

論文の内容の要旨

1. 論文題目 ヒト卵巣癌における Wnt 拮抗遺伝子 *SFRP1* のメチル化に関連した発現抑制

指導教官 矢野 哲 助教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 12 年 4 月入学
医学博士課程
生殖、発達、加齢医学専攻
氏名 高田 恭臣

序論

SFRP1 遺伝子は染色体 8p11.2 上に存在し、Wnt シグナルに拮抗する働きをもった遺伝子である。最近、ヒトの大腸癌において *SFRP1* 遺伝子のプロモーター領域がメチル化されていることがわかり、新規の癌抑制遺伝子として認識された。一方、卵巣癌でも Wnt シグナル伝達経路が関連していると考えられており、類内膜腺癌において β -カテニンの変異 (mutation) が認められている。また、漿液性腺癌では β -カテニンの蓄積量の増量があるにも関わらず、 β -カテニンの変異 (mutation) が認められることはまれであり、Wnt シグナル伝達経路における他の遺伝子の関与が考えられた。そこでヒト卵巣癌における *SFRP1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化について研究した。

材料と方法

漿液性腺癌 3 株 (OV-90, HTOA, JHOS-2)、粘液性腺癌 3 株 (MCAS, RMUG-L, RMUG-S)、明細胞腺癌 3 株 (ES-2, TOV-21G, RMG-I)、類内膜腺癌 1 株 (TOV-112D)、低分化型癌 1 株 (RTSG)、未分化型癌 2 株 (TYK-nu, KURAMOCHI)の卵巣癌細胞株 13 株、手術によって得られた卵巣癌患者の臨床検体 17 検体、子宮内膜症性嚢胞患者の臨床検体 7 検体を材料とした。抽出したゲノム DNA を過去の論文に従って bisulfite 処理した。

細胞株、臨床検体における *SFRP1* 遺伝子のメチル化を Methylation-specific PCR(MSP)を用いて調べた。MSP プライマーの配列は大腸直腸癌での実験で使用されたものと同じものを使用した。

定量的 RT-PCR を用いて卵巣癌細胞株の *SFRP1* 遺伝子の発現量を調べた。*SFRP1* 遺伝子のメチル化と発現抑制が認められる細胞株 4 株 MCAS、RMUG-L、RTSG、TYK-nu に関しては 5-aza-2' deoxycytidine を添加して、脱メチル化と発現の回復を確認した。

結果

SFRP1 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を、MSP を用いて調べた。MCAS、RMUG-L、RTSG、TYK-nu の 4 つの細胞株では MSP にてメチル化 DNA のみ検出された。OV-90 と RMG-I の 2 種類の細胞株ではメチル化 DNA と非メチル化 DNA の両方が検出された。残りの細胞株と HOSE 細胞では非メチル化 DNA

のみ検出された。

定量的 RT-PCR を用いた *SFRP1* 遺伝子の発現量の実験では、メチル化 DNA のみ検出された細胞株 4 株、および、メチル化 DNA と非メチル化 DNA の両方が検出された細胞株 2 株のうち 1 株では、まったく *SFRP1* が発現していなかった。

5-aza-2'-deoxycytidine、脱メチル化酵素を用いた実験では、MCAS 細胞に 5-aza-2'-deoxycytidine を 0.1 μ M 以上の濃度で添加したところ、プロモーター領域のメチル化が脱メチル化され、*SFRP1* の発現が回復した。プロモーター領域のメチル化によって、*SFRP1* の発現抑制が起こっていることが確認された。

卵巣癌臨床検体 17 検体を使って、*SFRP1* のプロモーター領域のメチル化を、MSP を用いて調べたところ、17 検体中 2 検体 (12%) でメチル化 DNA が検出された。一方、子宮内膜症性嚢胞 7 検体ではメチル化 DNA は検出されなかった。PCR のサイクル数をさらに 4 サイクル上げたところ (計 36 サイクル)、卵巣癌臨床検体 4 検体と子宮内膜症性嚢胞 1 検体において、メチル化 DNA のバンドが認められた。これらの検体では、わずかながらメチル化された DNA が存在することが認められた。

考察

プロモーター領域のメチル化による *SFRP1* の発現抑制を、卵巣癌において初めて証明した。卵巣癌臨床検体のうち、粘液性腺癌 1 例中 1 例、漿液性腺癌 11 例中 1 例で *SFRP1* のメチル化が認められた。卵巣癌細胞株では、粘液性腺癌 3

株中 2 株と低、未分化型癌 3 株中 2 株で *SFRP1* のメチル化が認められた。一方漿液性腺癌 3 株では 1 株も *SFRP1* のメチル化が認められなかった。検体数が少ないが、粘液性腺癌において *SFRP1* の発現抑制が認められる傾向があった。卵巢癌臨床検体 4 検体と子宮内膜症性嚢胞 1 検体において、わずかながら *SFRP1* のメチル化 DNA が存在した。卵巢癌臨床検体では、メチル化 DNA の存在は腫瘍細胞の不均一性 (heterogeneity) によると考えられた。繰り返す出血とその結果起こる、ひどい炎症が子宮内膜症性嚢胞の発生に関与するとされており、慢性的な炎症は DNA のメチル化を促すことが知られている。このため、子宮内膜症性嚢胞の非癌細胞中にメチル化された DNA が存在している可能性があると思われた。*SFRP1* の発現抑制が大腸癌の初期段階で起こっており、発癌に関与していることから考えると、非癌卵巢上皮細胞中の DNA メチル化は卵巢癌の発癌の初期段階にも関与していると予想される。大腸癌と同じく、卵巢癌でも発癌における *SFRP1* 遺伝子のメチル化の関与が示唆された。