

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	菊 池 良 子
学 位 論 文 題 目			
Connective Tissue Growth Factor Is a Putative Conditional Tumor-Suppressor Gene Frequently Inactivated by Promoter Hypermethylation in Ovarian Cancer (プロモーター領域のメチル化により発現抑制を受ける新規卵巣癌抑制遺伝子候補CTGFに関する研究)			
共 著 者 名			
津田均、金井弥栄、笠松高弘、千石一雄、広橋説雄、稲澤譲治、井本逸勢			
未 公 表			
研 究 目 的			
東京医科歯科大学で作製されたゲノムアレイを用いたアレイCGH法により，卵巣癌細胞株の潜在的ゲノム一次構造異常の網羅的解析を行い，これを指標に新たな癌関連遺伝子の同定を試みた。			
材 料 ・ 方 法			
対象としたのは卵巣癌細胞株24株でその内訳はSerous8株、Mucinous4株、Clear cell 8株、Endometrioid3株、Anaplastic carcinoma1株である。解析に用いたゲノムアレイは800種類の癌関連遺伝子座をもつBACを搭載したMCG Cancer Array800で、これを用いて計800個のスポットについてゲノムコピー数の異常を解析した。その結果新たに検出したホモ欠失領域とその標的遺伝子候補についての解析を卵巣癌細胞株をもちいてGenomic PCR、RT-PCRで解析し、その結果新規卵巣癌抑制遺伝子候補であると考えられたCTGFのエピゲノム制御機構であるメチル化の解析を卵巣癌細胞株を用いて5'-aza-dC/TSA Treatment, Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA法), bisulfite sequence法で解析し、臨床検体を用いてMethylation Specific PCR法 (MSP法)、Bisulfite sequence法で解析した。またCTGFのCpG island周囲のプロモーター活性をPromoter assayを用いて解析した。臨床検体におけるCTGFメチル化と発現との相関をReal-Time PCR法で、臨床病理学的因子とCTGFの発現との相関をImmunohistochemistryを用いて検討した。さらにCTGFの細胞増殖能に関する解析をcolony formation assayを用いて検討した。			

成 績

独自に作製したゲノムアレイを用いたアレイCGH法により、一種類の細胞株で *Connective tissue Growth factor* (CTGF) のホモ欠失を検出した。CTGFのmRNAの発現は正常卵巣、および正常卵巣上皮由来不死化細胞株でみとめられ、ホモ欠失を示した細胞株を除いて、細胞株23株中12株(52%)で発現の低下が認められた。5-aza 2'-deoxycytidine処理によりCTGFの発現の低下していた細胞株で、CTGFのmRNAの発現の回復をみとめた。細胞株におけるCTGFのCpG islandの周囲のメチル化の状態をCOBRA法とBisulfite sequence法を用いて調べたところCTGFの発現の低下している細胞株で、発現の低下していない細胞株にくらべて高頻度にメチル化が生じている部分が存在した。また、この部分にはpromoter assayの結果著明なプロモーター活性をみとめた。この領域の臨床検体におけるメチル化の有無をMSP法を用いて調べたところ66検体中39検体(59%)と高頻度にメチル化がみとめられた。メチル化のある群ではメチル化のない群にくらべて有意にmRNAの発現レベルが低かった。免疫組織化学染色ではStage I、IIではStage III、IVにくらべ、CTGFの発現の頻度が有意に低かった。また、統計的に有意差はなかったが、Stage I、IIではCTGFの発現のない群がある群にくらべて、Kaplan-Meier曲線にて生存率が低い傾向を示したのに対し、Stage III、IVではCTGFの発現のある群ではない群にくらべてKaplan-Meier曲線にて生存率が低い傾向を示した。60歳以下で転移に関連するStage IIIc, IVに限定するとCTGFの発現のある群では発現のない群に比べて有意に($p=0.033$) 予後が悪かった。CTGFの発現のない細胞株にCTGFをtransfectionした群と空ベクターをtransfectionした群にわけてcolony formation assayを用いて細胞増殖能を比較したところ、CTGFをtransfectionした群では細胞増殖能が低かった。

考 案

高密度、高精度ゲノムアレイを用いた卵巣癌細胞株におけるゲノムコピー数異常解析により検出した新たなホモ欠失領域から、新規卵巣癌抑制遺伝子候補CTGFを同定した。CTGFは、卵巣癌臨床検体の59%にプロモーター領域のメチル化を認め、メチル化による発現抑制が卵巣癌形成に関与する可能性が示唆された。一方進行症例でのCTGFの発現上昇がみられたためCTGFの発現が卵巣癌の発症のみでなく進展にも関与する可能性が示唆された。

結 論

CTGFはプロモーター領域のメチル化により発現抑制を受ける遺伝子であり、卵巣癌の形成に関与するが、その働きはstageにより異なっていると考えられた。

引 用 文 献

1. Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* 2004; 95: 559-563.
2. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428.
3. Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray JW, Hirohashi S, Inazawa J. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 3741-3747.

参 考 論 文

なし

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博 士 (医学)	氏 名	菊 池 良 子
<p>審査委員長 小 川 勝 洋 ㊟</p> <p>審査委員 葛 西 眞 一 ㊟</p> <p>審査委員 千 石 一 雄 ㊟</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Connective Tissue Growth Factor Is a Putative Conditional Tumor-Suppressor Gene Frequently Inactivated by Promoter Hypermethylation in Ovarian Cancer</p> <p>(プロモーター領域のメチル化により発現抑制を受ける新規卵巣癌抑制遺伝子候補 CTGF に関する研究)</p>			
<p>卵巣癌は、婦人科領域の癌死亡原因として重要な疾患であるが、進行癌で発見されることが多く、未だ、有効な予防法、早期診断法、治療法は確立されていない。卵巣については、これまで Akt, EGFR, ras などの癌遺伝子の異常が報告されているが、癌抑制遺伝子については、p53 遺伝子以外に報告がない。</p> <p>本学位論文提出者は、卵巣癌について新規の癌抑制遺伝子を発見するために、バクテリア人工染色体アレイ comparative genomic hybridization 法 (BAC array CGH) を用いて、卵巣癌ゲノムを解析した。卵巣癌細胞株 24 株を用いた検討では、ゲノムのさまざまな領域で、gain および loss が見られ、4 領域について homozygous deletion が検出された。このうち、3 領域では、すでに、TGFB2, MTAP、CDKN2A/p16、Smad4 の癌抑制遺伝子が存在することが知られているが、6q 領域については、これまで既知の癌抑制遺伝子は知られていない。この領域には、connective tissue growth factor (CTGF) 遺伝子が存在し、ヒト癌では、CTGF の発現低下と、CTGF 遺伝子プロモーター領域の異常メチルが報告されていることから、CTGF に注目して、さらに解析を進めた。24 卵巣腫瘍細胞株について、CTGF mRNA の発現を調べたところ、homozygous deletion を認めた細胞株以外でも、さまざまな程度に発現低下が認められ、また、CTGF mRNA 発現低下を示した細胞株を、脱 DNA メチル化剤である 5-azacytidine で処理したところ、発現の回復が見られた。さらに、CTGF mRNA 発現低下を示す細胞株では、CTGF プロモーター領域の異常メチル化が証明されたほか、この領域は、Luciferase 法により転写活性を有することが明らかになった。卵巣癌手術症例についても検討したところ、CTGF プロモーター領域の異常なメチル化を示すものが見られ、それらでも CTGF mRNA の発現が低下していた。したがって、CTGF mRNA 発現低下は、CTGF 遺伝子プロモーター領域の異常メチルによることが明ら</p>			

学位論文の審査結果の要旨

かになった。また、CTGF 発現低下を示す卵巣癌細胞に、CTGF を強制発現させたところ、コロニー形成能が著しく低下したことから、CTGF は癌抑制作用を持つことが示唆された。一方、免疫染色による手術材料の解析では、早期ステージの卵巣癌については、CTGF 陽性例は、予後良好であったが、ステージの進行したものでは不良であった。以上の所見より、CTGF は、早期卵巣癌では抑制的に作用し、進行癌では促進的に働くことが示唆された。

本研究は、卵巣癌における CTGF の関与を初めて明らかにしたものであり、卵巣癌の病態の理解に多大に貢献するものである。本学位論文提出者は、当該および周辺領域について、深い知識を有しており、試問審査においても、明解な回答が得られた。よって、本審査委員会は、本論文が学位論文に値するものと判定した。