

Tumor suppressor activity and inactivation of galanin receptor type 2 by aberrant promoter methylation 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: 2017-06-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 三澤, 由幾 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3195

博士(医学) 三澤 由幾

論文題目

Tumor suppressor activity and inactivation of galanin receptor type 2 by aberrant promoter methylation in head and neck cancer.

(頭頸部がんにおけるガラニンレセプタータイプ2の腫瘍抑制作用とプロモーター領域の異常メチル化による発現抑制)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ガラニンレセプター(GALR)スーパーファミリーはガラニンをリガンドとするGタンパク質共役受容体で、*GALR1*、*GALR2*、*GALR3*がある。*GALR*はガラニンと結合し多くのシグナル伝達を活性化させる。我々は以前、頭頸部がんにおいて*GALR1*はプロモーター領域で高メチル化が起こり低発現となること、細胞増殖抑制作用を有すること、高メチル化が予後不良因子となることを報告した。

本研究は*GALR2*にも同様の効果があると考え、頭頸部がん診断時の*GALR2*のメチル化が予後や再発のバイオマーカーとなりうるか評価した。

[材料ならびに方法]

臨床検体は、浜松医科大学の倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に則り同意の得られた、浜松医科大学医学部附属病院耳鼻咽喉科の100症例の手術検体を使用した。がん部と正常粘膜のペアがある36症例はメチル化スクリーニングに使用した。細胞株はミシガン大学で樹立された頭頸部扁平上皮がん細胞株(UM-SCC)を使用した。

DNAを抽出し、バイサルファイト処理をした。臨床検体と細胞株の*GALR2*の定量的メチル化特異的PCR(Q-MSP-PCR)を行った。頭頸部がんサンプル結果をS、メチル化コントロールDNA結果をfull methylated(FM)として、Normalized methylation value(NMV) = ($GALR2-S/GALR2-FM$) / ($ACTB-S/ACTB-FM$)を算出した。当科で以前報告した*GALR1*、ガラニンなどのQ-MSP-PCR結果を併用した。*GALR2*に対するバイサルファイトシークエンシング(BS)を行った。

トータルRNAを抽出し、定量的RT-PCR(Q-RT-PCR)にて臨床検体と細胞株の*GALR2*mRNA発現解析を行った。

GALR2 mRNA低発現のUM-SCC-1, -23, -54に、5-アザシチジン(5-AZA)とトリコスタチンA(TSA)で処理し*GALR2*を再発現させた。

*GALR2*高メチル化のUM-SCC-1にpCMVGALR2HAiresGFPを遺伝子導入後、ガラニンで処理し、細胞数を測定した。

がん部と正常粘膜のある36症例の*GALR2*のNMVを用いてROC曲線を作成し、本研究の*GALR2*メチル化のカットオフ値を決定した。*GALR2*メチル化と臨床情報、他の遺伝子のメチル化について統計学的検討をした。

[結果]

Q-MSP-PCR では、*GALR2* は頭頸部がん細胞株で正常細胞よりメチル化を受けていた($P<0.01$)。BS でも *GALR2* 遺伝子 5'側の CpG は、がん細胞株で正常細胞より高度にメチル化を認めた。Q-RT-PCR では *GALR2*mRNA は正常細胞と比較しがん細胞株で低発現だった($P<0.05$)。5-AZA と TSA で処理したがん細胞株は、Q-RT-PCR で *GALR2*mRNA の再発現を認めた。

がん部と正常粘膜のペア 36 症例のスクリーニングでは、*GALR2* の NMV が、がん部で中央値 0.154、正常粘膜で中央値 0.08 と、がん部で優位にメチル化を認めた($P<0.001$)。ROC 曲線を作成しがん部と正常粘膜を区別する NMV カットオフ値を 0.038 とした。

頭頸部がん臨床検体の全 100 症例のうちメチル化を認める症例は 31%であった。*GALR2* に対する Q-RT-PCR では、メチル化を認める症例(M)では発現を殆ど認めず、メチル化を認めない症例(U)では比較的強い発現であった。

カプラン・マイヤー法とログランク検定で *GALR2* メチル化($P=0.0445$)、*GALR2* とガラニンともにメチル化($P=0.0008$)は無病生存期間の悪化を認めた。多変量ロジスティック回帰分析では、年齢、性、喫煙、飲酒、病期での *GALR2* メチル化の再発オッズ比は 3.12 (95 % confidence interval [CI], 1.16–8.43; $P = 0.24$)、ガラニンと *GALR2* ともにメチル化のある症例では再発オッズ比は 9.05 (95 % CI, 1.76–4.65; $P = 0.008$)であった。

UM-SCC-1 に *GALR2* を遺伝子導入しガラニンで処理すると、遺伝子導入した細胞では細胞数が 33%減少した($P<0.01$)。

[考察]

GALR2 は頭頸部がんにおいて、高頻度にプロモーター領域の CpG アイランドに異常なメチル化がおこり発現が抑制されていることが分かった。また *GALR2* を遺伝子導入したがん細胞株にガラニンを投与すると細胞増殖が抑制されることから、*GALR2* とガラニンには腫瘍抑制効果があると考えられた。*GALR2* とガラニンのメチル化は無病生存率を悪化させ、再発危険因子であった。頭頸部がんにおいて *GALR2* とガラニンは、治療標的となりえ、また予後予測因子であると考えられた。

[結論]

頭頸部がんでは *GALR2* は、プロモーター領域の異常なメチル化により mRNA 発現が抑制されていた。また、*GALR2* は頭頸部上皮において腫瘍抑制効果を有しているものと考えられた。