



Over-representation of the EBAG9 gene at 8q23 associated with early-stage breast cancers

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: 常泉, 道子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1223

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 370号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	常泉道子		
論文題目	Over-representation of the <i>EBAG9</i> gene at 8q23 associated with early-stage breast cancers (早期乳癌における8q23上の <i>EBAG9</i> 遺伝子の増幅)		

博士(医学) 常 泉 道 子

論文題目

Over-representation of the *EBAG9* gene at 8q23 associated with early-stage breast cancers
(早期乳癌における8q23上の *EBAG9* 遺伝子の増幅)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ヒトの CpG library より estrogen responsive element をもつ遺伝子として1998年に *EBAG9*(estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9)が報告された。その後、子宮頸部腺癌より同定されたヒト癌細胞の表面に発現する新しい癌関連抗原分子 RCAS1とホモロジーを認めた。癌関連抗原としての機能は癌細胞の表面に抗原として存在し、活性化T細胞のレセプターを介してT細胞をアポトーシスへ導き免疫監視機構から逃れるとされ、これにより癌細胞の浸潤を広めていると考えられている。また、乳癌細胞株 MCF7はエストロゲン存在下で *EBAG9*の発現が誘導されると報告されている。そこで、*EBAG9*の癌への関与を明らかにするために完全長 cDNA cloning、ゲノムの構造解析、染色体位置の解析と、癌細胞株における *EBAG9*の発現と乳癌症例のゲノム DNA における *EBAG9*遺伝子領域の増幅について検討した。

〔方法〕

1. 3'RACE(rapid amplification of cDNA ends)法を用いて *EBAG9*の完全長 cDNA を cloning した。
2. 対応する BAC(bacterial artificial chromosome)クローンをテンプレートに direct sequence、及び LA-PCR (long and accurate-polymerase chain reaction)法を用いて *EBAG9*遺伝子のゲノム上の exon/intron junction を決定した。
3. 癌細胞株(7臓器56細胞株)を用いて *EBAG9*の発現異常について RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)法にて検討した。
4. *EBAG9*の染色体位置は8q23でその telomere 側8q24に *c-myc* が位置しているため乳癌細胞株10株を用いて、*EBAG9*と *c-myc* の発現について RT-PCR 法にて検討した。
5. 癌細胞株94株を用いて exon2から exon7について SSCP(single stranded conformation polymorphism)法を施行した。
6. 原発性乳癌症例での *EBAG9*領域と *c-myc* 領域を含めた遺伝子の増幅について microsatellite DNA marker と internal control marker を放射性同位元素により標識し、multiplex PCR 法で調べた。microsatellite DNA marker は (centromere 側)CHLC.GATA26A08-CHLC.ATA23G06-*EBAG9*-AFM200VC7-CHLC.GATA72D08-D8S522(*c-myc*)-D8S1179-D8S1128(telomere 側)を用い、internal control marker は2q13・21に存在し、CGH (comparative genome hybridization)法で乳癌のゲノム異常を認めないことが知られている interleukin-1 beta を用いた。さらに *EBAG9*領域と *c-myc* 領域を含めた遺伝子の増幅と病理組織学的因子やホルモンレセプター(エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター)との相関を調べた。

〔結果〕

1. 3'RACE 法を用いて不十分であった3末端の *EBAG9* cDNA 配列を決定し、完全長 cDNA を cloning し

た。

2. *EBAG9*の cDNA は7つの exon と6つの intron からなり、開始コドンは exon2からであった。
3. 癌細胞株の多くで *EBAG9*の発現を認めた。
4. *EBAG9*の発現は乳癌細胞株10株で認められたが *c-myc* の発現は8例であった。
5. 癌細胞株94株に SSCP 法を行ったが、polymorphism は認めなかった。
6. *EBAG9*領域と *c-myc* 領域を含めた遺伝子の増幅を検索をした原発性乳癌症例で informative であった129例中、*EBAG9*に増幅のあった症例は27例/129例(20.9%)であった。*EBAG9*に増幅のあった27例中、*c-myc* に増幅のあったものが16例、なかったものが11例であった。*c-myc* に増幅のあった症例は42例/129例で、そのうち *EBAG9*に増幅のあったものが11例、なかったものが31例であった。病理組織学的因子やホルモンレセプターとの相関を調べたところ、相関のみられたパラメーターは腫瘍径であった。追加した144症例を加えると T1や T2(5 cm 以下)では29/29例で *EBAG9*だけの増幅を示し、T3(5.1cm 以上)では *c-myc* だけの増幅を21/61例に認め、 $p=0.0001$ で相関を認めた。その他のパラメーターでは相関は認めなかった。

〔結論〕

完全長ヒト *EBAG9* cDNA を cloning しゲノムの構造を決定した。癌細胞株のほとんどすべてに発現を認めた。染色体位置は8q23に確認し、その telomere 側8q24.1には癌遺伝子として良く知られている *c-myc* が位置していた。原発性乳癌での *EBAG9*と *c-myc* の増幅有無と病理組織学的因子やホルモンレセプターとの相関は腫瘍径にのみ認められた。腫瘍径の小さいものほど *EBAG9*のみの増幅が認められ、腫瘍径の大きいものほど *c-myc* のみの増幅を認めた。このことより *EBAG9*の増幅は乳癌における早期での癌化への関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、埼玉医科大学村松研究室から報告されたエストロゲン反応性エレメントを持つ遺伝子として分離された *EBAG9*(estrogen receptor-binding fragment-associated gene 9)/九州大学生体防御医学研究所渡邊研究室から報告された子宮頸部腺癌より同定されたヒト癌関連抗原分子 *RCAS1*(receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo)に注目した。後者は、癌細胞の表面抗原として存在し、活性化 T細胞の受容体を介して T細胞をアポトーシスへ導き免疫監視機構から逃れるとされ、これにより癌細胞の浸潤を広めているとされている。また、乳癌細胞株 MCF7はエストロゲン存在下で前者の発現が誘導されるという報告があった。そこで、申請者は、*EBAG9*の癌への関与を明らかにするために、完全長 cDNA クローニング、ゲノムの構造解析、染色体位置の解析と、癌細胞株における *EBAG9*の発現と乳癌症例のゲノム DNA における *EBAG9*遺伝子領域の増幅についての解析を行った。

まず、部分しか単離されていなかったヒト *EBAG9* cDNA を3'RACE法を用いて、完全長 cDNA の塩基配列を決定した。次に、ゲノム遺伝子を単離し、ヒト *EBAG9*遺伝子は7つのエキソンと6つのイントロンを持つ遺伝子であることを明らかにした。*EBAG9*蛋白の開始コドンはエキソン2に、停止コドンはエキソン7にあった。染色体座位は8q23であり、近傍に癌遺伝子 *C-MYC*があることが判明した。

乳癌細胞株で *EBAG9*と *C-MYC* の発現を RT-PCR 法で検討した結果、10例中、*EBAG9*は全例に発現が、8例に *C-MYC* の発現が認められた。また、多種類癌細胞94株の SSCP 解析を *EBAG9*遺伝子について行っ

たが、明らかな SSCP 上の変化は認めなかった。これらは、癌細胞株についての解析である。

さらに、豊富に利用できる原発性乳癌症例から信頼できる検体129症例について、EBAG9やC-MYCを含む8q23~8q24領域の8遺伝子について各遺伝子の増幅を検討した。データは精度の高いものであり、信頼できると判断されるが、その結果はEBAG9の増幅とC-MYCの増幅は独立しておこることが明らかになった。また、乳癌の組織型、リンパ転移度、その他の癌性質パラメーターとEBAG9の増幅、C-MYCの増幅との相関関係を検討した結果、申請者はいろいろのパラメーターのうち、相関の見られたのは腫瘍径であることを見出した。つまり、追加した144例を加えるとT1やT2(5cm以下)では29/29例でEBAG9だけが増幅を示し、T3(5.1cm以上)ではC-MYCだけの増幅を21/61例に認めるというものである。他のパラメーターでは相関は見いだせなかった。

申請者は、研究の背景、目的、方法、結果、考察もわかりやすく説明することができた。単離されていた遺伝子とは言え、その遺伝子と乳癌との関連性に着目したことはすばらしいことであり、最初着実に完全長cDNAの単離、ゲノムの解析、染色体座位の決定を行った。次に、豊富な乳癌症例に恵まれて大きく展開し、EBAG9と乳癌症例における癌パラメーターとの相関を明確に呈示できる成果を得るに至っている。申請者は、研究というものを理解しており、かつすばらしい研究成果もあげた。

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) EBAG9およびRCAS1のクローニング方法は
- 2) BACの3次元スクリーニングとは
- 3) EBAG9の組織特異的発現パターンは
- 4) 授乳期の乳腺組織での発現はどうなっているのか
- 5) RCAS1は腫瘍免疫を抑えるのか
- 6) エストロゲンとEBAG9遺伝子の関係はどうなっているのか
- 7) 小さい腫瘍でEBAG9の発現が高い意味は何か
- 8) EBAG9の発現増加と遺伝子増幅の関係はどうなっているのか
- 9) マウス胎生期の発現はどうなっているのか
- 10) EBAG9遺伝子を強制発現した癌細胞はどうなるのか

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三浦直行
副査 梶村春彦 副査 難波宏樹