

論 文 要 旨

CpG Hypermethylation of the UCHL1 Gene Promoter is Associated With Pathogenesis and Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma

腎細胞癌における UCHL1 遺伝子プロモーター領域のメチル化は
その病因や予後に関係する

加々良 一郎

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

プロモーター領域のメチル化は、転写レベルで遺伝子の不活性化を起こすことが知られている。我々は、腎細胞癌において、プロモーター領域のメチル化を介した遺伝子の発現抑制を調べるために、腎細胞癌の細胞株を脱メチル化酵素で処理し、マイクロアレイを行った。脱メチル化処理後、発現が増加した遺伝子の中から *Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1)* 遺伝子に注目した。UCHL1 は脱ユビキチン化酵素であり、食道癌・胃癌・大腸癌等でプロモーター領域のメチル化と癌との関連が報告されている。腎細胞癌 (RCC) において、プロモーター領域のメチル化を介した UCHL1 の発現抑制と臨床病理学的事項との関連を検討した

【材料および方法】

- ・ 脱メチル化剤添加前後の RCC 細胞株 (ACHN) から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイを行った。
- ・ 脱メチル化剤添加後に発現が上昇していた上位 10 遺伝子の中から UCHL1 を選択した。
- ・ UCHL1 ベクターを ACHN にトランスフェクションした。得られた恒常的形質転換細胞を用いて MTT assay を行った。
- ・ RCC 細胞株と臨床検体 (RCC 60 例、正常腎組織 20 例) における UCHL1 の mRNA 発現は、定量的 RT-PCR 法にて測定した。
- ・ RCC 細胞株と臨床検体 (RCC 131 例、正常腎組織 61 例) における UCHL1 遺伝子プロモーター領域のメチル化は、定量的メチル化特異的 PCR 法 (QMSP) にて測定した。MYOD1 を QMSP の内在性コントロールとした。Methylation Index = (UCHL1 QMSP/MYOD1 QMSP) × 1000 とした。Methylation Index = 0 は Methylation negative、Methylation Index > 0 は Methylation positive とした。

- ・ PCR 産物を直接シーケンスしてメチル化特異的 PCR の結果を検証した。
- ・ 同一患者から得られたパラフィン包埋組織を 5 μ m に薄切し、ABC 法による免疫組織染色を行った。1 次抗体は UCHL1、発色には DAB を使用した。Immunostaining Score は、少なくとも 3 視野 ($\times 200$) で観察して、negative (0-5% of positive cells), 1+ (6-20% of positive cells), 2+ (21-50% of positive cells) and 3+ ($> 50\%$ of positive cells) の 4 段階に評価した。スコアの算出は盲検的に 2 人の実験者により行われた。
- ・ Real-time PCR, Immunostaining Score の結果と、病理学的事項には Mann-Whitney U 検定を、UCHL1 mRNA 発現と Methylation Index の相互関係には Spearman の順位相関検定を用いた
- ・ 生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて log-rank 検定にて有意差を検証した。

【結 果】

腎細胞癌の細胞株を脱メチル化酵素で処理しマイクロアレイを行い、脱メチル化処理後、発現が増加した遺伝子の中から UCHL1 遺伝子に注目した。cell line で PCR を行い、脱メチル化処理後、UCHL1 の発現が増加していることを確認した。UCHL 遺伝子の機能を見るために UCHL1 ベクターを ACHN にトランスフェクションし恒常的形質転換細胞を作成した。この細胞を用いた MTT assay では、UCHL1 をトランスフェクションしたもので有意に増殖が抑制されていた ($P < 0.0001$)。臨床検体で DNA シーケンスを行いメチル化の確認したところ、正常腎組織では UCHL1 のプロモーター領域はメチル化されておらず、腎癌の組織ではメチル化されていた。次に、臨床検体において UCHL1 の発現とメチル化の頻度を PCR で確認した。UCHL1 の発現は癌に比べ正常組織で有意に高かった ($P < 0.0001$)。Methylation Index は、正常組織に比べ癌で有意に高かった ($P = 0.011$)。また、UCHL1 の発現と Methylation Index には、負の相関が認められた ($P = 0.017$)。免疫組織染色では、正常組織は UCHL1 染色陽性で、癌では陰性であった。Immunostaining score は正常組織に比べて癌組織で有意に低値であった ($P < 0.0001$)。UCHL1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化と予後との相関を調べたところ、メチル化陽性群は有意に予後不良であった ($P = 0.048$)。

【結論及び考察】

今回の研究により、腎細胞癌における UCHL1 遺伝子の発現はプロモーター領域のメチル化により制御されていることが示唆された。また、UCHL1 は、腎細胞癌において癌抑制的に働くと考えられた。UCHL1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は予後と相関があることが示唆された。

論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 77 号		学位申請者	加々良 一朗
審 査 委 員	主 査	米澤 傑	学 位	博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	堂地 勉	副 査	夏越 祥次
	副 査	古川 龍彦	副 査	原口 みさ子

CpG hypermethylation of the UCHL1 Gene Promoter is Associated With Pathogenesis and Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma.

(腎細胞癌における UCHL1 遺伝子プロモーター領域のメチル化は
その病因や予後に関係する)

プロモーター領域のメチル化は、転写レベルで遺伝子の不活性化を起こすことが知られている。そこで学位申請者らは、腎細胞癌において、プロモーター領域のメチル化を介した遺伝子の発現抑制を調べるために、腎細胞癌の細胞株(ACHN)を脱メチル化処理し、DNAマイクロアレイを行った。脱メチル化処理後、発現が増加した遺伝子の中から Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCHL1)遺伝子に注目した。UCHL1 は脱ユビキチン化酵素であり、食道癌・胃癌・大腸癌等でプロモーター領域のメチル化と癌との関連が報告されている。腎細胞癌において、プロモーター領域のメチル化を介した UCHL1 の発現抑制と臨床病理学的事項との関連を検討した。

腎細胞癌細胞株と臨床検体における UCHL1 の mRNA 発現は定量的 RT-PCR 法、UCHL1 遺伝子プロモーター領域のメチル化は、定量的メチル化特異的 PCR 法(QMSP)にて測定した。PCR 産物を直接シーケンスしてメチル化特異的 PCR の結果を検証した。同一患者から得られた腎癌・正常腎のパラフィン包埋組織を用い UCHL1 の免疫組織染色を行った。UCHL1 ベクターを ACHN にトランスフェクションし、得られた恒常的形質転換細胞を用いて MTT assay を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1)脱メチル化処理前後の細胞株で PCR を行い、UCHL1 の発現の増加が確認された。
- 2)MTT assay では、UCHL1 をトランスフェクションした腎癌細胞株ACHNで有意に増殖が抑制されていた($P < 0.0001$)。
- 3)臨床検体で DNA シーケンスを行いメチル化の確認したところ、正常腎組織では UCHL1 のプロモーター領域はメチル化されておらず、腎癌の組織ではメチル化されていた。
- 4)臨床検体において UCHL1 の発現は癌に比べ正常組織で有意に高かった($P < 0.0001$)。Methylation Index は、正常組織に比べ癌で有意に高かった($P = 0.011$)。UCHL1 の発現と Methylation Index には、負の相関が認められた($P = 0.017$)。
- 5)免疫組織染色では、正常組織は UCHL1 染色陽性で、癌では陰性であった。Immunostaining score は正常組織に比べて癌組織で有意に低値であった($P < 0.0001$)。
- 6)メチル化陽性群は有意に予後不良であった($P = 0.048$)。

今回の研究により、腎細胞癌における UCHL1 遺伝子の発現はプロモーター領域のメチル化により制御されていることが示唆された。また、UCHL1 は、腎細胞癌において癌抑制的に働くと考えられた。UCHL1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化は予後と相関があることが示唆された。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 77 号		学 位 申 請 者	加々良 一朗
審 査 委 員	主 査	米澤 傑	学 位	博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	堂地 勉	副 査	夏越 祥次
	副 査	古川 龍彦	副 査	原口 みさ子
<p>主査および副査の5名は、平成21年 9月 8日、学位申請者 加々良一朗 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。</p> <p>質問1)本研究で UCHL1 遺伝子に着目した理由は何か。</p> <p>(回答)脱メチル化剤処理前後の腎癌細胞株(ACHN)で発現が上昇していた上位10遺伝子の中の一つであって、遺伝子発現とメチル化との関連については食道・胃・大腸・卵巣癌で報告があるが、腎細胞癌では報告がなく興味を持たれたからである。</p> <p>質問2)UCHL1 の発現は他の細胞株ではどうだったのか。</p> <p>(回答)UCHL1 の発現の増加は他の腎癌細胞株(Caki1 および Caki2)でも確認されている。</p> <p>質問3)UCHL1 が腎癌に対して癌抑制的に働くメカニズムはなにか。</p> <p>(回答)UCHL1 は脱ユビキチン化酵素の一つである。主な働きの一つは、ユビキチン化された特定のタンパク質を脱ユビキチン化し、その分解を抑制する。target が癌抑制遺伝子であればその分解を抑制し、癌抑制的に働くと考えられる。</p> <p>質問4)UCHL1 と p53 との関連も論文に書かれているが本研究ではどうか説明せよ。</p> <p>(回答)脱ユビキチン化酵素の一つである HAUSP が p53 を脱ユビキチン化し、p53 のプロテアソームによる分解を抑制するという報告があり、脱ユビキチン化酵素が癌抑制的に働く例として引用した。</p> <p>質問5)UCHL1 は食道・胃・大腸・卵巣癌などで報告があり、それぞれについて違った結果が示されているようだが、臓器特異性について何か考察があるか。</p> <p>(回答)食道癌は UCHL1 メチル化が高いほど予後が悪く、胃癌では diffuse type が intestinal type の胃癌より UCHL1 メチル化が高い。大腸癌・卵巣癌では臨床病理学的事項との相関は報告されていなかったが、今回の実験では腎癌の予後と UCHL1 メチル化の相関が認められた。UCHL1 は臓器特異的に存在する蛋白ではないが、いずれの臓器の癌でもその発現の抑制は癌の進展に寄与しているのではないかと考えられる。</p> <p>質問6)UCHL1 のメチル化指数や発現は、腎細胞癌の組織型の違いによって特徴が認められたか。</p> <p>(回答)腎細胞癌の組織型の違いによる特徴は認められなかった。今回の実験で淡明細胞型以外は、乳頭型 5、嫌色素細胞型 1、ペリニ管癌 1 と検体数が少なかった。各組織型の検体数が増えれば違いが認められる可能性はある。</p> <p>質問7)泌尿器科領域での癌の発生頻度は。</p> <p>(回答)前立腺・膀胱・腎の順で発生頻度が高い。</p> <p>質問8)腎癌は男性に頻度が多いが、その理由は何と考えられるか。</p> <p>(回答)腎癌のリスクファクターは単一ではなく、喫煙、肥満、高血圧などの因子が複合的・共同的に作用して発癌のリスクを高めていると考えられている。このような因子が男性に多いためと考察される。</p> <p>質問9)正常組織はどのような検体からとったものか。</p> <p>(回答)腎癌患者の腎摘除術で摘出した腎臓の正常部を採取した。</p> <p>質問10)卵巣癌においてメチル化による UCHL1 の発現の抑制の報告があるが、予後との関係は検討されていたか。</p> <p>(回答)過去の報告では検体数が 17 と少なかったせいか、予後との関連についての検討はされていない。</p> <p>質問11)UCHL1 の機能は良くわかっていないようだが、今回報告した以外で何か判明している機能はあるか。</p> <p>(回答)UCHL1 は脳の全タンパク質量の 1-5%を占めるタンパク質であり、その変異が優性遺伝性パーキンソン病患者の家系より報告されている。パーキンソン病は、神経細胞内に α シヌクレインが蓄積して凝集体を形成することが発症の一因と考えられている。UCHL1 が変異して α シヌクレインのユビキチン化による分解が阻害されることが発症の原因と考えられている。</p> <p>質問12)臨床的に腎癌症例のメチル化指数は治療方法選択の指標になるか？</p> <p>(回答)現在、メチル化指数の違いによる治療法の検討は行っていない。今後、検体数を増やして検討することで予後に影響することが確信できれば、メチル化指数が高い症例については術後補助療法を追加するなどの可能性も出てくるかもしれない。</p> <p>質問13) Kaplan-Meier で予後に差があると報告しているが、症例数が違えば違った結果にならないか。</p> <p>(回答)さらに検体数を増やして検討する必要があると思われる。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問14)トランスフェクションの細胞はいくつか作成したのか。トランスフェクタントで形態的变化は無かったか。

(回答)トランスフェクタントは12株作成した。継代後 UCHL1 の発現を RNA レベル、蛋白レベルで確認できたものを実験に使用した。鏡検上はトランスフェクタントにおいて形態的变化は認められなかった。

質問15) UCHL1 が細胞増殖に関わるメカニズムはなにか。

(回答) UCHL1 はユビキチン化された特定のタンパク質を脱ユビキチン化し、その分解を抑制する。UCHL1 の target が癌遺伝子抑制伝子であれば、その分解を抑制し癌抑制的に働く。腎癌では UCHL1 の発現がメチル化により抑制されているので、UCHL1 を癌細胞に導入すると細胞増殖が抑制されると考えられる。

質問16) NF- κ B について論文で考察されているが、説明せよ。

(回答) 家族性円柱腫症の遺伝子として同定されていた CYLD は脱メチル化酵素の UCH family とコンセンサス配列をもつことから、脱メチル化酵素であろうと予測されていた。CYLD は TRAF2 (TNF receptor activation factor 2) のユビキチン化を阻害または解除することで NF- κ B のシグナルを負に制御することが示された (2003 nature)。家族性円柱腫症の患者は CYLD が欠損していることから NF- κ B のシグナルが持続的に続くと思われ、異常な細胞増殖を起こすと考えられる。脱メチル化酵素が癌抑制的に働く一例として挙げた。

質問17) MSP のバンドが出ていれば、USP のバンドは弱く出そうだが、USP のバンドの発現に差がないように見える。これはどのように考えられるか？

(回答) 癌の組織にも間質などに正常の細胞が含まれており、それはメチル化されていない可能性がある。また癌がモノクローナルでなく、メチル化の頻度に差がある可能性もある。PCR のサイクル数を下げれば USP のバンドにも差が出てくるかもしれない。

質問18) UCHL1 の発現と予後には相関があったか。

(回答) 相関は認められなかった。mRNA を手に入れることのできる検体数が 63 例と少なかったためと考えられる。数を増やせば、有意差が出てくる可能性がある。

質問19) VHL 遺伝子、p53 との関連は調べたのか。

(回答) VHL 遺伝子は腎癌の原因遺伝子として多数の報告があり、p53 は脱ユビキチン化酵素により分解が制御され、腎癌との関連の報告も見られる。しかし今回は UCHL1 またそのメチル化との関連は検討しなかった。

質問20) 腎癌の中にも methylation negative のものが認められるが、こういった症例は免疫染色で UCHL1 は陽性になるのか。

(回答) 腎癌においてもメチル化 negative なものもあり、これらについては免疫染色でも腎癌の部位が UCHL1 陽性に染まっていた。

質問21) DNA はパラフィン検体から取り、RNA は fresh 検体からとったものか。メチル化の検討はパラフィンから採った DNA のみで行ったのか。

(回答) メチル化の検討はパラフィンのサンプルのみで行った。パラフィンから採ったサンプルは DNA の劣化の心配はあるが、fresh な検体のみでは、検体数に限りがあったのでパラフィンのサンプルのみで行った。

質問22) Primer 作成部位はなぜ同部位で行ったか。

(回答) Exon1 の上流でプロモーターと考えられ、CG rich な領域、また過去の論文でも同部位で作成されていたのでこの部位で primer を作成した。

質問23) ヒストンの修飾について検討したか。他の論文で報告されていたか。

(回答) 今回はヒストンの修飾に関しては検討しなかった。今回示した過去の「UCHL1 とメチル化に関する論文」でもヒストンの修飾について検討したものはない。

質問24) 過去の論文で、食道癌についての予後は UCHL1 のメチル化とどのように相関したのか。

(回答) 今回の我々の報告と同様、メチル化の傾向があるものは予後が悪いという報告であった。

質問25) 多変量解析で相関はなかったようだが、メチル化と T stage の相関があったのか。

(回答) 有意差は認められなかったが、傾向は認められた。検体数を増やせば有意差が出るかもしれない。

質問26) 検体をとるとき正常部と癌部をどのように区別したのか。DNA を採る際の検体の量はどれぐらいか。

(回答) 顕微鏡で正常部、癌部の確認をした。腎癌は膀胱癌や前立腺癌と違い被膜で包まれていることが多く、非癌部との境界が比較的明瞭であることから contamination の可能性は低いと考えた。DNA を採る際の検体量は、パラフィン包埋切片を 10 μ m に薄切し、それを 10 枚用いて抽出した。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。