

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791847

研究課題名（和文）対立遺伝子間遺伝子発現相違に起因する
子宮体癌発症メカニズムの解明研究課題名（英文）The allelic expression difference of human *MDM2* gene
in endometrial cancer.

研究代表者

恒松 良祐 (TSUNEMATSU RYOSUKE)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20380529

研究成果の概要（和文）：

細胞老化誘導シグナルソーム破綻への Allelic Expression difference (AED) の関与を明らかにするために、MDM2 遺伝子の 3'非翻訳末端の SNP (rs1690916、A/G) をマーカー-SNP として子宮体癌患者および対照群各 45 例より採取した組織（子宮体癌組織および正常子宮内膜組織）よりゲノム DNA および mRNA を抽出し、上記 SNP を含む領域を RT-PCR-SSCP 法を用いて解析した。正常子宮内膜組織ではゲノム DNA および mRNA 上のマーカー-SNP の存在比はいずれも 1:1 であり、AED が存在しなかったが、子宮体癌患者由来の 20 例中 2 例において、mRNA 上のマーカー-SNP の存在比が大きく異なることが明らかとなり、これらにおいては AED が存在することが示唆された。MDM 遺伝子には P1、P2 という 2 つのプロモーターが存在するが、P1 プロモーター由来の転写産物の AED を同様に PCR-SSCP 法で解析したところ、P1 プロモーターからの遺伝子発現には AED が存在せず、MDM 遺伝子の AED は P2 プロモーターに由来すると考えられた。P2 プロモーターでは転写因子 Sp1 の結合配列上にあり、Sp1 の親和性に影響を与える SNP309 がよく知られているが、われわれはこれとは別に P2 プロモーター上のさらに 5'側に新規の SNP (T/C) を同定した。この SNP により本来 Sp1 結合配列である領域上に NF-κB 結合配列が出現することを見だし、NF-κB の p50 サブユニットが同部位に結合することにより、MDM2 の転写を抑制することを明らかにした。さらに上述した AED を示す子宮体癌組織を用いた免疫染色で p50 が核内に異常蓄積していること、また Biacore を用いた実験より Sp1 と NF-κB が上記結合配列に競合的に結合していることから、MDM2 の転写における NF-κB シグナルによる抑制的制御機構の存在が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

- #1. To search the AEDs of human *MDM2* gene, we analyzed 45 samples from the endometrial cancer patients and the healthy controls by PCR-SSCP-based method. Out of 20 endometrial cancer patients, we identified two cases presenting AED. (fig.1)
- #2. We confirmed that these AED derived from P2 promotor of *MDM2* gene. And we found new SNP (T/C) on the 5'-upstream of the SNP309 in the *MDM2* P2 promotor. We found that this SNP created an NF-κB consensus sequence in the Sp1 binding sequence.
- #3. Using the Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) and the luciferase reported assays, we confirmed that the NF-κB consensus sequence formed by the newly-discovered SNP(C-allele) bound to NF-κB, but not T-allele, and that NF-κB can suppress the transcription of *MDM2* gene.
- #4. Immunohistochemistry analysis showed that NF-κB p50 protein accumulated in the nuclei of the AED-positive endometrial cancer tissue.
- #5. The Biacore analysis revealed that p50 preferred C-allele to T-allele, conversely, Sp1 T-allele to C-allele. We also found that they bound to the same DNA region in a competitive manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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：AED、子宮体癌、MDM2、PCR-SSCP

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ロ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 α) 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 α 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 α 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 p14ARF/MDM2/p53/p21 シグナロソームを再構築し、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ロ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ー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。

2. 研究の目的

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変異は高率ではないが、遺伝子領域内には多数の SNP が存

在する。本研究では、

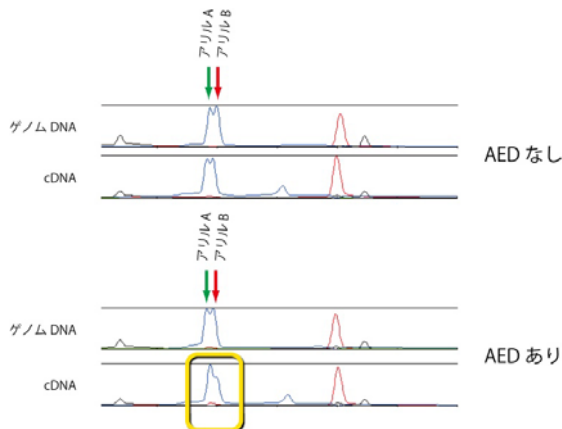
- ① 正常子宮内膜から RNA を抽出し、mRNA 上に存在する SNP をマーカーとして PCR-SSCP 法によりゲノム DNA 量に対する対立遺伝子特異的発現量の差 (AED) を解析し、MDM2/p53/p21 シグナロソーム各遺伝子の AED 頻度を明らかにする。
- ② AED(+) 個体における各遺伝子プロモーター中の塩基配列を決定し、AED の原因となる SNP ハプロタイプや微小欠失を明らかにする。
- ③ 子宮体癌患者 DNA を用い、AED の原因となる SNP ハプロタイプ及び微小欠失の頻度を求め、正常コントロールと比較することにより、AED の原因となる SNP ハ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。
- ④ 正常子宮内膜組織及び子宮体癌組織中での p14ARF/MDM2/p53/p21 シグナロソーム構成因子の発現量についてリアルタイム RT-PCR 法、ウエスタンブロット法を用いて検討し、p14ARF/MDM2/p53/p21 シグナロソームの破綻と子宮体癌発症のメカニズムの関係を分子論的に証明する。

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、これにより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つながる。また本研究期間内に p14ARF/MDM2/p53/p21 シグナロ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。

3. 研究の方法

- ① PCR-SSCP 法による AED の解析
遺伝子多型を含む DNA 断片は、SSCP (single strand conformation polymorphism) 法を用いた解析によりそれぞれ一本鎖 DNA の状態における泳動度の違いによって分離することが可能である。下図に示すように、ゲノム DNA での存在比率が 1:1 である場合、一本鎖

DNA それぞれのピークが移動度が異なる同じ高さで検出される。cDNA でも同様なパターンで検出される場合は AED なしと判定できる。一方 cDNA でピークの高さが異なる場合は AED ありと判定できる。この方法を用いて、45 例の患者血液及び正常子宮内膜より抽出したゲノム DNA 及び RNA を用いて MDM2 遺伝子上のマーカ SNP を含んだ断片を RT-PCR により増幅し、PCR-SSCP 法により AED の有無及び頻度について解析を行った。



② AED の原因となる SNP ハプロタイプの同定

MDM2 プロモーター領域に存在する SNP をデータベース上で検索し、その領域を中心に患者より採取した正常子宮内膜検体のゲノム DNA シークエンスを行い、SNP 出現頻度及び微小欠失、SNP ハプロタイプについて検討した。SNP における塩基の違いによって生じうる、あるいは消失しうる転写因子結合領域をデータベース上で検索した。

③ MDM2 遺伝子における、新規 SNP による AED 発現メカニズムの解析

当該遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子によって誘導される、SNP 及び SNP ハプロタイプの違いによる遺伝子発現量の差異についてレポーターアッセイ及びリアルタイム PCR により検討した。さらに②で見いだした SNP の違いによりあらに形成される転写因子結合配列に結合するタンパクの *in vivo* における局在を明らかにするために AED (+) の子宮体癌患者サンプルを用いて免疫染色を行い、その局在を調べた。

4. 研究成果

① PCR-SSCP 法による AED の解析

細胞老化誘導シグナルソーム破綻への Allelic Expression difference (AED) の関与を明らかにするために、MDM2 遺伝子の 3'非翻訳末端の SNP (rs1690916、A/G) をマーカ SNP として子宮体癌患

者および対照群各 45 例 (マーカ SNP がヘテロであったのはそれぞれ 20 例、23 例) より採取した組織 (子宮体癌組織および正常子宮内膜組織) よりゲノム DNA および mRNA を抽出し、上記 SNP を含む領域を PCR 法および RT-PCR 法により増幅し SSCP 法を用いて解析した。正常子宮内膜組織ではゲノム DNA および mRNA 上のマーカ SNP の存在比はいずれも 1:1 であり、AED が存在しないことが明らかとなった。一方で子宮体癌患者由来の 20 例中 2 例において、ゲノム DNA でのマーカ SNP の存在比が 1:1 であるにもかかわらず、mRNA 上のマーカ SNP の存在比が大きく異なることが明らかとなり、これらにおいては AED が存在することが示唆された。(図 1)

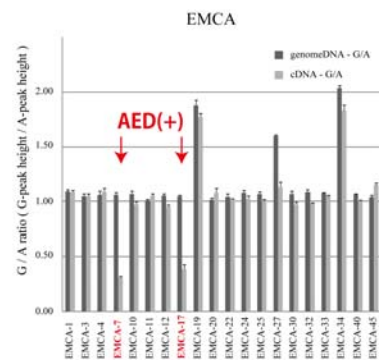


図 1 PCR-SSCP 法による MDM2 遺伝子の AED の解析
子宮体癌サンプル 2 例 (EMCA-7, EMCA-17) において AED が認められた

② AED の原因となる SNP の同定

MDM 遺伝子には P1、P2 という 2 つのプロモーターが存在し、上記マーカ SNP の mRNA 上の存在比は両プロモーターからの遺伝子発現の総和の違いをみていることになる。そこで P1 プロモーター由来の転写産物の AED を同様に PCR-SSCP 法で解析したところ、P1 プロモーターからの遺伝子発現には AED が存在しないことが明らかとなった。以上のことから MDM 遺伝子の AED は P2 プロモーターに由来すると考えられた。P2 プロモーターでは転写因子 Sp1 の結合配列上にあり、Sp1 の親和性に影響を与える SNP309 がよく知られているが、われわれはこれとは別に P2 プロモーター上のさらに 5'側に新規の SNP (T/C) を同定した。この SNP により本来 Sp1 結合配列である領域上に NF-κB 結合配列が出現することを見いだした。(図 2)

③ MDM2 遺伝子における、新規 SNP による AED 発現メカニズムの解析

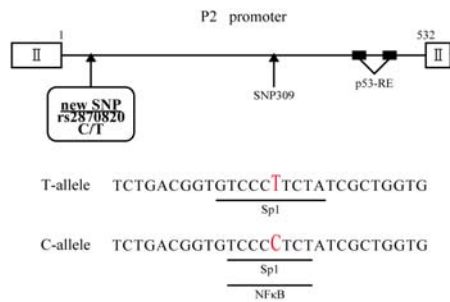


図2 AEDの原因となる可能性のある新規 SNP の同定

MDM2 P2 プロモーター上の Sp1 結合配列上に新規 SNP を見だし、T が C に変わることにより NF-κB 結合配列が出現することが明らかとなった。

このようにして同定された新規 SNP に NF-κB が結合することを検証するためにクロマチン免疫沈降法による検証を行った。C/C アリルを有する Ishikawa 細胞と T/T アリルを有する Hec6 細胞より核抽出液を調整し検討したところ、C/C アリルを有する Ishikawa 細胞でのみ図 2 に示す結合配列に NF-κB が結合することが明らかとなり、この新規 SNP によって形成される NF-κB 結合配列は細胞内において機能しうることが示された。(図 3) またレポーターアッセイにより C を有するアリルに NF-κB が結合することにより、MDM2 の転写が抑制されることを見いだした。

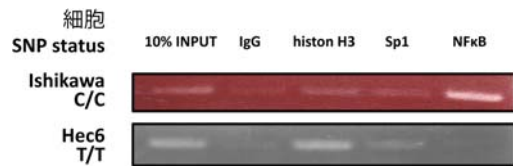


図3 ChIP アッセイによる NF-κB の結合実験

NF-κB の結合配列が生じる Ishikawa 細胞では NF-κB が結合することが明らかとなった。

NF-κB は標的遺伝子のプロモーター上の結合配列に結合することにより転写を促進する機能が一般的であるが、近年標的遺伝子の転写抑制因子として機能する例も報告されている。また NF-κB には p65 サブユニットと p50 サブユニットが存在し、古典的経路においてはこれらのヘテロダイマーが転写因子として機能することが知られている。一方で転写抑制因子として機能する場合には p50 サブユニットのホモダイマーとして存在することが報告されている。そこで次に AED の存在した子宮体癌症例の組織を用いて、NF-κB に対する免疫染色による局在を検討したところ、AED (+) の症例では p50 が核内に異常蓄積しており、一方

AED (-) の症例ではこのような核内異常蓄積はみられなかった。また p65 はいずれの場合も細胞質に局在していた。(図 4)

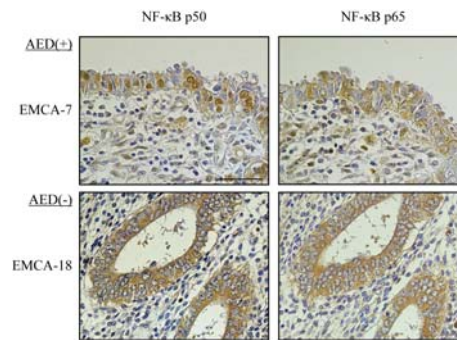


図4 NF-κB の細胞内局在に関する検討 (免疫染色)

C アリルを有する臨床検体を用いて NF-κB に対する免疫染色を行った。AED(+) の症例では p50 が核内に異常蓄積しているが、AED のみられない症例では p50 の核内蓄積はみられない

次に新規 SNP により生じる NF-κB 結合配列に p50 のみで結合可能かどうかを評価するために Biacore を用いたアッセイを行った。センサーチップ SA 上に 22bp の結合配列を固定化し、この 2 本鎖 DNA に対するリコンビナントタンパクの結合を検討したところ、Sp1 の T アリルに対する親和性は C アリルと比較して約 1.4 倍高いこと、一方で p50 の C アリルに対する親和性は T アリルと比較して約 2 倍高いことが明らかとなった。また Sp1 を 5 分間結合させた後に p50 を加えた実験では、p50 の DNA への結合が抑えられていることから、p50 と Sp1 は DNA 上の同じ配列に競合して結合していることが明らかとなり、p50 によって AED が出現する仕組みの一端が明らかとなった。

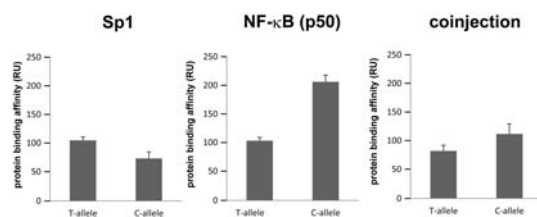


図5 P2 プロモーター上の新規 SNP を含む DNA に対する p50 及び Sp1 の結合親和性

センサーチップ SA 上に新規 SNP を含む Sp1/NF-κB 結合配列の 2 本鎖 DNA(22bp) を 2000RU 固定化し、この DNA に対する p50 及び Sp1 の結合を Biacore を用いて検討した。Sp1 は T アリルに対する親和性が C アリルと比較して約 1.4 倍高く、一方 p50 は C アリルに対する親和性が T アリルと比較して約 2 倍高いことがわかる。また最初の 5 分間 Sp1 を結合させた後に p50 を加えた場合には p50 の DNA への結合が抑えられることから、両者は同一の配列に競合して結合していることがわかる。

p50 を中心とする非古典的 NF-κB 経路についてはその上流のシグナル伝達機構などまだ不明な点が多い。しかし下流の遺伝子として新たに MDM2 が存在することをわれわれは示した。この SNP による AED の発がんメカニズムへの関与については今後さらなる検討が必要である。

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)

なし (現在執筆中)

[学会発表] (計 0 件)
なし

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恒松 良祐 (TSUNEMATSU RYOSUKE)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20380529