

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791136

研究課題名(和文) 子宮頸部腺癌過程においてエピジェネティックな遺伝子制御をうける
遺伝子の探索研究課題名(英文) Screening of epigenetic regulatory gene in carcinogenesis
of cervical adenocarcinoma

研究代表者

金谷 裕美 (KANETANI HIROMI)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70456060

研究成果の概要(和文)：

近年 DNA のメチル化が癌抑制遺伝子不活化機構に重要とされ、種々のがんで癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化による不活化が発癌に関与しているとの報告が多い。子宮頸癌では、E6/E7 蛋白質による p53、Rb 蛋白質の不活化以外にエピジェネティックな遺伝子変化の関与も示唆される。今回の検討では RASFFIA, APC, HIC-1 など既報告の遺伝子では、子宮頸部腺癌での高メチル化を確認した。しかし、マイクロアレイの結果では、新たにエピジェネティックな制御をうける癌抑制遺伝子の候補は同定できなかった

研究成果の概要(英文)：

The epigenetic gene alteration is suggest to involved in carciogenesis of cervical cancer. We confirmed high methylation of HIC -I, RASFFIA, and APC for cervical adenocarcinoma By the results of the microarray, we were not able to identify the candidate of the cancer suppressor gene which caught the epigenetic regulation.

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	0	0	0
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：子宮頸癌、エピジェネティック、メチル化

1. 研究開始当初の背景

子宮頸部癌の発癌過程において、HPV16

E6, E7 導入により、不死化細胞が得られるなど、現在では HPV 感染が異形成の原因であることは明らかとなっている。この機序として HPV の E6/E7 蛋白質による p53、Rb 蛋白質の不活性化による G1 停止の抑制が関与していると考えられているが、これだけでは癌化せず、E6/E7 蛋白質による他のターゲットの可能性や、HPV 以外の関与が示唆されている。近年 DNA のメチル化が癌抑制遺伝子不活性化機構に重要とされ、種々のがんで癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化による不活性化が癌化に関与しているとの報告が多い。またメチル化により細胞周期チェックポイント遺伝子やアポトーシス関連遺伝子の不活性化も報告されている。そのため、子宮頸癌においてもメチル化が癌化に対し関与している可能性が示唆される。

子宮頸部癌でも扁平上皮癌においては異形成の各段階での既知の CpG アイランドの DNA メチル化を検討され、CDH13, DAPK1, RARB, TWIST1 のプロモーター領域のメチル化が CIN III 以上の病変で有意に増加していると報告されている(1)。子宮頸部腺癌では扁平上皮癌に比し、RASFFIA, APC, HIC-1 のプロモーター領域のメチル化が高頻度との報告があるが、子宮頸部腺癌の前癌病変における検討はなされていない。

2. 研究の目的

子宮頸部腺癌は、扁平上皮癌とは異なる生物学的特徴を有すると考えられているため、子宮頸部腺癌にターゲットをしぼり、その発癌過程において、癌抑制遺伝子等のプロモーター領域のメチル化による不活性化がどのように発癌、進行に関与しているかを検討する。また新規癌抑制遺伝子の候補が同定された場合、診断や分子標的として重要となる可能性が示唆される。また血清中の circulating DNA からの検索では、腫瘍マーカーとしての有用性も期待できる。

3. 研究の方法

I-1 メチル化により不活性化している遺伝子の検索—1

子宮頸部腺癌培養細胞株 5 種類に脱メチル化剤 (5-aza-2'-deoxycytidine) を投与、その後 RNA を回収、3 万個の遺伝子を搭載したマイクロアレイを行い、脱メチル化剤によって発現の上昇する遺伝子を同定する。これらの候補遺伝子のうちプロモーター領域に CpG アイランドを持つ遺伝子はがん抑制遺伝子の可能性が示唆され、次のステップで検索する。

また発現の減弱している遺伝子はメチル化により発現が亢進しているため、がん遺伝子の可能性も考えられる。

I-2 メチル化により不活性化している遺伝子の検索—2

またメチル化により不活性化している遺伝子の検索目的で methylated CpG island

amplification/representational difference analysis (MCA/RDA 法)

(1)を用いて、子宮頸部腺癌において不活性化されている遺伝子を同定する。

子宮頸部腺癌培養細胞株 Hela 株を tester, 正常子宮頸管腺細胞を driver として検索を行う。相違を認めた遺伝子をしぼりこむ。

(1) Toyota M, Ho C, Ahuja N et al.

Identification of differentially methylated

sequences in colorectal by methylated CpG island amplification. Cancer Res 1999; 59: 2307-2312.

I-3 I-1,2 でしぼりこんだ候補遺伝子をターゲットに、子宮頸部腺癌培養細胞株より抽出した DNA を bisulfite 処理をし、プロモーター領域のメチル化状態を解析する。

I-4 正常子宮頸管腺、腺異形成、上皮内腺癌、進行子宮頸部腺癌の組織より DNA を抽出する。いずれも凍結切片もしくはパラフィン包埋切片から microdissection 法にてサンプリングを行う。I-3 と同様、抽出した DNA を bisulfite 処理をしプロモーター領域の

メチル化状態を解析する。各段階でのメチル化の頻度を検討、メチル化により不活性化している癌抑制遺伝子の候補を同定する。

I-5 子宮頸部腺癌発癌過程におけるメチル化と HPV 型の相関の検索

各腺系病変に関しては HPV の typing も併せて検索する。HPV 型は consensus primer-mediated L1 PCR での PCR-RFLP 法をもちいる。この PCR では子宮頸部癌に関連する HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、70 の他 6、11、30、34、42、43、44、53、54、55、61、66、67、82 など性器に感染する 30 型以上の HPV DNA が検出、型の決定できる。

HPV 型別のメチル化の頻度、発癌のリスク等の相関を検討する。

I-6 circulating DNA におけるメチル化の検索

子宮頸部腺癌患者の治療前に採取した血清より遊離 DNA を採取する。この遊離の DNA を用いて、メチル化の検索を行う。正常との比較、進行期、予後等との関連を検索、臨床的に有用なマーカーになりうるかを検討する。

4. 研究成果

子宮頸部癌培養細胞株 HeLa, TCO-1, TCO-2, OMC-4, CAC-1, NUZ-1 より DNA を抽出後 bisulfite 処理をし RASFFIA, APC, HIC-1 プロモーター領域のメチル化状態を解析した。培養細胞株では RASFFIA 3/6 (50%), APC 2/6 (33%), HIC-1 2/6 (33%)にメチル化を認めた。

子宮頸部腺癌 10 例から microdissection 法にてサンプリングを行い、抽出した DNA を bisulfite 処理をしプロモーター領域のメチル化状態を解析した。RASFFIA, APC, HIC-1 プロモーター領域のメチル化状態はそれぞれ、40%, 30%, 30%と既報告に比較し頻度は少なかった。

子宮頸部腺癌培養細胞株 HeLa に脱メチル化剤 (5-aza-2'-deoxycytidine) を投与、RPMI1640 下で培養、その後 RNA を回収、3 万個の遺伝子を搭載したマイクロアレイを行ったが、新たな癌抑制遺伝子の候補はしぼりこめなかった。研究期間内には明らかにできなかったが、他の細胞株との比較を行い、候補遺伝子の絞り込みが可能か検討する必要がある。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金谷 裕美 (KANETANI HIROMI)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 70456060

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：