

氏名 Gunduz Esra

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 甲 第 2 9 6 7 号

学位授与の日付 平成 1 7 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 Genetic and epigenetic alterations of BRG1 promote oral cancer development (口腔扁平上皮癌における癌抑制遺伝子候補BRG1の分子生物学的研究)

論文審査委員 教授 佐々木 朗 教授 滝川 正春 教授 永井 教之

学位論文内容の要旨

【目的】

2つの主要な癌関連遺伝子である癌遺伝子 (Oncogene)と癌抑制遺伝子 (Tumor Suppressor Gene) は、発癌のプロセスに関与していると考えられている。癌抑制遺伝子とは、その欠損あるいは変異による不活性化が細胞に腫瘍性増殖の形質を獲得させる遺伝子と定義される。ヒト癌の進展におけるこうした遺伝子の役割を明らかにすることは、将来における癌の新しい遺伝子治療にもつながると考えられる。そこで近年新しい癌抑制遺伝子候補として注目されているBRG1 が口腔癌における癌抑制遺伝子候補であるかどうかを分子生物学的方法を使って解析した。

【材料および方法】

検索組織

岡山大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て、医学部腫瘍バンクに保存されている症例のうち、扁平上皮癌と診断された口腔領域の39症例を用いた。

ヘテロ接合性の消失の解析 (Loss of heterozygosity-LOH)

腫瘍組織および正常組織から、Phenol-chloroform 法によって抽出した DNA を鋳型とし、microsatellite marker (centromer から 19S1034, 19S586, BRG1MS1, 19S584, 19S221, 19S906) に特異的な primer を用いて、PCR 法により遺伝子増幅を行った。その後、PCR 産物は 8% polyacrylamide gel にて電気泳動を行い、銀染色法にて DNA を検出、LOH 解析を行った。

mRNA 発現の検出 (RT-PCR)

検索組織より RNeasy kit (QIAGEN)を用いて TotalRNA を抽出・精製し、逆転写酵素による反応を行い cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型とし、BRG1 に特異的な primers、RTS1 および RTAS1 を用いて遺伝子の増幅を行った。その後、PCR 産物は 2% Agarose gel にて電気泳動、ethidium bromide 染色を行い、バンド定量用コンピュータプログラム (Quantity1: Toyobo) を用いて定量した。

遺伝子変異解析 (Mutation analysis)

遺伝子変異解析は、最初にRNAレベルでBRG1遺伝子のcDNA全長を6箇所分割し、一部重なっているprimersを用いて増幅した。またはDNAレベルで35個の各エクソンprimersを用いてPCRで増幅した。PCR産物はBigDye Sequencing kit (Applied Bio.)を用いてのプロトコルに従い、ABI 377 Prism fluorescence-based DNA sequencerによって塩基配列を解析した。

[結果と考察]

はじめに、口腔癌39症例の正常組織と腫瘍組織から抽出されたDNA-RNAについてLOH解析を行った。染色体19p13にマッピングされている6個のマイクロサテライトマーカーを使って解析した結果、19S584で高頻度に(45%)アレル欠損を認めた。そのため、次にBRG1部位に非常に近い特異的マーカー(BRG1MS)を用いて検索した結果、口腔癌ではBRG1遺伝子のLOHが最も高頻度(57%)になっていることを明らかにした。すなわち、LOH解析により、BRG1遺伝子部位が口腔癌においてターゲットになっていることを証明した。

次に癌抑制遺伝子不活性化のメカニズムについて検討した。まずBRG1遺伝子のmRNAの発現をRT-PCR法を用いて検索した。腫瘍組織では正常組織と比較し、BRG1遺伝子発現は62%の症例で上昇し、26%の症例では低下、12%の症例では同程度であった。一般的に癌抑制遺伝子は腫瘍組織においてはmRNAの発現が低下している場合が多く認められる。この場合蛋白量が低いいため癌抑制機能が低下していると考えられる。今回の結果ではBRG1遺伝子は多くの症例で発現が高く認められた。これらの結果は①BRG1の関連遺伝子に異常の可能性、②癌化のとき関連遺伝子が消失した可能性、③遺伝子の突然変異(ミューテーション)の可能性が考えられる。

ミューテーションは癌抑制遺伝子の重要な不活性化メカニズムの原因として知られている。遺伝子のミューテーションにより異常な蛋白が産生され、癌抑制遺伝子が機能していないことが考えられる。そこでBRG1にミューテーションが存在するかどうか検討した。私は、BRG1遺伝子が非常に大きい遺伝子であるため、まずmRNAを900bp程度の6箇所に分割し、RT-PCRを行った後、ダイレクトシーケンスにより遺伝子変異の検索を行った。RNAレベルではミューテーションは認められず、ゲノムレベルで35個のエクソンの解析でも遺伝子変異は認められなかったが、塩基配列のpolymorphismが認められた。

しかし今回ミューテーションをRNAレベルでの検索した際にexon26を含むsplicing variantが腫瘍特異的に欠損していることを明らかにした。すなわちExon26を含むmRNA variantの発現は正常と比較すると腫瘍症例の91%で著明に減少した。Exon26のアミノ酸配列を蛋白blastでhomology searchをした結果、hnRNP-E2遺伝子のmRNA splicing variantの一つと65%のhomologyを示した。hnRNP-E2のこのvariantは、蛋白の核内保持シグナル(Nuclear retention signal)の機能を持っているという報告がある。従ってBRG1蛋白のexon26をコーディングするドメインも、hnRNP-E2蛋白のhomologyがあったドメインの機能と同じ様に働いている可能性がある。すなわち、BRG1のこのドメインは正常細胞ではBRG1蛋白を核内に保持するように働いていることが考えられる。今回私の結果からは、BRG1のexon26を含むsplicing variantが欠損したため、BRG1蛋白が核から細胞質に移行し、BRG1による細胞増殖抑制機能が働かなくなり、細胞の癌化のプロセスが始まるのではないかと考えられる。

[結論]

口腔扁平上皮癌において19p13の範囲のLOH検索を行った結果、BRG1の部位で高頻度のLOHが認められ、BRG1 mRNAの発現量も上昇傾向が認められた。今回の結果、ミューテーションは認められないもののBRG1のexon26を含むmRNA variantが腫瘍特異的に欠損していることを認めた。このことから、口腔扁平上皮癌の癌化のメカニズムにはBRG1遺伝子が関与していると考えられ、BRG1は口腔扁平上皮癌の癌抑制遺伝子候補である可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

2つの主要な癌関連遺伝子である癌遺伝子 (Oncogene)と癌抑制遺伝子 (Tumor Suppressor Gene) は、発癌のプロセスに関与していると考えられている。癌抑制遺伝子とは、その欠損あるいは変異による不活性化が細胞に腫瘍性増殖の形質を獲得させる遺伝子と定義される。ヒト癌の進展におけるこうした遺伝子の役割を明らかにすることは、将来における癌の新しい遺伝子治療にもつながると考えられる。そこで近年新しい癌抑制遺伝子候補の存在部位として注目されている 19p13 を検索し、口腔癌における癌抑制遺伝子候補であるかどうかを分子生物学的方法を使って解析したものである。

はじめに、口腔癌39症例の正常組織と腫瘍組織から抽出されたDNA-RNAについてLOH解析を行った。染色体19p13にマッピングされている6個のマイクロサテライトマーカを使って解析した結果、19S584で高頻度(45%)にアレル欠損を認めた。そのため、次にBRG1部位に非常に近い特異的マーカー(BRG1MS)を用いて検索した結果、口腔癌ではBRG1遺伝子のLOHが最も高頻度(57%)になっていることを明らかにした。すなわち、LOH解析により、BRG1遺伝子部位が口腔癌においてターゲットになっていることを証明した。

また、BRG1遺伝子は多くの症例でmRNA発現が高く認められた。これらの結果は①BRG1の関連遺伝子に異常が存在する可能性、②癌化のとき関連遺伝子が消失した可能性、③遺伝子の突然変異(ミューテーション)の可能性が考えられた。

RNAレベルではミューテーションは認められず、ゲノムレベルで35個のエクソンの解析でも遺伝子変異は認められなかったが、塩基配列のpolymorphismが認められた。

更に今回の結果は、BRG1のexon26を含むsplicing variant が91%欠損していた。Exon26をコーディングするドメインとhnRNPE2蛋白の一部のドメインが非常に高いhomologyがあったことを考察している。hnRNPE2は核内保持シグナルであり、exon26のコーディングしているドメインは核内保持シグナル(Nuclear Retention Signal)の機能を持っているということから、BRG1蛋白が核から細胞質に移行し、BRG1による細胞増殖抑制機能が働かなくなり、細胞の癌化のプロセスが始まるのではないかと考えられる。

以上のことから、口腔扁平上皮癌において、BRG1の部位で高頻度のLOHが認められ、BRG1 mRNAの発現量も上昇傾向が認められた。ミューテーションは認められないもののBRG1のexon26を含むmRNA variantが腫瘍特異的に欠損してことを認めた。このことから、口腔扁平上皮癌の癌化のメカニズムにはBRG1遺伝子に関与していると考えられ、BRG1は口腔扁平上皮癌の癌抑制遺伝子候補である可能性が示唆された。

よって本論文は博士(歯学)の学位論文に値すると思われた。