

## 論 文 要 旨

### **CpG hypermethylation of *collagen type I $\alpha$ 2* contributes to proliferation and migration activity of human bladder cancer**

〔 膀胱癌における COL1A2 遺伝子プロモーター領域の  
メチル化とその機能解析 〕

森 勝久

#### 【序論および目的】

細胞外基質である collagen type 1 alpha 2 (COL1A2) のメチル化による発現抑制と発癌との関連が肝癌で報告されている。我々は膀胱癌 (BT) においてプロモーター領域のメチル化を介した COL1A2 の発現抑制が細胞遊走能および増殖能に影響を与えると仮説した。

また臨床検体における COL1A2 の発現とメチル化の状態を検討した。さらに COL1A2 transfectant を作成し細胞遊走能および増殖能を検討した。

#### 【材料および方法】

脱メチル化剤 (5-aza-dC) 添加前後の BT 細胞株 (BOY) から mRNA を抽出 cDNA マイクロアレイを行った。以前我々が報告した BT14 例の cDNA マイクロアレイの結果 (Oncology Report 2006) と合わせると、COL1A2 は膀胱癌でメチル化により最も発現が低下している遺伝子であった。BOY における COL1A2 のメチル化および mRNA 発現は quantitative methylation specific PCR (QMSP) 法および real-time RT-PCR 法にて検証した。5-aza-dC 添加前後の BOY において wound-healing assay にて遊走能を、MTT assay にて増殖能を評価した。

また臨床検体 (BT 67 例、膀胱正常組織 10 例) においても COL1A2 のメチル化および mRNA 発現を測定した。

さらに膀胱癌細胞株 (BOY) に COL1A2 を導入した細胞を用いて、wound healing assay にて遊走能を、XTT assay にて増殖能を調べた。

#### 【結 果】

5-aza-dC 添加後の BOY では COL1A2 の発現が増大し、メチル化指数は低下していた。さらにコントロールに比べて細胞増殖能と遊走能が低下していた。臨床検体では、正

常組織の COL1A2 の発現は BT に比べ有意に高かった ( $15.8 \pm 3.8$  対  $7.9 \pm 1.8$ ,  $p=0.0015$ )。また正常組織の COL1A2 メチル化指数は、BT に比べて有意に低下していた ( $0.007 \pm 0.006$  対  $23.146 \pm 16.56$ ,  $p=0.0066$ )。また COL1A2 導入細胞においても細胞増殖能、遊走能はコントロールに比し有意に低下していた。

**【結論及び考察】**

膀胱癌では COL1A2 の発現はプロモーター領域のメチル化により抑制され、癌細胞の遊走能や増殖能を増加させている可能性が示唆された。

( INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 2009; 34:1593-1602 掲載 )

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 78 号	学位申請者	森 勝久
審査委員	主査	秋山 伸一	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	米澤 傑	副査 竹内 亨
	副査	原口 みさ子	副査 古川 龍彦

**CpG Hypermethylation of collagen type 1 alpha 2 (COL1A2) contributes to proliferation and migration activity of human bladder cancer.**

(膀胱癌における COL1A2 遺伝子プロモーター領域のメチル化とその機能解析)

最近の研究によると遺伝子のメチル化と癌との関連についての報告が多数見られる。学位申請者らは膀胱癌のメチル化遺伝子の網羅的解析を行い候補遺伝子を同定した。その最上位であった collagen type 1 alpha 2 (以下 COL1A2)は肝癌、結腸直腸癌、悪性黒色腫でメチル化による発現抑制と発癌との関連が報告されていたが、膀胱癌との関連は明らかでなかった。そこで学位申請者らは膀胱癌の臨床検体における COL1A2 の発現とメチル化の状態を検討した。さらに COL1A2 トランスフェクタントを作製し機能解析を行った。メチル化遺伝子の網羅的解析は脱メチル化剤 (5-aza-dC) 添加前後の膀胱癌細胞株 (BOY) から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイを行った。

以前申請者らが報告した膀胱癌 14 例の cDNA マイクロアレイの結果 (Oncology Report 2006) と合わせると、COL1A2 は膀胱癌でメチル化により最も発現が低下している遺伝子であった。BOY における COL1A2 のメチル化および mRNA 発現は quantitative methylation specific PCR (QMSP) 法および real-time RT-PCR 法にて検証した。また臨床検体 67 例、正常膀胱粘膜 10 例を対象とし COL1A2 のメチル化および mRNA 発現を同様に検証した。さらに COL1A2 トランスフェクタントを用いて wound-healing assay にて遊走能を、MTT assay にて増殖能を評価し、その培養液のコラーゲンの蛋白質発現を調べた。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) COL1A2 は、膀胱癌でメチル化により最も発現が低下している遺伝子であった。
- 2) COL1A2 メチル化は、膀胱癌臨床検体 67 例中 42 例 (62.7%) で陽性、正常膀胱粘膜では全例陰性であった。
- 3) COL1A2 メチル化の有無と臨床病理学的因子 (年齢、性別、G grade、T stage、再発頻度および 5 年生存率) との関連性において、有意差を認めなかった。
- 4) COL1A2 トランスフェクタントではコントロールと比較し遊走能、増殖能いずれも有意に低下していた。
- 5) COL1A2 トランスフェクタントで分泌されたコラーゲン type1 蛋白は正常コラーゲン type1 と同様の構成成分であった。

膀胱癌臨床検体においては、メチル化指数は正常組織に比べ有意に高く、逆に mRNA 発現は有意に低下していた。また COL1A2 導入細胞において細胞増殖能、遊走能はコントロールに比し有意に低下していた。トランスフェクタントで分泌されたコラーゲン type1 蛋白は正常コラーゲン type1 と同様の構成成分であり、いわば「のり」のような働きをしていると考えられた。膀胱癌では COL1A2 の発現はプロモーター領域のメチル化により抑制され、癌細胞の遊走能や増殖能を増加させている可能性が示唆された。今後、臨床検体数を増やしての解析や in vivo での実験が期待される。

本研究は、膀胱癌と COL1A2 メチル化の関連を検討したものであり、その結果癌で有意にメチル化が高く mRNA の発現が抑制されていることが示され、また COL1A2 トランスフェクタントで遊走能、増殖能が抑制されることを示し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	総研第 78 号		学位申請者	森 勝久
審査委員	主査	秋山 伸一	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	米澤 傑	副査	竹内 亨
	副査	原口 みさ子	副査	古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成21年 9月 16日、学位申請者 森 勝久 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、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。

質問1) COL1A2 遺伝子と癌との関連は実験前から知っていたか。

(回答) 実験前には知らなかった。我々が行った膀胱癌における網羅的メチル化解析の結果、遺伝子メチル化で発現が抑制される遺伝子リストの最上位にあつたため、興味を持ち研究の対象とした。

質問2) 肝癌では進行に伴い線維化が進んでくるのでコラーゲンと癌との関連が理解しやすい。一方、膀胱や大腸癌では浸潤傾向が強くなると線維化すると思うが、膀胱癌とコラーゲンの関連をどのように考えるか。

(回答) COL1A2 遺伝子は正常と比較して癌で発現が抑制されている遺伝子であり、脱メチル化により再発現してくると考えられた。つまり、癌にとっては不利に働く遺伝子である。COL1A2 トランスフェクタントでは MTT assay や wound healing assay で増殖能や遊走能が低下していることから、膀胱癌では COL1A2 は言わば「のり」のような働きをして癌細胞の viability を低下させているものと考えられた。

質問3) 表在性癌と浸潤性癌で COL1A2 の発現に違いは見られたか。

(回答) Mann-Whitney U 検定で有意差は認められなかった。内視鏡手術で得られた検体では電気凝固のためにタンパクが変性することも多く今後、臨床検体の質を良くしたり検体数を増やしたりして再検討する必要がある。

質問4) 癌細胞以外の部分の影響を排除する工夫は？

(回答) パラフィン検体は同じスライスの HE 染色を顕微鏡下に確認して、癌部のみからの DNA を抽出した。しかし、正常組織(白血球や fibroblast 等)を完全に排除することは困難である。この実験では COL1A2 遺伝子のメチル化は癌組織に特異的と考えられ、正常組織のコンタミによる結果への影響は少ないものと考えられた。

質問5) 検査として臨床応用できるか？

(回答) まず、コラーゲンタイプ 1 $\alpha$ 2 鎖は細胞外分泌タンパクであり血清での測定は可能であるが、癌での発現は非常に抑制されているのでこれ自体をマーカーとして応用するのは困難と思われる。一方、遺伝子のメチル化は尿や血液では検出が難しく、癌組織の採取が必要であり非侵襲的な検査法にはなり得ない。

質問6) COL1A1 も COL1A2 と同様に脱メチル化剤で発現が上昇している遺伝子という結果であるが、このように同様の蛋白をコードする 2 遺伝子がともに上昇しているという報告が他にもあるか。

(回答) Colorectal cancer, breast cancer, hepatocellular carcinoma の cell line を用いた実験で 2 つの遺伝子がともにメチル化機構によって制御されているという報告がある。

質問7) 組織の免疫染色は行ったか。

(回答) おこなっていない。mRNA のデータから膀胱癌ではコラーゲンタンパク自体の発現が低下していると考えられ、免疫染色による評価は困難と考えた。

質問8) 膀胱癌が男性で多いのはなぜか。

喫煙習慣や芳香族アミンへの暴露(塗装業など)と膀胱癌罹患率には強い相関がある。これらの因子が男性に多いことが要因ではないかと考える。

質問9) 今回の研究で膀胱癌患者の職業的な検討はおこなったか。

(回答) おこなっていないが、重要な指摘であり今後検討が必要であると思われる。

質問10) 膀胱癌の周囲の正常組織のメチル化の検討は？

(回答) おこなっていない。膀胱癌は空間的、時間的多発性といった臨床的特徴を有し、癌周囲の正常組織は biological に正常でない可能性が高い。そのため正常膀胱粘膜は非膀胱癌患者から採取した検体を用いた。

質問11) 脱メチル化剤(5aza-dC)の濃度を変えて検討をしたか。

(回答) 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0  $\mu$ M と濃度を振り分けて検討した。10.0  $\mu$ M では膀胱癌細胞株の発育自体が抑制されたが、他の濃度では発育に差は見られなかった。Conventional RT-PCR で発現を検討した結果 1.0  $\mu$ M の細胞毒性が弱く、かつ脱メチル化の効果が強く現れていた。

質問12) DNA メチル化酵素自体は脱メチル化剤で誘導されないのか。

(回答) DNA メチル化酵素自体の発現調節機構は良く分かっていない。DNA のメチル化には 2 種類あり、DNMT1 による維持型 DNA メチル化(DNA 複製後もメチル化状態が維持)と、DNMT3a と DNMT3b による de novo 型 DNA メチル化(メチル化されていない DNA を新たにメチル化)がある。いずれの酵素のプロモーター領域にも転写因子結合部位が報告されているが、脱メチル化を介した発現賦活の報告はない。

質問13) コラーゲン解析がコントロールとトランスフェクタントで同じ結果なのはなぜか。

(回答)  $\alpha$ 1 鎖 2 本と  $\alpha$ 2 鎖 1 本の heterotrimer の形で細胞外に分泌されていることを示している。

質問14) COL1A1 のメチル化の確認は行ったか。

(回答) おこなっていないが、COL1A2 と同様にメチル化されている可能性が高く、今後検討したい。

## 最終試験の結果の要旨

質問15)膀胱癌細胞株 KK47、T24 でメチル化パターンが違うが細胞株の特徴に違いがあるのか。

(回答)KK47 は表在性、非浸潤性の細胞株で、T24 は浸潤性で高率に転移を起こす細胞株である。今回の real time RT-PCR では T24 のみが脱メチル化剤前後で発現が増加していない。T24 ではメチル化機構以外の要因で COL1A2 の発現が低下していると考えられる。

質問16)トランスフェクタントで細胞形態やコロニーの特性に違いが見られたか。

(回答)細胞形態に変化は見られなかったが、コロニーは採取時にディッシュに固着して剥がれ難い印象であった。

質問17)コラーゲン解析でポジコンは何を使用したか。

(回答)天然型の recombinant human collagen I で、市販されている。

質問18)COL1A2 トランスフェクタントを作製すれば1A1 は微量でもコラーゲンタイプ1は正常に分泌されるか。

(回答)実験の結果からは  $\alpha 1$  鎖 2 本と  $\alpha 2$  鎖 1 本の heterotrimer の形で medium に分泌されており、内因性の 1A1 の発現分に応じて分泌されると考えている。重要なのはポジコンと同じ比率である、つまり  $\alpha 1$  鎖 2 本と  $\alpha 2$  鎖 1 本の heterotrimer の形で細胞外に分泌されているということである。

質問19)脱メチル化剤の処理で発現が上昇する遺伝子は 10 個程度なのか。

(回答)脱メチル化剤で発現が 1.5 倍以上上昇している遺伝子は 1463 個存在した。リストはその一部である。

質問20)メチル化で発現が抑制される遺伝子リストに Cell-regulator も上がっているが、どのように考えるか。

(回答)CKIP-1 は cell cycle の negative regulator であり癌抑制的遺伝子として興味深い研究対象であると考ええる。

質問21)Wild-type や control ではヘテロトリマーの形成が出来ないから分泌が見られないのか?

(回答)結果からはそう考える。ただし、分泌されない procollagen が細胞内でどのような役割を持っているのか非常に興味を持っており今後検討したい。

質問22)COL1A1 の蛋白解析は?

(回答)行っていないが、コラーゲン解析を行っており分泌型は  $\alpha 1$  と  $\alpha 2$  の heterotrimer と考えられる。

質問23)COL1A2, A1 共に regulation されているが、染色体上では離れた場所に位置している。このように 2 つの遺伝子が同時に regulate されることは他に知られているか。

(回答)Collagen type1 蛋白は  $\alpha 1$  鎖と  $\alpha 2$  鎖が 2:1 で heterotrimer を形成している。それぞれをコードしている遺伝子は 17 番染色体と 7 番染色体に離れて存在している。これらが同時に regulate されるメカニズムについては、cis-acting element の存在が 1 つの機序と考えられている。つまり特定の塩基配列である CCAAT モチーフへの転写因子の結合により制御されていると考えられている。

質問24)メチル化機構により COL1A2, A1 が同時に regulate されているという報告はないか。

(回答)胃癌、食道癌のマイクロアレイ解析において同時に発現が上昇しているという報告がある。いずれも転移や浸潤能など high grade malignancy と発現が関連しているとの結果であった。Colorectal cancer, breast cancer, hepatocellular carcinoma の cell line で COL1A2, A1 のメチル化指数と mRNA 発現が逆相関するという報告がある。Methyl-DNA-binding protein である RFX family protein がその発現抑制のメカニズムに関与している。

質問25)Wound healing assay 遅延に関して、TGF  $\beta$  などのコラーゲンの発現に影響を与えるようなものが見つければ phenotype も変わってくると思うが調べたか。

(回答)おこなっていないが、興味深い指摘であり今後ぜひ検討したい。

質問26)COL1A2 に関して、相反する論文が出ているがどうふうに考えているのか。

(回答)舌癌・髄芽腫・胃癌・食道癌では onco-related molecule と報告されている。一方、結腸直腸癌・肝細胞癌・膀胱癌・悪性黒色腫では癌で発現が低下しているとされる。今回の研究では COL1A2 の強制発現系で増殖能や遊走能が低下しており collagen type1 蛋白は膀胱癌において“のり”のような働きをしていると考えられた。悪性新生物において collagen 1A2 gene の発現は臓器によって違いが見られる。同じタンパクでも臓器によってその働きが変わってくるものと考えられる。

質問27)PCR 領域を選んだ理由は?

(回答)Exon1 の上流で CG rich な部位。過去の COL1A2 promoter study を参考に選択した。

質問28)特異的な転写因子やメチル化関連蛋白との関連はあるのか。

(回答)RFX (the regulatory factor for X box) family protein, major histocompatibility class 2 transactivator (C II TA) との関連が見られる。前者は methyl-DNA-binding protein であり、特に exon 1 上にある +7CpG がメチル化あるいは C から T に変異している場合に binding affinity が強くなると報告されている。

質問29)デザインしたプライマー内に +7 CpG は含まれるか。

(回答)含まれない。我々が作製した primer は coding starting site から -300 の部位にある。複数の primer を独自に作製したが最も MSP band が検出しやすい部位で実験したためである。報告では +7 CpG が 50% 以上メチル化されている場合は、領域以外の CG も同様にメチル化がみられるとされるため特に問題ないと考えた。

質問30)In vivo の実験は?

(回答)おこなっていないが必要と思われ、今後検討したい。

質問31)5aza-dC で脱メチル化した細胞は再びメチル化されるのか。

(回答)メチル化は次世代の細胞に受け継がれる。5aza-dC の機序は DNA methyltransferase である DNMT1 を強力に阻害し DNA メチル化を維持できなくすることである。継代していく際に 5aza-dC を添加しなければ再び DNMT1 によりプロモーター領域のメチル化はおこると考えられる。つまり、5aza-dC 処理は一過性の作用である。

質問32)MSP, USP2 つのバンドが出る理由は?

(回答)理由は 3 つ考えられる。一つは正常組織のコンタミネーション。二つ目は癌が heterogenous である可能性。3 つ目はサンプル作製 (bisulfite 処理) が不完全である可能性。

以上の結果から、5 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有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。