

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790243
 研究課題名（和文） 膵癌進展過程における TrkA 遺伝子非 CpG アイランド領域シトシンメチル化の解析
 研究課題名（英文） Analysis of cytosine methylation in non-CpG island of the TrkA gene promoter during pancreatic cancer progression
 研究代表者
 藤本 昌代 (FUJIMOTO MASAYO)
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号：70403235

研究成果の概要：遺伝子転写調節領域に存在する CpG アイランドのシトシンメチル化は、遺伝子発現を抑制することが知られている。本課題では、NGF の高親和性受容体である TrkA 遺伝子の非 CpG アイランドのシトシンメチル化により膵癌において TrkA 遺伝子発現が亢進する機序を明らかにするとともに、膵癌の神経周囲浸潤部位の病理組織において、TrkA 遺伝子発現と非 CpG アイランドメチル化が高率であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	240,000	2,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：癌、遺伝子、病理学

1. 研究開始当初の背景

遺伝子転写調節領域には、CpG 配列が集簇して CpG アイランドを形成する。CpG アイランドのシトシンの多くが非メチル化状態であり、CpG アイランドのシトシンメチル化により遺伝子転写が抑制される。即ち、メチル化部位では、MeCP2 などのメチル化シトシン結合蛋白が DNA に結合することにより、転写因子の結合を阻害して、転写が抑制されることが知られていた。このような癌抑制遺伝子のシトシンメチル化による発現抑制は、癌化に寄与する。一方で、非 CpG アイランドのメチル化に関する研究は少なく、機能的意義は不明であった。

2. 研究の目的

膵癌は消化器系悪性腫瘍の中では最も予後不良な腫瘍の一つである。膵臓自体が深部に位置し、背側には腹腔神経叢があるが、膵癌では高率に神経周囲浸潤を来し、予後不良に寄与するとともに、疼痛の原因になっている。

膵癌細胞と、神経・神経周囲組織の相互作用を考える上で、神経成長因子 NGF とその受容体の発現を予検討したところ、神経周囲浸潤部位では、神経線維から NGF が分泌され、腫瘍細胞には NGF の高親和性受容体 TrkA が高発現していることがわかった。膵

実質に限局する腫瘍に比して、神経周囲浸潤部の腫瘍細胞には、TrkA 発現が亢進していた。

TrkA 遺伝子プロモータ領域をクローニングして、転写調節機構を明らかにし、膀胱癌神経周囲浸潤部で TrkA 発現が亢進するメカニズムを解明する目的で、以下の検討を行った。

3. 研究の方法

①神経成長因子 NGF の高親和性受容体 TrkA 遺伝子転写調節領域の非 CpG アイランドに位置する AP-1 類似配列 (TGAGCGA) の機能について、ゲルシフトアッセイや、変異を導入したプロモータのトランスフェクションにて検討する。

②膀胱実質に限局する腫瘍と、神経周囲浸潤部の腫瘍細胞とで、AP-1 類似配列を含む部分のシトシンメチル化を比較検討する。

③膀胱癌病理組織を用いた TrkA 遺伝子プロモータのメチル化解析で得られた知見に基づいて、膀胱癌の BAMB I 遺伝子発現制御についても、同様の検討を行う。

4. 研究成果

①NGF の受容体 TrkA 遺伝子転写調節領域の非 CpG アイランドに位置する AP-1 類似配列 (TGAGCGA) は、ゲルシフトアッセイにより c-Jun 蛋白と結合して、転写を抑制することを明らかにした。AP-1 類似配列近傍にメチル化が入ると、c-Jun との結合が阻害されるため、抑制が解除されて、TrkA 遺伝子の転写が促進することがわかった。

②病理組織標本を用いた検討では、膀胱実質に限局する腫瘍細胞では、AP-1 類似配列近傍の CpG にはメチル化が乏しく、免疫染色でも TrkA 蛋白の発現が低い。これに対して、神経周囲浸潤部位では、TrkA 蛋白の発現が強く、AP-1 類似配列近傍の CpG のメチル化が高頻度であった。①に示した分子機構により、メチル化による抑制的 AP-1 site の抑制で、TrkA 発現が亢進することが示唆された。

③病理組織標本を用いて、神経周囲浸潤部位という特定の形態から切り出した微少な組織サンプルを、メチル化解析に用いる方法を確立した。微小サンプルをアガロースビーズに包埋して、Bisulfite 処理を行うことにより、DNA 抽出や薬剤処理によるサンプルの損失を防ぐことが出来る。このような知見に基づいて、膀胱癌の検討を進めた。

BAMB I は BMP/TGF-beta の偽受容体であり、BAMB I 高発現になると TGF-beta のシグナルを阻害する。連携研究者北澤荘平の、デスマイド腫瘍における BAMB I 発現とメチ

ル化による制御の検討により、BAMB I 遺伝子発現が CpG メチル化により抑制される知見を得ていた。

膀胱腫瘍生検標本の微小サンプルからも、形態に基づいた適切なサンプリングを行い、日本とミャンマーの膀胱腫瘍病理検体を用いて、腫瘍の組織学的 grade と BAMB I 発現、CpG メチル化を検討した。日本、ミャンマーいずれの検体も、high grade の尿路上皮癌において、BAMB I 発現が低下し、メチル化が高頻度であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

①Sann Sanda Khin, Kitazawa R, Win N, Than TA, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. BAMB I gene is epigenetically silenced in a subset of high-grade bladder cancer. Int J Cancer (in press) 査読有

②Darwanto A, Kitazawa R, Mori K, Kondo T, Kitazawa S. MeCP2 expression and promoter methylation of cyclin D1 gene are associated with cyclin D1 expression in developing rat epididymal duct. Acta Histochem Cytochem 41, 135-142, 2008. 査読有

③Takahashi Y, Iida K, Takeno R, Kitazawa R, Kitazawa S, Kitamura H, Fujioka Y, Yamada H, Kanda F, Ohta S, Nishimaki K, Fujimoto M, Kondo T, Iguchi G, Takahashi K, Kaji H, Okimura Y, Chihara K. Hepatic Failure and Enhanced Oxidative Stress in Mitochondrial Diabetes. Endocr J, 55, 509-514, 2008. 査読有

④北澤荘平, 近藤武史, 森清, 松田修一, 北澤理子. エピジェネティクスと病理. 臨床検査 52, 665-661, 2008. 査読有

⑤ Kitazawa R, Kitazawa S. Methylation status of a single CpG locus 3 bases upstream of TATA-box of RANKL gene promoter modulates cell- and tissue-specific RANKL expression and osteoclastogenesis. Mol Endocrinol 21, 148-158, 2007. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

①Kitazawa S, Sann Sanda Khin, Mori K, Kondo T, Kitazawa R. BAMB I Gene Is Epigenetically Silenced in a Subset of High-grade Bladder Cancer. ASBMR 30th Annual Meeting. 2008.9.12-16 (Montreal, Canada)

②Sann Sanda Khin, 北澤理子, Aye Than Than, Win Ne, 近藤武史, 森清, 北澤荘平. Epigenetical alteration of BAMB1 gene during bladder cancer progression. 第 97 回日本病理学会総会. 2008.5.15～17(金沢)

③藤本昌代, 北澤理子, 近藤武史, 森清, 北澤荘平. SOD-1 遺伝子異常の証明された家族性筋萎縮性側索硬化症の一例. 第 96 回日本病理学会総会. 2007.3.13～15(大阪)

④Kitazawa S, Kitazawa R, Fujimoto M, Mori K, Sann Sanda Khin, Ishii J, Kondo T. In Situ of Specific Gene Expression During and Immediately After Transcription at Electron Microscopic Level. The 16th International Microscopy Congress. 2006.9.3-8 (Sapporo)

⑤藤本昌代, 北澤荘平, 近藤武史, 森清, 北澤理子, 前田盛. 心筋障害が顕著であったミトコンドリア脳筋症の一例. 第 95 回日本病理学会総会. 2006.4.30-5.2 (東京)

⑥北澤荘平, 竹中篤, 溝口明, 近藤武史, 森清, 藤本昌代, 安松良子, Sanda Khin Sann, 前田盛, 北澤理子. パラフィン包埋試料を免疫原として作成した胚細胞特異的な単クローン抗体 5G9 が認識する抗原の解析. 第 95 回日本病理学会総会. 2006.4.30-5.2 (東京)

⑦近藤武史, 北澤理子, 藤本昌代, 森清, 前田盛, 北澤荘平. 陽子線治療を施行された腭頭部癌の一例. 第 95 回日本病理学会総会. 2006.4.30-5.2 (東京)

⑧大林千穂, 前田尚子, 鹿股直樹, 藤本昌代. 病理診断に役立つ免疫組織化学の新しいマーカー 肺腫瘍の診断への応用. 第 95 回日本病理学会総会. 2006.4.30-5.2 (東京)

[図書] (計 1 件)

① (Editor; Kobayashi TB). Kitazawa S, Mori K, Kondo T, Fujimoto M, Kitazawa R, DNA Methylation Research Trends, Epigenetic roles of CpG methylation at non-CpG-islands revealed by morphology-oriented epigenetic research pp43-pp66, Nova Science Publishers, New York, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 昌代 (FUJIMOTO MASAYO)
神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号：70403235

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

○研究協力者

北澤 荘平 (KITAZAWA SOHEI)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90186239