

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009 年度

課題番号：20791148

研究課題名 (和文) 子宮体癌における対立遺伝子間発現量の相違

研究課題名 (英文) Allelic expression difference of endometrial cancer

研究代表者

谷口 秀一 (SHUICHI TANIGUCHI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70452711

研究成果の概要 (和文)：

子宮体癌や乳癌などのホルモン依存性癌において、p14ARF/MDM2/p53/p21 シグナロソームを構成する遺伝子のゲノム多様性が癌発生にいかに関与するかを解明することを目的とし、子宮体癌患者とコントロールで解析した。*MDM2* SNP309T/G、*p53* codon72 Arg/Pro、*ER* Pvu2 T/C・Xba1 A/G、*p21* codon31 Ser/Arg に存在する遺伝子多型の解析を行い、その結果、子宮体癌患者の *MDM2* SNP309G/G 型の T/T 型に対するオッズ比は統計学的に有意差を認めなかったが、*MDM2* SNP309 と *p53* codon72 の組み合わせは、子宮体癌オッズ比の高まりを示した。

研究成果の概要 (英文)：

In the hormone dependent cancers such as endometrial cancers and breast cancers, it aimed to clarify how the genomic diversification of the gene that composed p14ARF/MDM2/p53/p21 signalosome took part in the development of carcinoma. We analyzed each sample of the controls and the endometrial cancer patients. We analyzed the gene polymorphisms that existed in *MDM2* SNP309T/G, *p53* codon72 Arg/Pro, *ER* Pvu2 T/C・Xba1 A/G, and *p21* codon31 Ser/Arg. The odds ratio to the *MDM2* SNP309 T/T type to G/G type in cancer patients did not admit a significant difference in statistics. The combination of *MDM2* SNP309 and *p53* codon72 showed the rise of the endometrial cancer odds ratio.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ゲノム、子宮体癌、対立遺伝子間発現量

1. 研究開始当初の背景

| 正常細胞は老化プログラムから逸脱し、不

死化能を獲得し癌化する。癌細胞が不死化能を獲得する過程には複数のシグナルソームの破綻が関与する。私たちはこれまで活性型 Ras 蛋白による細胞形質転換機構について研究してきた。その結果、活性型 Ras 蛋白はエストロゲンレセプター (ER) の転写因子としての機能を亢進し、ets/fos を介して MDM2 蛋白発現を増加させ、p53 蛋白の不安定化の原因となることで癌化に関与することが判明した。また Ras 蛋白による AF1 リン酸化が ER の活性化を導くことが明らかにされた。一方様々な手段により ER の機能を阻害すると MDM2 蛋白の減少、p53 蛋白の安定化を介して下流の p21CDK インヒビター発現誘導によりトランスフォーム細胞の老化が誘導された。このため p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナルソームを再構築し、癌細胞老化を誘導するゲノム創薬の有効性が示唆されている。

癌細胞におけるシグナルソームの破綻には従来明らかとされてきた体細胞変異のみではなく、ゲノム多様性 (DNA 多型) も大きく関与すると考えられる。最近では各遺伝子プロモータ領域に存在する一塩基多型の組み合わせ (SNP ハプロタイプ) さらには微小欠失により、対立遺伝子間での発現量に顕著な相違 (Allelic Expression Difference; AED) がもたらされることも判明している。癌細胞で認められる体細胞変異の多くは AED を示す遺伝子群に集中することも示唆されている。これらの結果は正常細胞においてゲノム多様性により AED が導かれ、特定の細胞種において細胞老化プログラムの破綻の原因となることを意味する。細胞老化回避の後、ゲノム多様性に替わる体細胞変異が出現し、老化シグナルの完全な破綻により不死化細胞の選択的増殖を導くと考えられる。

子宮体癌や乳癌などのホルモン依存性癌において、p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナルソームを構成する遺伝子の変異は高率ではない。本研究では、各遺伝子のゲノム多様性が癌発生にいかに関与するかを解明することを目的とする。

2. 研究の目的

上述の p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナルソームを構成する遺伝子領域内には多数の SNP が存在する。私たちはこれまで疾患或いは薬剤感受性に影響を及ぼす日本人に特有な SNP ハプロタイプを同定する目的のため、200 例を超える 1 精子受精・雄核発生全奇胎 DNA ライブラリーを構築した。全奇胎は対立遺伝子間でのホモ接合の形成を遺伝的特徴とするため、日本人における各遺伝子 SNP ハプロタイプの決定が容易に行いうる。本研究では、

) 子宮体癌患者血液或いは内膜組織から RNA を抽出し、非翻訳領域中の多型を応用した PCR 法により対立遺伝子特異的発現量を解析し、p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナルソーム各遺伝子の AED 頻度を明らかにする。

) AED(+) 個体における各遺伝子プロモータ中の塩基配列を決定し、AED の原因となる SNP ハプロタイプや微小欠失を明らかにする。

) 全奇胎 DNA ライブラリーを用いて日本人における AED の原因となる SNP ハプロタイプ、微小欠失の頻度を明らかにする。

) 子宮体癌患者 DNA を用い、AED の原因となる SNP ハプロタイプ及び微小欠失の頻度を求め、正常コントロールと比較することにより、AED の原因となる SNP ハプロタイプや微小欠失の子宮体癌発症リスクを明らかにする。

) 子宮体癌組織 DNA を用いて p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナルソーム各遺伝子の遺伝子変異を検索し、変異が AED(+) 対立遺伝子に集中することを明らかにする。

本研究により日本人における子宮体癌発症リスクの予測を可能にし、日本人のゲノム多様性を基盤とした癌の診断及び治療法の開発に連動する。

本研究期間内に p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナルソームの機能的破綻にゲノム多様性が関与することを明らかにし、ゲノム多様性に基づく AED が癌化に伴い出現する体細胞変異を誘導し、癌細胞における不死化能獲得に至る過程を解明することを目的とする。

正常細胞における老化誘導の分子機構には不明の点が多い。私たちは p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナルソームの破綻と不死化能獲得との関連について解析をした。p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナルソームを構成する各遺伝子の体細胞変異の出現は子宮体癌或いは卵巣癌などのホルモン依存性腫瘍において低率である。本研究では様々な遺伝子においてその存在が示唆されている AED に注目し、各遺伝子プロモータ領域中のいかなる SNP ハプロタイプ或いは微小欠失が AED の原因となり、正常細胞での老化回避或いは不死化能獲得に関与するか否かを明らかにする。さらに癌組織を用いた解析により AED(+) 遺伝子に体細胞変異が好発するか否かを解析し、ゲノム多様性が癌化に伴う体細胞変異を誘導することも明らかにする。

私たちはこれまで疾患感受性或いは薬剤感受性の形成に関与する日本人に特有な SNP ハプロタイプを同定するため 200 例を超える 1 精子受精・雄核発生全奇胎 DNA ラ

ライブラリーを構築した。AED を示す遺伝子群について本 DNA ライブラリーを用い、SNP ハプロタイプを同定し、日本人一般集団に特有な種類及び頻度を決定することが可能である。本ライブラリーを用いることにより、連鎖不均衡等の現象を利用して SNP ハプロタイプを求める方法論に比較して、ハプロタイプ決定を容易にすることが出来る。本ライブラリーは私たちのみが保有しており、日本人に特有なゲノム情報の確立は本研究により初めて可能となる。

3. 研究の方法

細胞老化誘導シグナロソーム破綻へのゲノム多様性の関与

i) AED (Allelic Expression Difference): 私たちが正常細胞老化との関連を指摘した p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナロソームを構成する各遺伝子群について AED が存在するか否かについてまず解析する。50 例の子宮体癌患者血液を採取し、RNA を抽出する。5'-及び 3'-非翻訳領域に存在する様々な DNA 多型を用い、それぞれの対立遺伝子に由来する RNA を定量的に増幅することが可能なプライマーを作成する。本プライマーを用い、上述の遺伝子群 RNA を DNA に置換後、リアルタイム PCR による定量的 PCR を実施する。通常対立遺伝子に由来する RNA 量は 1:1 であるため、対立遺伝子別転写量が 50% から大きく偏移する遺伝子群を同定する。これにより AED を示す遺伝子群の同定及び子宮体癌患者における AED 出現頻度を求める。子宮体癌細胞では正常内膜細胞と比較し、細胞老化関連シグナロソームを構成する各々の遺伝子群の発現、機能に変化が認められる。これらの変化により子宮内膜細胞は不死化能を獲得する。このため上述の癌患者血液、正常子宮内膜組織あるいは子宮体癌組織において AED による遺伝子発現変化が癌化にいかに関与するのかを解析する。本解析のために上述の子宮体癌患者血液 50 検体、同一症例の子宮内膜非癌部組織 50 例、子宮体癌組織 50 例を対象とする。子宮内膜非癌部組織および体癌組織についてはマイクロダイセクション法による各組織の純化を行う。それぞれの組織から DNA、RNA、蛋白を抽出する。それぞれの組織 RNA を用いて対立遺伝子特異的プライマーを用いた定量的 PCR を実施する。これにより子宮体癌患者血液 DNA で認められた AED が子宮内膜組織でも同様に観察されることを確認する。さらに癌組織から RNA を抽出し、対立遺伝子特異的プライマーを用いた定量的 PCR を行い、その発現量を患者血液及び非癌部子宮内膜組織と比較する。AED に伴う遺伝子発現変化が癌

化過程でさらなる変化を受け、発現量に偏移を来すのか、あるいは癌組織でも正常細胞で認められた AED を継承しているのかを明らかにする。さらに血液及び子宮内膜で AED(-)であった症例の子宮体癌組織から得た RNA を用い、対立遺伝子特異的プライマーを用いた定量的 PCR を実施し、癌化過程における AED 出現の有無を解析する。AED の存在が全体の RNA 及び蛋白発現量に与える影響を解析するため、抽出された RNA 及び蛋白を用いて定量的 PCR 及びウエスタンブロットを実施する。まず血液及び非癌部子宮内膜組織から得た PCR データ及び蛋白発現量を同一遺伝子について AED(+)及び AED(-)群間で比較し、AED の存在がそれぞれの全発現量に与える効果について解析する。癌組織を AED(+)及び AED(-)群に分別し、それぞれの全 RNA、蛋白発現量を解析する。これらの研究を通して AED が全発現量に与える影響さらには AED を原因とした発現変化が癌化に及ぼす影響について解析する。さらに子宮体癌患者血液 50 例及び子宮体癌組織 50 例から得た DNA を用いて、細胞老化関連シグナロソームを構成するそれぞれの遺伝子翻訳領域を増幅する。同領域内の全塩基配列の決定をシーケンス法により、ゲノム構造の変化を PCR-サザンブロット法にて解析する。血液 DNA サンプルから得た情報と比較することにより DNA 多型であることを否定し、これら遺伝子上に発生する体細胞変異を同定する。同時に癌組織 DNA を用いて、各遺伝子プロモータ領域をターゲットとしたバイサルファイト法による DNA メチル化の解析を行う。癌で出現する体細胞変異あるいは DNA メチル化と各遺伝子における AED との関連を明らかにすることにより AED(+)対立遺伝子での体細胞変異の集積さらには DNA メチル化について解析する。これにより正常細胞において存在する AED が不死化能獲得、癌化過程で出現する体細胞変異さらには DNA メチル化の原因となることを明らかにする。

ii) SNP ハプロタイプ: 1 精子受精・雄核発生全奇胎 DNA200 例を用いて、各遺伝子プロモータ領域中に存在する SNP を収集し、日本人正常集団における各遺伝子プロモータ領域中 SNP ハプロタイプの種類及び頻度を明らかにする。また連鎖不均衡を応用し、各ハプロタイプを代表する SNP、すなわち tag SNP を決定する。患者集団と比較し、有意に高頻度(体癌感受性(+))あるいは低頻度(体癌感受性(-))の SNP ハプロタイプを各遺伝子について同定する。

iii) AED と SNP ハプロタイプの相関; i)に

において AED(+)であった遺伝子群を抽出し、AEDの原因となりうる SNP ハプロタイプあるいは微小欠失との関連について解析する。50例の子宮体癌患者 RNA を用いた解析により有意な集団で AED を示した遺伝子プロモータ領域中の SNP ハプロタイプが体癌感受性(+)SNP ハプロタイプに含まれることを確認する。これにより日本人において特定の SNP ハプロタイプ或いは微小欠失の出現が特定の遺伝子群の発現制御に関与し、その後の体細胞変異の集積を介して不死化能獲得にさらには癌化に関与することを証明する。

iv)既存の癌細胞株について、各遺伝子プロモータ領域の塩基配列を決定し、子宮体癌感受性(+)或いは(-)SNP ハプロタイプを有する細胞株を複数同定する。これらの細胞株において p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナロソームを構成する遺伝子群に体細胞変異が存在しないことを確認する。さらに RNA を抽出し、子宮体癌感受性(+)或いは(-)SNP ハプロタイプ間で細胞老化に関与する遺伝子の発現に差異が存在するか否か、リアルタイム PCR を用いた定量的転写量測定により解析する。

4. 研究成果

子宮体癌や乳癌などのホルモン依存性癌において、p14^{ARF}/MDM2/p53/p21 シグナロソームを構成する遺伝子のゲノム多様性が癌発生にいかに関与するかを解明することを目的とし、同意を得た子宮体癌患者 116 例とコントロール 200 例で解析した。今回はまず PCR-RFLP 法および Direct sequence 法による MDM2 SNP309T/G、p53 codon72 Arg/Pro、ER Pvu2 T/C・Xba1 A/G、p21 codon31 Ser/Arg に存在する遺伝子多型の解析を行い、その結果を多重ロジスティック回帰分析を用いて子宮体癌との関連性をオッズ比 OR、95%信頼区間 CI により検討した。その結果、子宮体癌患者の MDM2 SNP309G/G 型の T/T 型に対するオッズ比は統計学的に有意差を認めなかった (OR 1.71、95%CI 0.82 - 3.47)。また、ER、p53、p21 の多型単独では子宮体癌との関連は見られなかったが、MDM2 SNP309 と p53 codon72 の組み合わせは、子宮体癌オッズ比の高まりを示した (T/T : Arg/Pro Pro/Pro OR 2.07、95%CI 0.76 - 5.66、T/G G/G : Arg/Arg OR 2.76、95%CI 1.08 - 7.05)。以上より MDM2 SNP309 と p53 codon72 Arg/Pro の多型間には統計学的に有意な遺伝子間の相互作用を認めた (interaction p=0.026)。

また SP1 阻害剤である Mithramycin の p53 転写活性への影響を検討した。SNP309 T/T の Hec6 では、Mithramycin の添加で SP-1 の MDM2 プロモーターへの結合が阻害され低下し p53 活性は亢進しているが、SP1 の結合力が高い

SNP309G アリルをもつ HHUA では MDM2 の発現抑制が弱いため、結果的に p53 活性の上昇は起こらないことが示唆された。

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1件)

Kenzo Sonoda, Shuichi Taniguchi et al.
The level of RCAS1 expression is inversely correlated with the number of vimentin positive stromal cells in epithelial ovarian cancer
International Journal of Gynecological Cancer, 2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷口 秀一 (SHUICHI TANIGUCHI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70452711