

Epigenetic inactivation of galanin receptor 1 in head and neck cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 三澤, 清 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1955

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	医博論第 464号	学位授与年月日	平成21年4月17日
氏名	三澤 清		
論文題目	Epigenetic inactivation of galanin receptor 1 in head and neck cancer (頭頸部癌におけるギャラニンレセプター1のエピジェネティックな抑制)		

博士(医学) 三澤 清

論文題目

Epigenetic inactivation of galanin receptor 1 in head and neck cancer
(頭頸部癌におけるギャラニンレセプター1のエピジェネティックな抑制)

論文の内容の要旨

[はじめに]

頭頸部癌において、18qのLoss of heterozygosity (LOH)は腫瘍進行度・生存率に関連し、もっとも高頻度のLOH部位は18q23であることをわれわれは以前報告した。18q23に位置するギャラニンレセプター1 (*GALR1*)は、G-protein-coupled receptor (GPCR)の一つである。リガンドにはGalaninとGalanin-like peptideが知られ、レセプターには*GALR1*以外に*GALR2* (17q25.3), *GALR3* (22q13.1)が知られている。*Galanin*と*Galanin-like peptide*と、そのレセプターは中枢、末梢神経系に広く発現し、多くの生理活性作用を有すると報告されている。腫瘍細胞では、神経芽細胞腫で*GALR2*が細胞増殖抑制作用を有しアポトーシスを誘導すると最近報告されている。今回われわれは、*GALR1*が頭頸部癌において癌抑制遺伝子候補になるのではと考え、*GALR1*のエピジェネティックな抑制について調べ、*GALR1*がプロモーター領域の高メチル化によって発現抑制された細胞に*GALR1*遺伝子を導入し細胞増殖抑制作用を有することを示した。

[材料ならびに方法]

細胞株はミシガン大学、トルク大学でそれぞれ樹立された頭頸部扁平上皮癌細胞株(UM-SCC; 62例、UT-SCC; 10例)を使用した。臨床検体は浜松医科大学附属病院耳鼻咽喉科で治療を受けた頭頸部扁平上皮癌100例を使用した。バイサルファイト処理は1 μ gのDNAにsodium bisulfite (3 mol/L; pH 5.0)とhydroquinone (10 mmol/L)を加えて55 $^{\circ}$ C 16時間行った。メチル化解析は、バイサルファイト処理したDNAを使って、メチル化特異的PCR (MSP)法とバイサルファイトシーケンシング (BS)法を使って行った。mRNA発現解析は従来のRT-PCR法と、定量PCR法を使ってUM-SCC13例と臨床検体12例に対して行った。プライマーの位置をエキソン2とエキソン3におき*GALR1*の発現を調べた。*GALR1* mRNA低発現であった細胞株(UM-SCC-1,-2,-23)を5-azacytidineとtrichostatin A (TSA)を使って再発現を試みた。*GALR1*遺伝子導入はUM-SCC-23細胞株に、pCMVGALR1/HAiresGFPを使用し、リガンドであるGalaninを加え細胞数を測定した。臨床統計学的検討は各種臨床データと*GALR1*のメチル化について行った。

[結果]

UM-SCC13例のメチル化度をMSP法にて検討したところ、UM-SCC-1, 2, 23に高度なメチル化を認め、UM-SCC-6, 10B, 14B, 22B, 74Bに部分的なメチル化、UM-SCC-10A, 22A, 56, 81Bに、低メチル化を認めた。細胞株全体(UM-SCC; 62例、UT-SCC; 10例)では、38 (52.7%)例に高度ないし部分的メチル化を認めた。臨床検体のメチル化度をMSP法にて検討したところ、H-27, 40, 52, 63, 72, 74が高メチル化例、H-88, 96, 97, 98, 99, 111が低メチル化例であり、臨床検体100例では、38 (38%)例に高メチル化度を認めた。

GALR1 mRNA発現をRT-PCR法にて解析したところ、UM-SCC-1, 2, 23が高度に低発現であり、UM-SCC-10B, 14Bは中程度低発現であった。正常細胞は、発現が正常に保たれていた。*GALR1*

mRNA 低発現であった UM-SCC-1,-2,-23 を 5-azacytidine と TSA で処理し *GALRI* mRNA の再発現を確認した。

UM-SCC13 例の BS 法と定量-PCR 法の結果を比較したところ、top strand, bottom strand のいずれも *GALRI* mRNA が低発現の細胞株はプロモーター領域全体に高メチル化を認めた。特に、転写因子 Ap-2, Sp1 結合部位の CpG メチル化度が *GALRI* mRNA の発現に影響を与えていることがわかった。BS 法によるメチル化度は定量-PCR 法による *GALRI* mRNA の発現と関連することがわかった。臨床検体の MSP 法と定量-PCR 法の結果を比較したところ、メチル化を認めた検体 (H-27, 40, 52, 63, 72, 74) は低発現、メチル化を認めなかった検体 (H-88, 96, 97, 98, 99, 111) は高発現であり関連することがわかった。

GALRI 遺伝子導入と細胞増殖測定では、UM-SCC-23 に遺伝子導入し *GALRI* 蛋白再発現をウエスタンブロット法で確認した。遺伝子導入後の細胞に *Galanin* を加え細胞数の減少を確認した。*GALRI* 遺伝子が癌抑制遺伝子としての性質を持ち合わせていることを確認できた。

臨床統計学的検討では、*GALRI* のメチル化は、T 進行度 (P=0.0036)、リンパ節転移 (P=0.0414)、Stage 進行度 (P=0.0037)、*cycline D1* 発現 (P=0.042)、p16 メチル化 (P=0.0494)、Over-all 生存率 (P=0.0448) に有意に相関していた。Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析では、他の因子に比べ、*GALRI* のメチル化と Stage 進行度に有意に生存率への関与を認めた。

[考察]

MSP 法により細胞株では 38/72 (52.7%)、臨床検体では、38/100 (38%) にメチル化を認めた。BS 法により *GALRI* プロモーター領域の、転写因子 AP-2 と Sp1 結合部位の CpG メチル化度が mRNA の発現に影響していることがわかった。臨床統計学的検討から、*GALRI* 遺伝子のメチル化は有意に Over-all 生存率に相関することがわかった。また、*GALRI* 遺伝子を再発現させた細胞で細胞増殖抑制されることも確認した。

[結論]

今回、頭頸部癌において *GALRI* 遺伝子にエピジェネティックな抑制がおこり、mRNA の発現が抑制されていることがわかった。

頭頸部癌において *GALRI* 遺伝子が重要な癌抑制遺伝子であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

頭頸部扁平上皮癌において、染色体 18q のヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH) が生命予後に強く関連していることが、申請者らの研究チームによって明らかにされた。頭頸部扁平上皮癌の臨床材料を用いたマイクロサテライト解析で欠失を調べた結果、高頻度に欠失を認められる領域に座位する遺伝子として、*Galanin* 遺伝子、*GALRI* 遺伝子が見出された。これらはリガンドと受容体の関係にあり、脳・腸管ペプチドの機能を有するものである。

申請者らは、頭頸部扁平上皮癌の細胞株および臨床材料を用いた実験で、*GALRI* 遺伝子 mRNA 発現量の減少とその遺伝子プロモーター領域のメチル化とが強く関連していることを見出し、*GALRI* 遺伝子のエピジェネティックな遺伝子発現抑制、*GALRI* の有する細胞増殖抑制作用、生命予後との関連について検討し、興味深い知見を得た。

ミシガン大学、トルク大学で樹立された頭頸部扁平上皮癌細胞株 72 例、浜松医科大学附属病院耳鼻咽喉科で治療を受けた頭頸部扁平上皮癌 100 例を使用した。細胞株と臨床材料から抽出した DNA を重亜硫酸処理し、メチル化特異的 PCR (MSP) 法と塩基配列決定法を使ってメチル化解析を行った。*GALRI* mRNA 発現解析は定性的な RT-PCR 法と定量 PCR 法で行った。*GALRI* mRNA 低発現であった細胞株を 5-azacytidine と trichostatin A (TSA) を使って発現の回復を確認した。*GALRI* の機能を調べるために、*GALRI* 遺伝子導入実験を施行した。各種臨床成績と *GALRI* のメチル化について臨床統計学的検討を行った。

MSP 法による検討の結果、72 種の細胞株のうち 38 種 (52.7%) に高度ないし部分的メチル化を認めた。また、臨床検体 100 例では、38(38%) 例に強いメチル化を認めた。RT-PCR 法にて *GALRI* mRNA 発現を解析したところ、DNA メチル化の認められた試料にて発現低下が確認された。*GALRI* mRNA 低発現であった細胞株を 5-azacytidine と TSA で処理したところ、*GALRI* mRNA 発現の回復を認めたため、DNA メチル化による発現低下と考えられた。特に、転写因子 Ap-2, Sp1 結合部位の CpG メチル化度が *GALRI* mRNA 発現に影響を与えていることがわかった。また、塩基配列を調べメチル化度と定量-PCR 法による *GALRI* mRNA 発現量を調べたところ、メチル化度の高い方が *GALRI* mRNA の発現が低いという相関性が認められた。臨床検体においても、メチル化度と *GALRI* mRNA の発現に逆相関を認めた。

頭頸部扁平上皮癌の細胞株に *GALRI* 遺伝子を導入したところ、*GALRI* 蛋白の再発現がウエスタンブロット法により確認された。また、遺伝子導入後の細胞に Galanin を加えたところ、細胞数の減少が確認された。すなわち、*GALRI* 遺伝子が癌抑制遺伝子としての性質を有していることが判明した。

臨床統計学的検討では、*GALRI* のメチル化は、T 進行度(P=0.0036)、リンパ節転移(P=0.0414)、Stage 進行度(P=0.0037)、cyclin D1 発現(P=0.042)、*p16* メチル化(P=0.0494)、Over-all 生存率(P=0.0448)と有意に相関していた。Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析では、他の因子に比べ、*GALRI* のメチル化と Stage 進行度に有意に生存率への関与を認めた。

以上の結果から、頭頸部癌の細胞株と臨床検体に、*GALRI* の DNA メチル化が生じており、そのため mRNA の発現が抑制されていること、それが転写因子の結合を阻害するためであろうこと、*GALRI* の増殖抑制効果の減弱による発癌が考えられること、*GALRI* のメチル化が生存率を予測する上で有意義であることが示された。審査委員会では、頭頸部癌において *GALRI* 遺伝子が重要な癌抑制遺伝子であり、予後診断にもつながることを初めて明らかにしたことを高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) Galanin について
- 2) Galanin receptor について
- 3) DNA メチル化の機構について
- 4) 遺伝子発現消失の原因について
- 5) メチル化特異的 PCR について
- 6) DNA メチル化解析の方法について
- 7) 頭頸部扁平上皮癌の臨床材料における腫瘍細胞の割合について
- 8) 頭頸部扁平上皮癌における遺伝子異常について
- 9) *Galanin*, *GALRI* の遺伝子変異について

10) N-グリコシダーゼ F 処理について

11) *GALR* 遺伝子メチル化と喫煙、ウイルス感染、治療との関係について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、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 前川 真人

副査 梶村 春彦

副査 橋本 賢二