

たものの中に14%(1/7)の頻度でMSI-H偽陰性の症例がある可能性がある。

[高分化型胃がんでのMSI-H症例の検索]

EMR 早期胃がんに対し、胃がん悪性化への移行期として2 cm以下の高度分化型胃がん手術症例 84 例の MSI を検索し、5 例(5.9%)が MSI-H と判定された。これらの症例では BAT26 の変異のほか、TGF β R II、MSH3、BAX のフレームシフト変異を一つ以上認めたが、フレームシフト変異発生率の低い IGFIIR、RAD50、MSH6、BLM 遺伝子のフレームシフト変異は認められなかった。これらの 2 cm以下高度分化型胃がん手術症例は粘膜下層(SM)への浸潤が認められるものが多数あり、MSI-H 胃がん症例 5 例中 4 例で粘膜下層(SM)と粘膜内(M)胃がん細胞の MSI を区別して検索することができた。その 4 例中 1 例では M と SM のフレームシフト変異を示した遺伝子が一致していたが、他の 3 例では M と SM のフレームシフト変異遺伝子が異なり、SM において遺伝子のフレームシフト変異のないものが 1 例、フレームシフト変異遺伝子数が減少したもの 1 例、増加したもの 1 例という結果を得た。SM への浸潤が胃がん細胞の悪性化を反映しているとする、以上の結果は MSI-H によるフレームシフト変異遺伝子の増加は胃がんの悪性化と必ずしも相関していないことになる。BAT26 の変異のない症例で追加検索後に 2 遺伝子のフレームシフト変異の認められた 1 症例を MSI-H に加えても、2cm 高度分化型胃がん手術症例では 6/84 (7.1%) が MSI-H 胃がん症例であり、EMR の MSI-H 胃がん (9.5%) とくらべ減少している。(ただし、統計的には有意でない。)

[EMR早期胃がん、高度分化型胃がん、未分化型進行胃がんにおけるMSI-H胃がんの比較]

上記のように進行胃がんへ移行中と考えられる2cm高分化型胃がん手術症例中のMSI-H胃がんは、統計的有意差は認められないものの、

EMRのMSI-H早期胃がんとくらべ、減少傾向にある。一方、未分化型進行胃がんではMSI-Hの形質を示したものは1/112 (0.9%) のみで、EMR 早期胃がん、高分化型胃がんと比べ有意に減少している。この未分化型進行胃がんのMSI-H症例では、BAT26変異のほか、TGF β R II、MSH3、RAD50でフレームシフト変異が認められた。EMR早期胃がんでは未分化型が16症例ありそのうち2例(12.5%)がMSI-H胃がんであったが、これと比較しても、未分化型進行胃がんではMSI-H胃がんの頻度が低いと言えよう。

D. 考察

MSI-H 胃がんは EMR 早期胃がんも多く(9.5%)、粘膜下層への浸潤が認められる2 cm高度分化型胃がんでも多い(7.1%)が、未分化型胃がんでは少ない(0.9%)ことが判った。このような結果から、MSI-H 早期胃がんは未分化型進行胃がんには至らないことが考えられる。MSI-H 未分化型進行胃がんは少数例が存在し、また、10 cmの未分化型進行胃がんの複数個所の検索では孤立してMSI-Hが発生する症例も確認している、MSI-H 形質は未分化型胃がんにおいて発生しているが、何らかの原因で退化しているものも多いと思われる。MSI-H 高度分化型胃がんの粘膜内がん細胞と粘膜下層に浸潤したがん細胞を比較してみると、MSI-H 形質は浸潤した細胞で失われている例も検出されたので、MSI-H 胃がんが単純に浸潤し悪性化していくとは考えにくい。むしろ、MSI-H 胃がんを退化させるような胃の内部環境因子の作用を想定することも可能であろう。たとえば、酸性環境下で食物成分から二次的にニトロアミン類が発生した場合、ミスマッチ修復系の異常を持つMSI-H 胃がん細胞では DNA 損傷の修復が間に合わずに死滅する頻度が高まることも考えられよう。あるいは、浸潤にともなう悪性化形質の獲得と

MSI 形質が相容れない可能性も考慮されるが、その実態は不明である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Matsuda, M. Kondo, S. Kashiwabara, M. Yoshihara, S. Sutou, S. Matsukuma: Co-Localization of Trax and Mea2 in Golgi Complex of Pachytene Spermatocytes in the Mouse. J. Histochem. Cytochem. 2004 (in press).

2. 学会発表

1. 松隈章一: 進化的に保存された ER 蛋白遺伝子 p24 α 1 のヒトでの変異. 第 5 回日本進化学会(福岡) 2003 年 p106.
2. 吉原光代, 西連寺意勲, 小林理, 亀田陽一, 原田昌興, 松隈章一: 内視鏡粘膜切除早期胃癌症例のマイクロサテライト不安定性 MSI と形態学的特性. 第 62 回日本癌学会総会(名古屋) 2003 年 p400.
3. 松隈章一, 松田美由紀, 吉原光代: すい臓特異性発現を示す ER 蛋白遺伝子 GP25L の特性. 第 62 回日本癌学会総会(名古屋) 2003 年 p539.
4. 松田みゆき, 近藤雅昭, 柏原真一, 吉原光代, 須藤鎮世, 松隈章一: パキテン期精母細胞内ゴルジ体における mTrax と Mea2/ Δ Mea2 の相互作用. 第 26 回日本分子生物学会年会(神戸) 2003 年 p593.

H. 知的所有権の取得状況

該当なし。

分担研究報告書

分野 2 転移・浸潤およびがん細胞の特性に関する研究

研究テーマ ヒト浸潤・転移性がんの特性およびその制御方策に関する研究

分担課題 神経成長因子受容体 p75 の発現にともなう遺伝子発現の変動

分担研究者 菊地慶司（神奈川県立がんセンター臨床研究所・主任研究員）

研究要旨：神経成長因子受容体 p75NTR は上皮幹細胞のマーカー分子であると提案されているとともに、細胞のがん化に伴ってその発現が消失することから、がんの抑制に何らかの関係があるのではないかと考えられている。しかし現在のところ p75 の上皮系細胞での機能は明らかにされていない。本研究では p75 が何らかの細胞遺伝子の発現の調節に関わっているのではないかと考え、検討を行った。ひとつの不死化細胞株より p75 の発現量が異なる亜株を取得して、この亜株間の遺伝子発現プロファイルと比較したところ、p75 高発現の細胞株ではフィブロネクチンの発現量が低いことが分かった。レポーターアッセイにより、p75 の発現にともなってフィブロネクチン遺伝子の転写調節領域の転写活性が実際に抑制されることが示され、転写調節領域の解析から p75 は転写因子 SP1 の活性を調節している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト上皮組織では神経成長因子受容体 p75 を発現している細胞が存在しているが、我々はその分布や増殖特性などから p75 陽性細胞は上皮幹細胞を含むものと推定している。一方、p75 はヒトパピローマウイルス (HPV) 16 型あるいは SV40 の DNA を導入して樹立したヒト子宮頸部上皮由来の不死化細胞株では高率に発現が認められるが、子宮頸がん細胞ではその発現は認められなくなる。我々は p75 が上皮系細胞では幹細胞の維持に関わるとともに、がん化を抑制する働きを持っているのではないかと考えているが、p75 の機能はいまだに分かっておらず、p75 の発現の消長の生物学的意味を説明できないのが現状である。

本研究では p75 の機能について手がかりを得るために、p75 の有無による遺伝子発現の差を見

つけ、その差によってどのような細胞の特性がもたらされるのか推測するとともに、p75 がどのように遺伝子発現の調節をするのか検討することを考えた。

B. 研究方法

1. 細胞株：ヒト子宮頸部由来の扁平上皮細胞に HPV16 の DNA を導入して樹立した不死化細胞株 NCE16 より、抗 p75 抗体および磁気ビーズを用いて p75 陽性細胞群・陰性細胞群を分離し、さらに限界希釈法によって p75 を強く発現している亜株 (NCE16N+#20) と p75 をほとんど発現していない亜株 (NCE16N-#16) を取得した。
2. 遺伝子発現プロファイル：NCE16N+#20、NCE16N-#16 より poly(A) mRNA を調製し、遺伝子発現プロファイルを cDNA アレイ (Clontech 社 Cancer Array 1.2) を用いて比較した。

3. レポーターアッセイ：ヒトフィブロネクチン遺伝子の転写開始点上流域約2.5 kbを含む EcoRI/PstI 断片をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子につないだレポーター遺伝子を作成した。これを p75 の発現ベクターあるいはコントロールのベクターとともに NCE16N-#16 細胞に導入し、48 時間後にルシフェラーゼの活性を測定した。

C. 研究結果

1) p75 陽性であるヒト子宮頸部上皮由来不死化細胞株 NCE16 から p75 高発現の亜株 N-#20 と p75 をほとんど発現していない亜株 N-#16 を分離し、ふたつの細胞株 (p75 の発現量以外の遺伝的背景は同じものと期待される) の遺伝子発現プロファイルを cDNA アレイ (Clontech 社 Cancer Array 1.2) を用いて比較した。それにより差を指摘されたいくつかの遺伝子について、さらに逆転写 PCR 法ならびに別ロットの RNA を用いて発現量の差をチェックした。

2) 発現量の差が確認された遺伝子のうち、我々はフィブロネクチン (FN) に注目して解析を進めた：FN は細胞間マトリックスの重要な構成要素の一つであり、幹細胞のポジショニングや細胞の悪性化 (浸潤・転移) に関与している可能性がある。FN は NCE16N-#16 細胞では発現しているが、NCE16N-#20 細胞ではほとんど発現していないことが更に RNA のノザン解析、蛋白のウェスタン解析で確認された。

FN をコートしたディッシュで NCE16N-#20 細胞を培養しても p75 の発現の減少はみられないことから、FN が p75 の発現を制御しているというよりも、p75 が FN の発現を調節している可能性が強いと考えられる。また、NCE16N-#16 細胞に p75 の発現ベクターを導入して免疫染色法で検討したところ、p75 が発現している細胞では

FN の発現が低いという結果が得られた。

3) さらに FN 遺伝子 DNA の転写開始点上流域 2.5 kb をクローニングしてその転写促進活性をルシフェラーゼ・レポーターアッセイで調べたところ、p75 の共発現によって活性がおおよそ 50% 抑制されるという結果が得られた。これに対してヒトパピローマウィルス 16 型のエンハンサー (LCR) の転写促進活性は抑制されず、p75 による転写抑制には遺伝子に対する特異性があることが示唆された。

4) FN 遺伝子の転写開始点上流域をさらに短くして検討したところ、開始点上流 140 bp までの断片の転写活性も若干弱くなるが p75 によって抑制をうけることが分かった。この断片に存在する転写因子の結合配列はほぼ SP1 のみであり、p75 は SP1 の活性を制御している可能性が示唆される。

5) p75 の細胞内領域には細胞内にシグナルを送る機能的ドメイン (デスドメイン) の存在が指摘されている。これが p75 の転写抑制機能に必要などうか、細胞内領域を欠失した変異体を作成して検討を行った。その結果、転写抑制は半減するが、全く消失するわけではないこと、すなわち p75 の細胞外ドメインにも結果的に転写抑制を誘導する機能があることが判明した。このことは、おそらく p75 の細胞外ドメインと相互作用して細胞内にシグナルを伝える別の膜分子が存在していることを示唆している。

D. 考察

本研究の結果、p75 の発現にともなって細胞の遺伝子の発現が変動しうること、そのような遺伝子の一つにフィブロネクチンがあることが示された。p75 陽性細胞はフィブロネクチンの発現 (産生) が低いものと考えられるが、これは今後さらに実際の上皮組織で検証していく必要がある。

フィブロネクチンは上皮細胞の分化を抑制すると報告されている。p75 陽性の上皮幹細胞においては、未分化な状態を維持するのに自分自身のフィブロネクチンの発現・産生には依存していないことが示唆される：何らか別の細胞外マトリックス成分を自己産生しているか、或いは周囲の細胞によって産生される細胞外マトリックス成分に依存して未分化の状態を維持している可能性が考えられる。幹細胞が「ニッチ」に存在しており、ニッチを離れた場合には分化する、あるいは（一種の転移に似た挙動を抑止するために）アポトーシス（いわゆる anoikis）を起こすようにプログラムされていると仮定すると、周囲の細胞によって形成される場（すなわちニッチ）に依存して未分化な状態を維持しているという仮説が立てられる。この仮説はまた、p75 が細胞の悪性化に対して抑制的に作用することを説明しうる。p75 の発現が消失することでフィブロネクチンの産生が昂進し、ニッチを離れても分化・アポトーシスを起こしにくくなることは悪性化には有利となろう。これらをふまえて今後 p75 (-) フィブロネクチン(-) 細胞の悪性化の三者関係を検討する必要がある。

p75 の転写抑制活性が転写因子 SP1 の抑制を介している可能性が示唆された。転写調節領域での SP1 の結合部位はさまざまな遺伝子に広範に認められ、p75 がそれらの遺伝子の発現を全般に抑制している可能性は否定できない。この観点からすると p75 の発現に伴って、特にフィブロネクチン遺伝子の転写抑制が認められることは、フィブロネクチン遺伝子の転写開始点上流域に SP1 結合部位のクラスターが存在していることによるのかもしれない。逆にいえば、SP1 に非依存的に転写されている遺伝子は、p75 陽性細胞で相対的に強く発現していると考えられ、それらの遺伝子が上皮幹細胞を特徴づけている、あるいは細胞の悪性化の抑制に働いている、と

いう可能性がある。

E. 結論

p75 の発現にともなう細胞の遺伝子発現の変動が認められ、そのひとつにフィブロネクチン遺伝子の発現抑制がある。その機序として、転写因子 SP1 の活性調節が示唆される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

2. 学会発表

1. 菊地慶司・安本茂「神経成長因子受容体 p75 の発現にともなう遺伝子発現の変動」第 56 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9
2. 菊地慶司・安本茂「神経成長因子受容体 p75 の発現にともなう遺伝子発現の変動」第 24 回日本分子生物学会年会、神戸、2003.12
3. 政木隆博、安本茂、森村茂、菊地慶司、亀田陽一、宮川薫、玉井拙夫、杉政征夫、大川伸一、多羅尾和郎：膀胱上皮不死化細胞株の樹立と膀胱癌過程の研究 第 62 回日本癌学会総会、名古屋、2003.9

H. 知的所有権の取得状況

特になし