺伝子配列を解析することにより最終的に確認した。

#### 〔結果〕

HNSCCにおけるGALR 1の発現様式：ウエスタン・プロテイング法でGALR 1の発現を約50・54kDaに二重バンドとして認めた。対照のケラチノサイトでは50kDaに弱い発現を認めた。HNSCCでは4細胞株で54kDaに強発現、1細胞株で54kDaに弱発現を認め、6細胞株では50kDaに軽度の発現か発現を認めなかった。マイクロサテライトマーカーD18S70は、LOHのある6細胞株で弱い発現または発現を認めず、2細胞株で発現をみた。欠失のない3細胞株では発現していた。

遺伝子解析：1細胞株でエクソン3領域に点変異を認めた。

メチル化解析：7細胞株にメチル化特異的PCRバンドを認めた(4細胞株：強度、3細胞株：中等度)。ケラチノサイトにはメチル化は認めず、非メチル化特異的PCRのバンドはそれぞれメチル化に相反するバンドを強度に示した。

#### 〔結論〕

HNSCC 11細胞株のうち8細胞株(72.7%)でD18S70マーカーにLOHを認め、同部に存在するGALR 1に遺伝子変異やメチル化が多く見られ、発現量は変異やメチル化の有無に呼応していた。以上より、LOHと残ったアレルの遺伝子変異やメチル化によるGALR 1の発現抑制が行われていると考えられ、GALR 1がHNSCCにおいて癌抑制遺伝子として重要な役割を担っている可能性が示唆された。

審査委員会は、HNSCCにおける新たな癌抑制遺伝子の可能性として、GALR 1の発現不活化のメカニズムを検索し、LOHに加え、遺伝子の変異やメチル化によることを明らかにした点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた

- 1) 18qLOHは、SCCに特徴的で、腺癌等には見られないのか
- 2) 頭頸部癌においてガラニンはどのような働きをしているのか
- 3) ガラニンは正常組織では、どの臓器・組織に見られるのか
- 4) ガラニンは扁平上皮細胞では、基底膜にあるのか

- 5) ケラチノサイトを対照にしたのは、なぜか
- 6) 50kDa に2つのバンドが出てくるのは、どんな意味があるのか
- 7) 糖染色をして、糖付加との関係を調べたか。
- 8) 同じ細胞株でも、原発巣と転移部位にバンドのでかたに違いがあるのはなぜか
- 9) 膜やサードループの近くでアミノ酸に変化が出るのはなぜか
- 10) メチル化しないもの PCR バンドの位置が違うのはなぜか
- 11) DNA の一方のみがメチル化するものがあるか
- 12) GALR 1の点変異は、他の腫瘍にも認められるか
- 13) 培養細胞中にガラニンを入れたら、細胞はどうなるのか
- 14) 同一個体で、癌組織と周囲健常組織について比較すると、もう少し癌化のメカニズムが明らかになるのではないか

これらの質問に対し申請者の解答は概ね適切であり、問題点も十分理解しており、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 橋本賢二  
副査 梶村春彦 副査 三浦克敏