Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 建東 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/249

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　４２９号	学位授与年月日	平成１７年　３月１５日
氏　　名	王　　建　東		
論文題目	Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer (ヒト結腸癌における EphA7 のメチル化による発現減弱)		

博士(医学)　王　建東

論文題目

Downregulation of *EPHA7* by hypermethylation in colorectal cancer

(ヒト大腸癌における*EPHA7*のメチル化による発現減弱)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Eph遺伝子は受容体型tyrosine kinaseでその対応するリガンドEphrinの構造の違いからEphAとEphBに分けられる。近年、本遺伝子の一部はヒト神経芽腫、肺癌、胃癌、食道癌、乳癌、および大腸癌などで高発現しているという報告があり、この遺伝子の発現がヒト腫瘍発生やその生物学的性格に重要な影響がある可能性がある。しかし、その中で*EPHA7*発現に関するヒト癌での研究の報告はほとんどない。本研究は、知られているEph遺伝子すべての発現の状況をヒト消化管腫瘍で検索をしている際に、ヒト大腸癌および大腸癌細胞株での*EPHA7*の発現減弱または消失を発見し、その発現減弱が*EPHA7*遺伝子の5'側のプロモーター部位と想定される位置にある5'CpGのメチル化によるものであることを明らかにしたものである。

〔材料ならびに方法〕

*EPHA7*遺伝子発現解析では、59例のヒト大腸癌とその非癌部位、および大腸癌細胞株5株を、5'CqGのメチル化検索では大腸癌細胞株5例、原発性大腸癌17例および大腸腺腫5例をそれぞれ用いた。*EPHA7*遺伝子発現はRT-PCR解析法、5'CpGのメチル化検索では制限酵素処理、メチル化特異的PCRおよび、重亜硫酸塩処理シークエンス法によった。5'CpGのメチル化は、translation start siteの上流600から下流500までの1100(bp)の範囲の領域にある80個のCpGについて、そのメチル化状態を上記の3方法で検討した。さらに、この*EPHA7*発現減弱の状況と年齢、性別、病期、組織型、リンパ節転移の有無など臨床的事項との関連を検討した。

〔結果〕

ヒト大腸癌および大腸癌細胞株5株ではともに*EPHA7*遺伝子発現の低下が見られた。大腸癌細胞株の発現低下は5-aza-2'deoxycytidineを投与することによって回復した。また、5'CqGのメチル化検索では大腸癌細胞株5株、原発性大腸癌17例いずれにおいても高メチル化が明らかとなった。また、発現減弱あるいは消失に関係するメチル化部位はtranslation start siteの上流500から1までの部位にあるCpG islandであった。さらに、大腸腺腫5例でもこの部位のメチル化を同定し得た。発現減弱は組織型により差がみられた。

〔考察〕

Eph遺伝子は受容体型tyrosine kinaseでそのファミリーの遺伝子と腫瘍との関連については、過剰発現、変異などが知られている。メチル化による発現減弱は血液腫瘍で*EPHA3*にわずかに知られているのみで、詳細に解析し得たのは、本研究がはじめてである。*EPHA7*の発現減弱がヒト大腸癌にどのような性格を

付与するのかが今後の課題である。

〔結論〕

ヒト大腸癌および大腸腺腫では*EPHA7*のmRNAの発現低下とその機構としての5'CpGの高メチル化がおこっていることを明らかにし、*EPHA7*が大腸の癌化に何らかの腫瘍抑制遺伝子的関与のあることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Eph遺伝子は受容体型チロシンキナーゼでその対応するリガンドephrnの構造の違いからEphAとEphBに分けられる。ヒトでは現時点ではEphAが8個、EphBが6個、ephrinAが5個、ephrinBが3個知られている。EphrinやEphは胎児期の発生や神経血管系の分化に必須であることが知られている。さらに、近年、Ephのいくつかがヒト神経芽腫、肺癌、胃癌、食道癌、乳癌、大腸癌で高発現していることが報告されている。申請者の教室でも、EphB2が胃癌で、EphA2が大腸癌で高発現していることを発見している。Eph遺伝子の中でも、癌とEphA7の発現についてはほとんど報告がない。

申請者は、ヒト大腸癌59例と大腸癌細胞5株のEphA7の発現解析を行ったところ、大多数のヒト大腸癌と5つの大腸癌細胞株においてEphA7の発現が低下していることを見出した。方法としては、癌部および正常粘膜部からRNAを抽出し、半定量的RT-PCRにてEphA7mRNAを比較したところ、癌部が正常部より1/2未満の発現しか示さないものが49％にのぼった。また、大腸癌細胞5株のうち著明に低下しているのが4株、7割の発現を示したのが1株であった。EphA7発現低下と癌の組織型、発生部位、大きさ、周囲への浸潤度、転移との相関をみたが、特に有意な関係は見出せなかった。

遺伝子の発現低下には、遺伝子的な変化とエピジェネチィクな変化の2通りがあるので、まず発現低下しているヒト大腸癌および大腸癌細胞株の遺伝子変化を検討するために、SSCP(single stand conformation polymorphism)を行ったが特に突然変異を検出できなかった。そこで、申請者はEphA7の発現低下がエピジェネチィックに起こっていると考え、EphA7発現が著明に低下している大腸癌細胞株DLD1、HCT116、SW620細胞に脱メチル化剤である5アサシチジン処理をしたところ、いずれの細胞株もEphA7の発現が10倍以上に増加した。この結果に勇気づけられ、EphA7遺伝子の発現制御部位と思われる-600から+500までのDNAのメチル化を3つの方法で詳細に検討した。

まず、メチル化によりDNA切断が可能な制限酵素と不可能な制限酵素の併用によりその部位がメチル化されているかどうかを判定する方法を5つの大腸癌細胞株について検討した結果、発現が著減しているDLD1、HCT116、HT29、SW620細胞ではEphA7遺伝子の-600から-220の遺伝子制御部位でメチル化の存在が示されたが、発現が7割のSW480細胞ではメチル化の存在は検出できなかった。次に、大腸癌細胞5株、大腸癌サンプル17例からのDNAをbisu1fite処理した後、メチル化特異的なプライマーでPCRすることによりその部位のメチル化の有無が判定できる。結果は、大腸癌細胞5株、大腸癌13症例でメチル化が検出され、メチル化されていないDNAは大腸癌細胞SW480、全ての正常粘膜で明瞭に、大腸癌細胞HT29と全ての大腸癌症例で弱くではあるが検出された。さらに、-605から515までの遺伝子制御領域にあるメチル化を受ける可能性のある80個のCG配列ひとつひとつについてメチル化されているかどうかの詳細な検討を行った結果、CG配列は転写開始点より上流のグループと下流のグループにパターン化され、EphA7発現減弱は上流域のメチル化と相関していることが明らかになった。

最後に、申請者はEphA7遺伝子の機能を知るために、EphA7の発現のほとんどない大腸癌細胞HCT116のEphA7発現ベクターを遺伝子導入し、過剰発現細胞株を樹立したところ、細胞増殖の抑制が観察された。

申請者の研究は、大腸癌細胞にEphA7遺伝子の発現が低下しているものが約半数あり、発現低下は遺伝子調節領域特に上流域のメチル化により引き起こされることを明らかにした素晴らしい研究であると高く評価できる。

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) DNAのメチル化をPCRを用いて検出する方法の原理は
2) EphA7のリガンドは何か
3) また、そのリガンドの発現とEphA7の発現は相関するか
4) EphA7の発現を低下させることが知られているものはあるか
5) 正常では、EphA7はどの組織に発現しているか
6) β-cateninやp53のメチル化は検討したか
7) Fig.4cで、正常粘膜N4でメチル化が検出されている理由は
8) Chromogranin Aとは何か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、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　今野弘之　副査　前川真人