

論文要旨

CpG hypermethylation of *human four-and-a-half LIM domains 1* contributes to migration and invasion activity of human bladder cancer

〔 *human four-and-a-half LIM domains 1* 遺伝子のメチル化は膀胱癌の遊走、浸潤に関与している 〕

松元 貢

【序論および目的】

我々は以前、膀胱癌のメチル化遺伝子の網羅的検索のために、膀胱癌と正常膀胱組織を用いた cDNA マイクロアレイ解析で、正常組織より発現が低下していた遺伝子のプロファイルを作成した。さらに脱メチル化剤(5-aza-dC)添加前後の膀胱癌細胞株のマイクロアレイ解析を行い、薬剤添加後に発現が上昇していた遺伝子のプロファイルを作成した。この両群のリストをフィルタリングして上位に位置する four and a half LIM domains (FHL-1)を膀胱癌の癌抑制遺伝子と仮定して機能の解析を行った。。

【材料および方法】

膀胱癌細胞株を脱メチル化剤である 5-aza-dc で処理して、処理前後での FHL-1 の発現を real time PCR 法で調べた。

正常膀胱粘膜 (n = 10) と膀胱癌 (n = 70) の臨床検体を用いて metylation specific PCR で FHL-1 のプロモーター領域のメチル化を、real time PCR 法で FHL-1 の発現を調べた。

膀胱癌細胞株である BOY に FHL-1 を導入した細胞を用いて、wound healing assay にて遊走能を、XTT assay にて増殖能を、invasion assay にて浸潤能を調べた。

【結 果】

細胞株においては、5-aza-dc 処理後に FHL-1 の発現の上昇を認めた。

臨床検体では、膀胱癌で優位に FHL-1 のプロモーター領域のメチル化が増加しており (p=0.0066)、FHL-1 の発現は優位に低下していた(p=0.0011)

FHL-1 導入細胞ではコントロール細胞に比べて、遊走能と浸潤能は優位に抑制された (p=0.009、p=0.02)が、増殖能は差を認めなかった。

【結論及び考察】

膀胱癌において FHL-1 は癌抑制遺伝子として機能し、主に癌細胞の遊走・浸潤を抑制していることが示唆された。

(International journal of molecular medicine 2010 Aug ; 26(2) : 241-7 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 688 号	氏名	松元 貢
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	夏越 祥次	竹内 亨

CpG hypermethylation of human four and a half LIM domains 1 contributes to migration and invasion activity of human bladder cancer.

〔 *human four-and-a-half LIM domains 1* 遺伝子のメチル化は膀胱癌の遊走、浸潤に関与している 〕

遺伝子発現においてプロモーター領域のメチル化は膀胱癌を含む様々な悪性疾患で報告され、癌抑制遺伝子の不活性化の一つのメカニズムと考えられている。申請者らは膀胱癌において、メチル化を介した遺伝子の発現抑制を網羅的に調べるために、膀胱癌細胞株を脱メチル化剤 (5-aza-dC) 処理後に発現が上昇した遺伝子のプロファイルと同定した。これと以前、申請者らが行った膀胱癌でのマイクロアレイ解析で発現が低下していた遺伝子のプロファイルをフィルタリングして候補遺伝子である four and a half LIM domains 1 (FHL1) を同定した。

申請者らは FHL1 遺伝子のメチル化による不活化が、膀胱癌の進展に関与していると仮定し、以下の実験を行った。

- 1) 膀胱癌細胞株 (BOY, T24, UMUC) を脱メチル化剤で処理して FHL1 発現の上昇を確認した。
- 2) 70 例の膀胱癌の臨床検体を用いて、FHL1 の発現やメチル化の状態を検討した。
- 3) FHL1 トランスフェクタントを作成し浸潤能、遊走能、増殖能を評価した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 膀胱癌細胞株を脱メチル化剤 5-aza-dC で処理すると、FHL1 の発現が上昇し、特に BOY において顕著であった。
- 2) 臨床検体を用いた実験では、膀胱癌検体と、正常膀胱粘膜の FHL1 のメチル化をメチル化特異的 PCR で調べた結果、癌検体において有意にメチル化の頻度が高くなっていた。FHL1 の mRNA の発現をリアルタイム PCR で調べた結果、癌検体で有意に発現が抑制されていた。
- 3) FHL1 トランスフェクタントを用いた実験では、コントロールに比べてトランスフェクタントで浸潤能と遊走能が有意に抑制されていたが、増殖能には差を認めなかった。

膀胱癌においては FHL1 遺伝子の発現は、プロモーター領域のメチル化により抑制されていることが示唆された。また、FHL1 遺伝子のメチル化による抑制は、癌細胞の遊走能や浸潤能を増加させている可能性が示唆された。FHL1 は新たな膀胱癌治療のターゲットとなる可能性を示唆するものと思われた。

本研究は、膀胱癌における FHL1 遺伝子のメチル化が膀胱癌の進展に関与することを検討したものであり、その結果膀胱癌患者では FHL1 遺伝子のメチル化が高頻度に観察され、その発現が低下していること、また FHL1 は膀胱癌の遊走、浸潤を抑制していることが示された点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 688 号	氏名	松元 貢
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	夏越 祥次	竹内 亨
<p>主査および副査の3名は、平成23年2月8日、学位請求者 松元 貢 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 3つの膀胱癌細胞株 (BOY, UMUC, T24) のうちトランスフェクション実験に BOY を選択した理由は？ (回答) BOY は他の細胞に比べて遊走能、浸潤能が高かった為、FHL1 強制発現による効果が期待されたから。</p> <p>質問2) 5-aza-dC 処理後に BOY のみ顕著に FHL1 発現が上昇した理由は？ (回答) BOY が他の2株に比べて、メチル化による FHL1 発現抑制が強く、これにより悪性を維持していると思われた。</p> <p>質問3) FHL1 発現の臨床病理学的検討は行ったか？ (回答) 行ったが差は出なかった。原因として臨床検体 70 例中、経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-BT) により採取した検体が 63 例あり、電気メスによる熱変性の影響や病理学的ステージ診断が困難であった症例が含まれていたのが一因と考えられた。</p> <p>質問4) 膀胱癌のグレードで差はあったか？ (回答) 本研究で差はなかった。胃癌患者 110 例を FHL1 の発現の高低2グループに分けて行った臨床病理学的検討がなされた論文があったが、浸潤、遠隔転移で有意差が報告されている。</p> <p>質問5) 予後との関連は認められたか？ (回答) 本研究で差は認めなかった。</p> <p>質問6) FHL1 の膀胱癌における臨床での位置付けは何か？ (回答) FHL1 の発現は癌で低下しており、尿、血液での検出は困難である。腫瘍マーカーとしての応用は困難と思われる。</p> <p>質問7) 治療への有用性は？ (回答) FHL1 強制発現株の vivo での増殖抑制効果を検討して、遺伝子治療への応用を考えている。</p> <p>質問8) 増殖で差が出なかった理由は？ (回答) 引用した論文にある通り、増殖に関しては FHL1 を介さない他のシグナル伝達の存在が考えられる。</p> <p>質問9) 膀胱癌と TGF-beta 系との関連について。 (回答) 膀胱癌でも TGF-beta の1型受容体の遺伝子多型と発癌との関連の報告は散見されるが、消化器癌における研究ほどには良く分かっていない。</p> <p>質問10) エストロゲンレセプターと癌との関連の報告は膀胱癌以外でもあるか？ (回答) 圧倒的に乳癌での報告が多いが、胃癌、食道癌、肺癌等の他の癌でも報告はある。</p> <p>質問11) XTT で 3000 個もスプリットして分析時にコンフルエントにはならないのか。 (回答) スプリットする細胞の数も条件と変えて検討し 72 時間の培養時間では 3000 個が適当であった。</p>			

質問 1 2) 患者のバックグラウンドについての検討はしたか。

(回答) 膀胱癌では男性、喫煙、芳香族アミンへの暴露との関連が知られており、検討したかったが問診での把握が十分で無くデータの精度に問題があったため今回は検討しなかった。

質問 1 3) 日本では死因の 14 番目に対し、米国で 5 番目の理由は？

(回答) 米国では脂肪過剰摂取による前立腺癌発症率が高いことが報告されているが、膀胱癌では不明である。

質問 1 4) これ以外の他の 1 連の実験とサンプルは共有しているか。

(回答) 貴重な臨床サンプルでありもちろん共有している。サンプルによっては複数の遺伝子のメチル化が確認されている。

質問 1 5) FHL1 トランスフェクタントでの抗癌剤感受性は増強するか。

(回答) 実施していないが、興味深い指摘であり今後検討したい。

質問 1 6) 5-aza-dC 処理によってメチル化が外れやすい部位はあるか。

(回答) あるかもしれないが、非常にかかりにくい PCR であり、証明は困難と思われる。

質問 1 7) メチル化での FHL1 の発現抑制は発癌のどの段階で起きるのか？

(回答) 臨床病理検討で差がないことより、発癌の初期段階で関与していると考えている。

質問 1 8) FHL1 のタンパクを細胞とインキュベートすることで細胞にとりこまれるか？

(回答) 実施していないが、そのような報告はなく単純なインキュベートでは細胞内への移行は困難と思われる。

質問 1 9) 5-aza-dC 処理した細胞の増殖、浸潤の評価は

(回答) 過去の実験で増殖能が抑制された細胞株がある。浸潤能については未実施であるが興味深い指摘であり今後の検討としたい。

質問 2 0) 5-aza-dC の治療薬としての応用は。

(回答) 白血病などの浮遊細胞では臨床応用されているが、薬剤の取り込みの問題から固形癌での臨床応用は困難と思われる。

質問 2 1) 転写開始部位から-300 をプロモーターと設定した理由は。

(回答) 一般的には 2kb 以内にプロモーターが存在するが、今回は転写開始部位のすぐ上流に CG リッチな部位があったためにプロモーターと仮定した。プロモーターアッセイの検討は今後必要と思われる。

質問 2 2) 他の実験系も含めた膀胱癌の研究で一つの流れみたいなものはあるか？

(回答) 膀胱癌においてはコラーゲンや細胞運動能に関係する骨格系タンパクが癌化に関与していることが示唆されている。

質問 2 3) 免疫染色は行ったか。

(回答) 癌で発現が抑制されていることと、免疫染色メーカーが公開している組織アトラスでも尿路上皮癌は全く染まっていないために施行していない。腎癌は染まるようである。

質問 2 4) 尿での FHL1 の評価は可能か

(回答) 前述のとおり、癌ではその発現が抑制されており検出は困難である。FHL1 遺伝子のメチル化の検出は尿中の DNA は濃度が低いいため、よほど進行した癌以外ではメチル化特異的 PCR による検出は困難と思われる。

質問 2 5) 膀胱癌患者の正常膀胱粘膜の評価は行ったか。

(回答) 興味深い指摘であるが、膀胱癌の性質上同時多発も珍しくないために、癌患者の正常粘膜が本当に正常かは評価困難である。今回の実験では前立腺癌患者の膀胱粘膜をコントロールとして用いた。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。