

論文の内容の要旨

肝腫瘍における PEG10 の遺伝子およびタンパク質発現解析

指導教員 深山 正久 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

上村 直子

近年、多くの癌について、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析が行われている。そして、癌の発生や進展のメカニズムの解明や、治療や診断のターゲットの探索が可能となり、マイクロアレイは癌の研究において有用な解析手法であると考えられる。

しかしながら、成人の癌を研究する場合、問題点もいくつか挙げられる。それは、多くの環境因子に曝されており、個人差が大きいこと、また、この解決手段の1つとして多くの症例についての解析が必要であること、である。

一方、小児癌は、成人の癌と比較して発症例数が少ない稀な腫瘍である。成人の癌との異なり、発症年齢が低く、染色体および遺伝子変異が少ない。それゆえ、環境要因による影響が少なくなり、個人差が少なくなる。また、原因となる遺伝子の探索が可能となる。このように小児癌を対象とした解析は、症例数が少ないという不利な点があるが、発癌の研究においてはよい単純系モデルであると考えられる。

そこで本研究では、小児癌の1つである肝芽腫を肝腫瘍のモデルとして、網羅的な遺伝子発現解析を行った。さらに、肝腫瘍の発生や進展のメカニズムを明らかにするために、肝細胞癌と比較することによって、肝腫瘍特異的な発現を示す遺伝子を選出した。そして、この解析により、肝腫瘍特異的な遺伝子として同定した *PEG10* (*Paternally expressed gene 10*) について、肝腫瘍における役割を明らかにすることを目的とした。

(1) 肝腫瘍において特異的に発現が亢進している遺伝子の同定

まず、肝芽腫 8 例 (embryonal type 4 例、pure fetal type 4 例) および正常肝 4 例について、オリゴヌクレオチドマイクロアレイにより 12600 プローブの網羅的な遺伝子発現解析を行った。12600 プローブのうち、全ての症例でシグナル値が 100 を超えないプローブを除外し、残った 5930 プローブについて、階層的クラスタ解析および肝芽腫で特異的に発現変化する遺伝子の抽出を行った。

階層的クラスタ解析では、embryonal type、pure fetal type、正常肝が独立した群に分類されたことより、分化度により発現している遺伝子には特徴があることが示唆された。

また、正常肝で特異的に発現が亢進する遺伝子として、上位にチトクローム P450 ファミリーが多く選出され、肝芽腫では肝臓の機能が正常に保たれていないことが示された。肝芽腫で特異的な発現亢進を示した遺伝子の上位 50 個には、インプリンティング遺伝子が 6 個 (*p57*、*PEG9*、*PEG10*、*PEG3*、*IGF2*、*NDN*) 含まれ、このことより、肝芽腫とインプリンティング遺伝子が関連している可能性が考えられた。また、インプリンティング遺伝子の発現量を肝細胞癌において比較したところ、*PEG10* が高分化型から低分化型まで幅広く、かつ高頻度に発現亢進していることが明らかになった。しかし、3 つのインプリンティング遺伝子 (*PEG9*、*PEG10*、*PEG3*) のインプリンティングの状態を確認したところ、3 遺伝子とも片側アレルからの発現を示し、インプリンティングの状態は正常に保たれていることが確認された。

以上の結果より、インプリンティング遺伝子は肝腫瘍で発現の亢進していること、特に *PEG10* が幅広くかつ高頻度に発現亢進しており、肝腫瘍関連遺伝子である可能性が示された。

(2) *PEG10* のタンパク質発現解析

遺伝子の発現解析により、*PEG10* が肝腫瘍において特異的に発現亢進する遺伝子であることが示唆された。では、*PEG10* の発現亢進が肝腫瘍においてどのような役割を果たすのか解明するために、肝腫瘍において *PEG10* のタンパク質が発現亢進しているのか、またその局在について検討する必要がある。また、*PEG10* は 2 つのリーディングフレーム (RF1、RF2) をもち、タンパク質の翻訳において、RF1 の終止コドン手前で -1 フレームシフトを起こし、RF1+RF2 という融合タンパク質が翻訳されることが予測されている。よって、*PEG10* のタンパク質発現解析および機能解析では、内在性の *PEG10* タンパク質がどのように翻訳されているか、重要となる。

まず、PEG10 が-1 フレームシフトを起こす可能性があるかどうか、COS7 細胞において PEG10 を強制発現させて検討した。結果、PEG10 はフレームシフト認識配列を利用して-1 フレームシフトする可能性、また、PEG10 が切断を受けている可能性が示された。

次に、PEG10 のタンパク質発現について解析するために、PEG10 の2つの RF それぞれに特異的な抗体を作製した。抗 RF1 ポリクローナル抗体および抗 RF2 モノクローナル抗体が得られた。これらの抗体は、強制発現させた融合タンパク質の認識も可能であった。

得られた抗体を用いて、肝腫瘍由来細胞株、胎児肝、肝芽腫、肝細胞癌、正常肝および背景肝について、イムノブロッティング解析を行った。細胞株は、mRNA の発現量と相関して、タンパク質の発現も亢進していた。胎児肝においても、タンパク質の発現が確認された。肝腫瘍では、肝芽腫、肝細胞癌ともに背景肝より発現量が亢進していることが示された。よって、PEG10 は肝腫瘍においてタンパク質の発現が亢進していることが示唆された。また、PEG10 タンパク質の発現が見られた組織および細胞株では、全て融合タンパク質の存在が確認された。よって、-1 フレームシフトは、内在性の PEG10 でも生じていることが明らかになった。さらに、プロテアソーム阻害剤を添加したとき、融合タンパク質の量が増加したことから、PEG10 がプロテアソーム系を介した切断・分解を受けている可能性が示された。

次に、抗体を用いて肝腫瘍における免疫染色を行い、PEG10 タンパク質の発現が亢進する頻度、および、腫瘍組織内における PEG10 の局在について検討した。肝細胞癌では、抗 RF1 ポリクローナル抗体によって、97 例中 41 例で染色された (42.3%)。染色は、mRNA の発現と同様に、高分化型から低分化型まで幅広く見られた。肝芽腫では、抗 RF2 モノクローナル抗体によって、9 例中 6 例で強い染色が見られた (66.7%)。肝細胞癌、肝芽腫ともに、細胞質への染色と、また、細胞間によって染色強度が不均一になる傾向を示した。以上の結果より、PEG10 タンパク質は腫瘍細胞に特異的なタンパク質であることが明らかになった。

さらに、PEG10 の細胞内局在について、共焦点顕微鏡を用いて検討を行った。発現量の高い HepG2 および HuH6、発現量の低い MCF7 について、抗 RF1 ポリクローナル抗体および抗 RF2 モノクローナル抗体を用いて、染色した。結果、HepG2、HuH6 ともに細胞質への局在を示した。また、ミトコンドリアへの局在も示さなかった。よって、PEG10 は、細胞質全体に局在しているタンパク質であることが明らかになった。

これまでの結果より、PEG10 がタンパク質レベルでも発現亢進していることが示された。では、PEG10 が肝腫瘍において発現亢進することが、肝腫瘍の発生や進展にどのような影響を与えているか、注目すべき重要な点である。そこで、PEG10 を発現抑制することによ

り、細胞株の増殖に影響がみられるかどうか、検討を行った。HuH6 および HuH7 について、PEG10 に対する siRNA を導入し、48 時間、72 時間、96 時間の細胞数の測定を行った。結果、HuH6、HuH7 とともに 72 時間以降で、コントロールと比較して、PEG10 の発現を抑制した細胞では細胞数が有意に減少した。よって、PEG10 の発現量が減少することにより、細胞増殖が抑制されたと考えられ、PEG10 は腫瘍細胞の増殖を促進する可能性が示唆された。

以上の結果より、本研究では、PEG10 の遺伝子およびタンパク質が肝腫瘍特異的に発現していること、さらに PEG10 が発現することによって細胞の増殖が促進される可能性が示された。よって、PEG10 は肝腫瘍において、重要な役割を果たす遺伝子であるといえる。