



Altered expression of the human base excision repair gene NTH1 in gastric cancer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-05 キーワード: 作成者: 後藤, 正憲 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1947

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 5 7 1 号	学位授与年月日	平成 22 年 3 月 15 日
氏 名	後 藤 正 憲		
論文題目	Altered expression of the human base excision repair gene <i>NTH1</i> in gastric cancer (胃がんにおけるヒト塩基除去修復遺伝子 <i>NTH1</i> の発現異常)		

博士(医学) 後藤 正 憲

論文題目

Altered expression of the human base excision repair gene *NTH1* in gastric cancer

(胃がんにおけるヒト塩基除去修復遺伝子 *NTH1* の発現異常)

論文の内容の要旨

[はじめに]

活性酸素により生成される酸化損傷塩基は突然変異の誘発や細胞周期の停止を引き起こすため、発がんの原因となると考えられている。このような酸化損傷塩基はDNA中に蓄積されないよう塩基除去修復酵素の働きにより除去される。大腸菌エンドヌクレアーゼ III ヒトホモログ (*NTH1*) は塩基除去修復酵素の一つであり、チングリコール、5-ヒドロキシシトシン、ホルムアミドピリミジンを含む酸化ピリミジン類を除去する働きを持っている。

胃の組織では喫煙やピロリ菌感染により炎症が誘導され、酸化ストレスにさらされるため、塩基除去修復活性の低下は胃の発がんに関与するものと考えられる。そこで *NTH1* の発現低下と胃発がんの関連について研究を行った。

[材料ならびに方法]

はじめに、8種の胃がん細胞株 MKN28、TMK1、MKN74、KATOIII、AGS、MKN1、MKN45、HSC39の *NTH1* 発現量を調べるために、定量的PCRとウエスタンブロットを行った。次に発現低下が認められた胃がん細胞株のひとつ AGS を用いて *NTH1* 安定発現株を樹立し、ベクターのみを導入した細胞株(モック細胞株)と共にチングリコールに対する修復活性を比較した。病理検体の *NTH1* 発現量を調べるため、50例の胃がん患者検体の腫瘍部と同一例の非腫瘍部の定量的PCRを行った。さらに免疫染色により腫瘍部の *NTH1* タンパク質の局在を調べた。

さらに詳細な *NTH1* の発現検討を行うため、ルシフェラーゼアッセイにより *NTH1* プロモーター活性領域を調べた。80例の胃がん患者検体正常部から抽出したDNAを用いてPCR一本鎖コンフォメーション多型解析 (SSCP) を行うことで、*NTH1* プロモーター領域の遺伝的多型を検索した。同定されたプロモーター領域の多型の活性を調べるため、変異型を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを作製し、野生型と活性の比較を行った。次に長野県の148例の胃がん患者と292人の健常者の血液から抽出したDNAを用いて症例対照研究を行った。

[結果]

胃がん細胞株の *NTH1* 発現量は検討したすべての細胞株で発現が低下していた。*NTH1* 安定発現株とモック細胞株でチングリコールの修復活性を比較すると、*NTH1* 安定発現細胞株において高い除去活性を示した。一方、定量的PCRによる50例の胃がん病理検体では、腫瘍部で非腫瘍部の半分以下の発現量であった例が36%(18/50)であった。この50例の腫瘍部の *NTH1* 免疫染色では24%(12/50)において細胞質で主に発現していた。

ルシフェラーゼアッセイをすると0.4 kb 上流を含むプラスミドで最も高い活性を示した。また、この領域の変異検索によって2つの新たな多型、c.-163C>Gとc.-241_-221delが同定された。野生型とこれら2つの多型のプロモーター活性を比較すると、野生型に比べ両多型は野生型に比べ活性の低下がみられた。しかし、症例対照DNAを用いて2つの多型と胃がんのリスクの関連について検

討したところでは、特に両群での頻度の差は明らかにすることができなかった。

[考察]

NTH1 安定発現株とモック細胞株を用いた修復活性の比較解析は安定発現株でチミングリコールの高い除去活性をもつことを明らかにした。NTH1 が修復対象とする損傷塩基には変異誘発性が確認されているものがいくつか存在する。NTH1 の発現の低下は酸化的損傷を受けた DNA の修復活性を低下させ、突然変異の誘発に寄与するものと考えられる。胃癌病理検体の発現量解析は腫瘍部で非腫瘍部の半分以下の発現量を示した検体が 36%、腫瘍部の免疫染色では細胞質局在型が 24% 見つかった。細胞質局在型は従来の核局在型に比べ、核内 DNA での除去修復活性が不十分であることが予測される。胃癌腫瘍部での発現低下あるいは局在異常を示した検体は 54% で、半分以上で NTH1 の発現異常がみられた。

NTH1 プロモーター領域の中で新たに同定された c.-163C>G と c.-241_-221del はルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性の低下が認められた。しかし、本研究のケースコントロール研究では、これらの多型と胃癌リスクの間に関連を見つけることはできなかった。今後より詳細に *NTH1* プロモーター多型と胃癌リスクの関連を調べるためにはさらに多くの検体を用いて解析、検討を行っていく必要がある。

[結論]

ヒト胃癌細胞株において NTH1 発現量は低下していた。また胃癌病理検体の腫瘍部において NTH1 の発現低下あるいは局在異常が認められる検体が確認された。プロモーター解析では新たな 2 つの多型を同定し、これらの多型が *NTH1* プロモーター活性を低下させることを明らかにした。これら結果は修復酵素 NTH1 発現低下、あるいは NTH1 局在異常が胃癌発症に関わっている可能性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

胃は喫煙やピロリ菌感染など種々のストレスにさらされるため、塩基除去修復酵素の一つである NTH1 活性の低下が胃癌に関係しているのではという仮説をたてた。まず胃癌においては NTH1 の発現量が低下しているのではと考え、胃癌細胞株における *NTH1* 遺伝子発現量を定量的 RT-PCR によって調べたところ、全例で低下していた。ウェスタンブロット法による蛋白としての発現も同様の結果であった。そこで、脱メチル化剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の存在下で培養したが発現量が回復しなかったことから、エピジェネティックな発現低下ではないことを明らかにした。次に、NTH1 安定発現株を樹立し修復活性を調べたところ十分な活性が認められたが、逆に導入しないと修復活性は低下していることを示した。さらに胃癌臨床材料における NTH1 の発現量を調べたところ、腫瘍部では発現低下している症例が約 3 分の 1 で認められ、また免疫組織染色により局在が本来の核ではなく細胞質にある例も加えると半数以上となり、NTH1 の機能低下が示された。

プロモーター領域の遺伝子多型と NTH1 発現量との関連性を、ルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。プロモーター活性を規定する領域を決定し、同領域内の遺伝子多型を探索して、見つかった多型とプロモーター活性との相関、さらに、胃癌リスクとの関係についても調べた。同定さ

れた多型はプロモーター活性の低下を示したが、症例対照研究において有意な関連性は認められなかった。

世界で初めて胃がんにおける NTH1 発現量の低下、発現の局在異常を示し、*NTH1* プロモーターの解析を行い、胃がん発症との関連性に先鞭をつけたことを高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与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 前川 真人
副査 蓑島 伸生 副査 伊熊 睦博