

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 年度～2009 年度
 課題番号：20791142
 研究課題名 (和文)
 子宮頸癌発生に関わる p72 遺伝子の臨床検体における発現および細胞株における強制発現
 研究課題名 (英文)
 p72 expression on cervical cancer and the effect of over-expression of p72 on cervical cancer cell line.
 研究代表者 宮武 崇 (Takashi Miyatake)
 大阪大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：70448067

研究成果の概要 (和文)：

p72発現量を、頸癌、正常子宮頸部の間で比較を行った。結果、両者の間に変化は見られず、他法を用いた結果とは異なる結果となった。

また、p68、β-カテニンの発現を、頸癌、正常子宮頸部において比較したところ、p72とp68、β-カテニンの発現と相関は明らかではなかった。p72は、頸癌発生と必ずしも相関しているとは結論できなかつた

並行して行った、p72を強制発現する株を用いた実験では、p72の発現と関連して変化する約20個の蛋白を検出した。さらにこれらの蛋白より、癌の進展に直接関与する蛋白の同定を進めている。

研究成果の概要 (英文)：

The p72 expression on cervical cancer specimens are evaluated by real-time PCR and compared with p72 on normal uterine cervix. The results show no difference. The p72 protein expression are also evaluated with immunostaining and p72 related genes, p68 and β-catenin are compared with p72 expression level. The protein expression of p72 is significantly low in cervical cancer, however, expressions of p68 and β-catenin are not tightly related with p72 expression. The results so far cannot conclude the function of p72 on cervical carcinogenesis.

A cervical cancer cell line, which is introduced p72 gene, are made and the protein expression was compared with the original cell line with 2-dimensional electrophoresis. We detected 20 proteins, whose expression level has changed with the introduction of p72. Now we are further targeting a protein which is directly related with carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：婦人科腫瘍
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学
キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、cDNAマイクロアレイを用いた手法で子宮頸癌の発生に関わる遺伝子を解析し、報告した。約12,000種のgeneおよび48,000種のexpressed sequence tagの中から、子宮頸癌、正常子宮頸部組織のmRNA発現量を比較したところ、頸癌発生に伴って発現量の変化した32の遺伝子が抽出され、これらは子宮頸癌発生に関わる重要な遺伝子であることが示された。p72は我々が新しく子宮頸癌発生においてmRNA発現量が正常子宮頸部に比べ子宮頸癌で低下していることを報告した遺伝子の中の1つである。

p72はRNAヘリカーゼに属し、RNAのスプライシング、翻訳、リボゾームの生成といった、RNA代謝の本質的な部分すべてに関わっている。またp72はDEAD-boxと呼ばれるRNAサブクラスに属し、Asp-Glu-Ala-Asp(D-E-A-D)の特徴的な配列を持ち、DNAのトランスクリプションにも関与し、また、RNAの2次構造の構成にも関わっているとされる。

これまでに、p72は結腸癌の発生において発現が増強していることが報告されている。結腸癌発生においてp72は、同じくDEAD-boxに属するp68とともに、 β -catenin と複合体を形成し、遺伝子のトランスクリプションを促進していることが証明されている。p72及びp68を結腸癌細胞においてknockdownすると、細胞増殖は抑制され、p72、p68は結腸癌発生に直接に関与していることが示唆されている。

しかし、これまで、p72の癌発生への関与を示す報告は結腸癌に関してのみであり、子宮癌においてもp72は研究対象として有望であり、今後の研究目標になるものと期

待される。我々の報告で、頸部扁平上皮癌発生においてはp72のmRNA量が、結腸癌とは逆に減少していた。

子宮頸癌での我々の研究は扁平上皮癌を研究対象としており、扁平上皮癌は頸癌の多くを占める主要な組織型である。子宮頸部扁平上皮癌の発生においては、頸部異型上皮から上皮内癌を介して浸潤癌に進展していく経路が解明されており、p72の発現量減少が頸癌発生のどの段階で生じているかを解明することは頸癌発生への関与の解明において重要な知見となる。

2. 研究の目的

本研究では、より普遍的なp72と子宮頸癌発生との関係を調べるために、頸癌の網羅的な組織型における検討とさらに頸癌細胞株においてp72の強制発現がどのような効果を与えるかについても検討する。

3. 研究の方法

対象となる子宮頸癌組織は、倫理委員会における承認および患者本人の承諾を得た上で、大阪大学医学部附属病院における婦人科癌検体の凍結組織ストックを用いる。子宮頸癌各組織型で50程度の検体を集め、当該施設だけでは少数の場合、大阪大学関連病院における臨床検体も使用する。

また、子宮頸癌の前癌病変である子宮頸部異形成においても検討を行うことも検討し、大阪大学医学部附属病院における検体を倫理委員会における承認および患者本人の承諾を得た上で用いる。

対象組織中のp72のcDNA発現研究のため、組

織からのmRNAの抽出、reverse transcriptaseを用いたcDNAへの変換、PCR法を用いたp72のcDNA検出を行う（RT-PCR法）。こうにして得たcDNAはPCR法を用いて発現量の解析を行い、アガロースゲルを用いた電気泳動法で増幅断片を検出する。検出断片はエチジウムブロマイドを用いた蛍光により同定する。さらに、real-time PCR法を用いて定量的なcDNA発現量の比較も行い、検体間でのcDNA発現を比較する。

また、研究室にて保持している子宮頸癌細胞株Hela 及びCaskiを用いてp72の遺伝子導入を行う実験を平行して行う。p72遺伝子の open reading frame を pCMV-script vector に組み込んだ上、当研究室で保持している子宮頸癌細胞に対してLipofectAMINE-Plus Reagent を利用して導入し、増殖能、浸潤能が非導入株と比して有意に変化するかを検討する。

4. 研究成果

p72遺伝子の発現を、子宮頸癌の他の組織においても確認するため、子宮頸癌16例（角化型扁平上皮癌、非角化型扁平上皮癌）において、p72遺伝子の発現量をreal-time PCRを用いて測定し正常の子宮頸部上皮20例と比較を行った。結果p72の発現量は角化型扁平上皮癌、非角化型扁平上皮癌ともに正常上皮に比べて発現量の低い傾向は見られたものの、優位な差異は見られず、マイクロアレイを用いて検出を検索とは異なる結果となった。この実験を子宮頸部異形成30例においても同様に行ったが、子宮頸癌、正常子宮頸部の結果と比較しても、有意に発現が変化している結果は得られなかった。この原因について、実験の手法や検出感度の差異が考えられる。マイクロアレイの解析に

おいては網羅的な遺伝子発現の解析を行うため、発現量の差異は必ずしも、正確ではないとの報告もあり、マイクロアレイで2倍の以上の発現量の変化が検出されたp72について、有意な差異までを示す値ではなかった可能性が考えられる、この結果の妥当性についてさらに検討を行う必要がある。

また、関連遺伝子であるp68、 β -カテニンについてp72の発現を解析するため免疫染色法を用いて子宮頸癌20例、正常子宮頸部上皮20例をもとに切片上で比較検討を行った。免疫染色では隣接する切片において正確に同じ部位、細胞での比較を行った。結果、p72蛋白の発現は細胞核を主とした発現部位として、染色強度は染色上正常上皮に比べ発現低下を認めた。その発現量はp68、 β -カテニンと比較したところ、p68、 β -カテニン共に主として細胞質に発現が見られ、核にも弱い発現がみられたが、正常頸部、頸癌の間の比較においては発現に差異ははっきりせず、また、同一細胞間でのp72、p68、 β -カテニンの発現にはっきりとした相関は見られなかった。この結果は蛋白の発現として比較すれば、必ずしもp72はp68、 β -カテニンの発現と関連しておらず、頸癌の発生においてこれらの蛋白の機能が関与するとまでは示すことができなかった。またp72の発現量の免疫染色の結果は、real-time PCRで得られたcDNAの発現と必ずしも一致しておらず、蛋白の発現と、mRNAの発現量とに相違が存在することも考えられる。この結果の検討、蛋白、mRNAの発現の差異についての考察を現在他の手法にて確認、再検討することを考慮している。

p72の免疫染色については、前癌病変

である子宮頸部異形成においても染色を行い、検討を加えたところ。異形成の段階においてもp72に発現低下がみられ、その傾向は病変の程度、つまり癌への進行とも相関があることが示唆された。この結果はp72が異形成の段階での癌への進行を予測する因子となり得ることを示唆し、異形成から癌への進行とp72発現の相関の解析をさらに進めている。

これらと並行して p72 を強制発現させた場合の変化について、子宮頸癌細胞株 HeLa に遺伝子導入を行う実験も進め、当研究室で保持している子宮頸癌細胞に対して LipofectAmine-Plus Reagent を利用して p72 遺伝子を組み込んだ pCMV-script vector を導入し、p72 を有意に強制発現する株を作成した。これら細胞についての元細胞との増殖能、浸潤能と比較を行ったが、細胞株のこれらの機能についての変化は遺伝子導入により差異は現れなかった。また、これら導入細胞を用いて、蛋白の発現量変化を検出するため、2次元電気泳動を行い、p72 強制発現に伴い発現の変化する約 20 の蛋白を同定した。これらの蛋白は p72 の強制発現によりその発現量が影響され、p72 の機能を、より下流において担っている蛋白と想像することができ、p72 以上に直接的に子宮頸癌の発生にかかわっている可能性を持っている。現在さらにこれら 20 の蛋白について機能の検討実験を進め、頸癌発生に直接かかわる因子の解析を進めている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者、研究代表者の部局

宮武 崇 (Takashi Miyatake)

研究者番号 : 70448067

部局

大阪大学・医学部附属病院・助教

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :