

前立腺癌の進展に關与する遺伝子群のDNAメチル化異常

千葉大学大学院医学研究院
遺伝子機能病態学（泌尿器科学） 鈴木 啓悦

研究の背景

前立腺癌は欧米諸国において、男性の悪性新生物のうち発生・死亡率とも第1～3位を占める。本邦においても急増傾向を認め、その医学的・社会的対策が急務である。前立腺癌も、Vogelsteinらの提唱した大腸癌のモデルに代表されるように、複数の遺伝子異常の蓄積によって進展すると考えられ、本研究では前立腺癌組織中の癌遺伝子・癌抑制遺伝子などの異常について検索して、その臨床的意義についても検討してきた¹⁾。

DNAメチル化は、以前より遺伝子の発現調節に關与することが知られていた。例えば女性のもつ2本のX染色体の1つは、メチル化によって不活性化されていることはよく知られている。最近では、癌抑制遺伝子などの主にプロモーター領域に存在するCpG island (GC-richな領域)のDNAメチル化異常による発現低下が、癌の進展に關与することが報告されてきており、このようなepigenetic regulationが注目されてきている。

前立腺癌でも、癌抑制遺伝子p16/MTS1/CD4KIや、細胞接着因子E-カドヘリンのDNAメチル化による発現低下が報告されている。今回本研究では、前立腺癌の進展に關与する5つの遺伝子(CD44・KAI1・androgen receptor・RAR β 2・CTCF)について、DNAメチル化異常の關与とその意義について分子生物学的手法を用いて解析したので報告する(なお、方法論の詳細については発表論文を付記したので、そちらを参照されたい)。

各遺伝子におけるDNAメチル化異常

1. CD44遺伝子

CD44遺伝子は癌の臓器特異的にその発現調節

が異なっているが、前立腺癌においては病期の進展に伴って発現低下が認められることが免疫組織化学的検討などより報告されている。今回われわれは、ヒト前立腺癌組織より抽出したゲノムDNAをm⁵C感受性のある制限酵素HpaII処理後にCpGislandを含むCD44遺伝子のプロモーター領域に設定したプライマーにてPCRを行い、CD44遺伝子のDNAメチル化異常について解析した²⁾。その結果、前立腺癌の病期進行と比例してDNAメチル化異常が増加した(p<0.05、表1)。また、前立腺癌剖検例における複数の転移組織間のDNAメチル化異常の相違を検索したところ、各転移病巣間にCD44遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化にmolecular heterogeneityが存在していた。

2. KAI1遺伝子

KAI1 (CD82) 遺伝子は、転移性ラット前立腺癌株へのヒト染色体の移入実験系からクローニングされた転移抑制遺伝子である。本研究では、KAI1遺伝子が前立腺癌の進行に伴ってその発現が低下するが、これはmutationやLOHといったgeneticな異常によるものでないことを報告している³⁾。今回、KAI1遺伝子のプロモーターのDNAメチル化異常について、代表的なヒト前立腺癌細胞株(LNCaP・PC-3・TSU-Pr1・DU145)を用いて解析した⁴⁾。脱メチル化剤5-AzaC投与前後で

表1 CD44遺伝子のDNAメチル化と前立腺癌の病期進行

	病期B	病期C	病期D	合計
メチル化あり	3(38%)	8(67%)	16(80%)	27(68%)
メチル化なし	5(63%)	4(33%)	4(20%)	13(33%)
合計	8(100%)	12(100%)	20(100%)	40(100%)

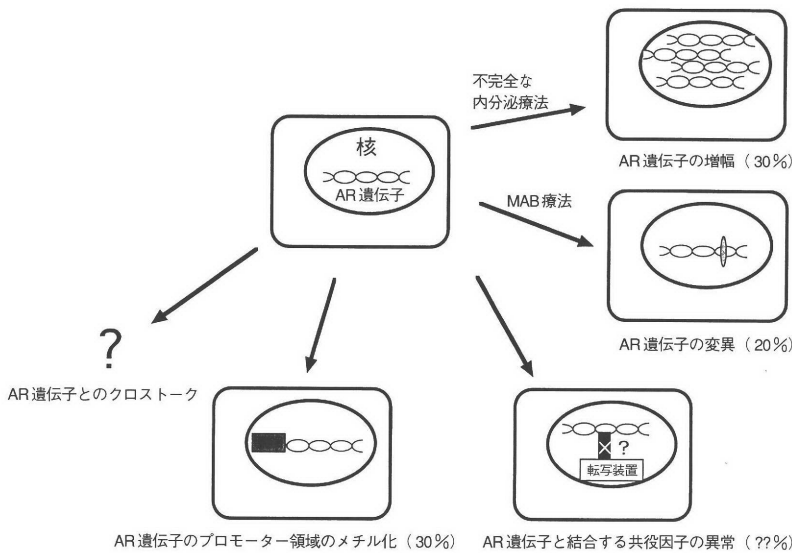


図1 前立腺癌におけるアンドロゲン受容体異常

bisulfite-sequencingを施行したところ、いくつかのCpGのメチル化が観察された。一方、5-AzaC投与により、PC-3とDU145の2つの細胞株でKAI1のmRNAが再発現することがRT-PCRで認められた。しかしながら、この発現はNorthern blotで検出できるレベルではなかった。したがって、DNAメチル化は前立腺癌のKAI1発現低下の一端を担っているものの、主な原因はKAI1遺伝子のさらにupstreamに存在するものと推察された。

3. Androgen receptor (AR) 遺伝子

前立腺癌に特徴的な性質として、アンドロゲン感受性癌であることが挙げられる。それゆえ、アンドロゲン除去によるホルモン療法は、前立腺癌の治療体系においても重要な役割を演じている。しかしながら、ホルモン療法を施行中にホルモン不応性癌に移行することは、臨床上の重要な問題となっている。本研究者らは、このホルモン不応性獲得におけるAndrogen receptor (AR) 遺伝子の異常の関与について以前より検討してきた(図1)⁵⁾。今回、AR遺伝子のプロモーターのDNAメチル化異常について、ヒト前立腺癌組織より抽出

したDNAをbisulfite処理後にPCR-sequencingで検討したところ、早期癌では約10%のみに認められたDNAメチル化が、ホルモン不応癌では30%に見られた⁶⁾。これは、AR遺伝子のプロモーターのDNAメチル化によってARが失活し、前立腺癌がホルモン不応性に移行している可能性を示唆している。

4. CTCF 遺伝子

癌における高頻度な特定染色体の欠失(LOH)は、その部位の癌抑制遺伝子の存在を示唆するも

のとされるが、前立腺癌においても第8・10・16染色体の欠失がその代表である。うち第10染色体はPTEN/MMAC1がその遺伝子であり、実際に進行性前立腺癌組織からは高頻度に変異が検出される⁷⁾。以前、本研究者らは前立腺癌における第16染色体長腕の欠失領域について詳細なdeletion mapを作成し報告しているが(図2)⁸⁾、その候補遺伝子として16q22に存在する転写活性因子CTCF遺伝子についてFred Hutchinson Cancer Research Centerのグループらと共同研究を行った。このCTCFは、複数の癌でgenomic imprinting(メチル化)に関与するIgf2/H19遺伝子に対して、メチル化依存性に結合することで発癌が促進されることが報告されている。今回、第16染色体長腕16q22の欠失を認める前立腺癌・乳癌・ウィルムス腫瘍の検体より4つのCTCF遺伝子変異を見つけた(図3)。これらはすべてzinc finger domain内に存在しており、mutagenesisにて機能解析したところ、CTCF遺伝子とその変異により機能喪失“loss of function”でなく機能変化“change of function”する新しいタイプの癌抑制遺伝子であることが示された⁹⁾。

Chromosome arm 16q

Markers	q11
	q12.1
	q12.2
D16S419 CETP	q13
D16S310 D16S151 D16S265	q21
D16S186	
D16S398	q22.1
D16S152 D16S450	q22.2
D16S395	q22.3
D16S266 D16S289	q23.1
D16S422	q23.2
D16S402 D16S157 D16S305 D16S7	q24.1
	q24.2
	q24.3

図2 前立腺癌における第16染色体長腕上の3つの共通欠失領域(このうち16q22.1にCTCF遺伝子が存在する)

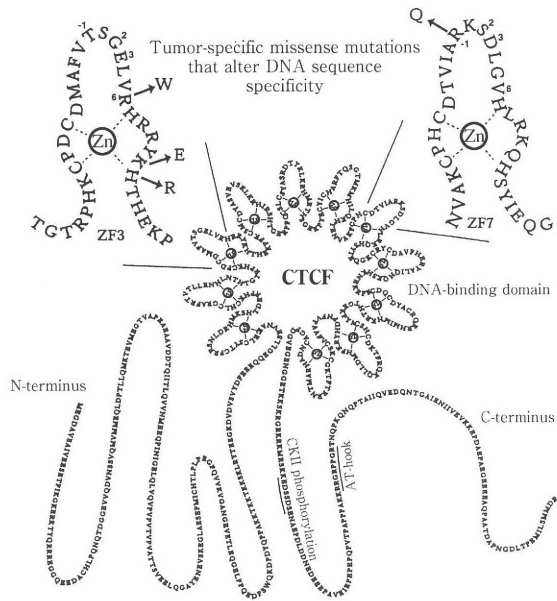


図3 CTCF遺伝子変異 (H345R: 前立腺癌組織、K344E: 乳癌組織、R339W・R448Q: ウィルムス腫瘍より検出)

5. RARβ2 遺伝子

レチノイドはその受容体を介した機序によって抗腫瘍効果が認められ、特に retinoic acid receptor β2 がその中心的役割を担っていると報告されてきた。RARβ2 遺伝子は多くの腫瘍において、LOHの認められる第3染色体短腕3p24に存在する。今回、われわれは RARβ2 遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG island のメチル化について、ヒト前立腺癌細胞株およびヒト前立腺癌検体を用いて検討した¹⁰⁾。これらの約80%にDNAメチル化を検出した。一方、正常前立腺癌組織ではまったくDNAメチル化を見なかったことより、RARβ2 遺伝子のメチル化の有無が遺伝子診断へ応用できる可能性が示唆された。

おわりに

癌関連遺伝子のDNAメチル化による発現調節は、前立腺癌において今回報告したようにいくつかの遺伝子で重要な役割を演じていることがわか

ってきた。これは、前立腺癌の病態解明の一端を明らかにするものと考えられる。このような epigenetic な異常をターゲットとした遺伝子診断や分子標的治療を目指すことが、ホルモン抵抗性癌などに対する新しい取り組みとして重要なものになると思われた。

謝辞

最後になりましたが、これらの研究の遂行にあたって終始ご指導いただきました千葉大学医学部附属病院長の伊藤晴夫教授ならびに教室の市川智彦助教授、赤倉功一郎助教授(現東京厚生年金病院泌尿器科部長)に心より深謝します。また共同研究者の三重大学医学部第二病理学教室の白石泰三教授、渡辺昌俊助教授には多大なご支援をいただきました。一連の実験施行時に大学院生だった教室の関田信之、木藤宏樹、神谷直人の諸君は各実験において大きな貢献をしてくれました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

[文献]

- 1) 鈴木啓悦, 伊藤晴夫: 前立腺癌の発症進展の分子機構. 現代医療32 : 275-280, 2000.
- 2) Kito H, Suzuki H, Ichikawa T, Sekita N, Kamiya N, Akakura K, Igarashi T, Nakayama T, Watanabe M, Harigaya K, Ito H: Hypermethylation of the CD44 gene is associated with progression and metastasis of human prostate cancer. **Prostate** 49: 110-115, 2001.
- 3) Dong J-T, Suzuki H, Pin SS, Bova GS, Schalken JA, Isaacs WB, Barrett JC, Isaacs JT: Down-regulation of the KAI 1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss. **Cancer Res.** 56: 4387-4390, 1996.
- 4) Sekita N, Suzuki H, Ichikawa T, Kito H, Akakura K, Igarashi T, Nakayama T, Watanabe M, Shiraiishi T, Toyota M, Yoshie O, Ito H: Epigenetic regulation of the KAI-1 metastasis suppressor gene in human prostate cancer cell lines. **Jpn. J. Cancer Res.** 92: 947-951, 2001.
- 5) 鈴木啓悦: 特集・ホルモン依存性癌と核内レセプター: 前立腺癌とホルモン療法. アンドロゲン受容体の関与. **Molecular Medicine** 37 : 1124-1129, 2000.
- 6) Nakayama T, Watanabe M, Suzuki H, Toyota M, Sekita N, Hirokawa Y, Mizokami A, Ito H, Yatani R, Shiraiishi T: Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers. **Lab. Invest.** 80: 1789-1796, 2000.
- 7) Suzuki H, Freije D, Nusskern DR, Okami K, Cairns P, Sidransky D, Isaacs WB, Bova GS: Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. **Cancer Res.** 58: 204-209, 1998.
- 8) Suzuki H, Komiya A, Emi M, Kuramochi H, Shiraiishi T, Yatani R, Shimazaki J: Three distinct commonly deleted regions of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancers. **Gene. Chromosom. Cancer** 17: 225-233, 1996.
- 9) Filippova GN, Qi CF, Ulmer JE, Ward MD, Hu YJ, Loukinov DI, Pugacheva EM, Klenova EM, Grundy PE, Feinberg AP, Cleton-Jansen A-M, Moerland EW, Cornelisse CJ, Suzuki H, Komiya A, Lindblom A, Dorion-Bonnet F, Neiman PE, Morse HC, Collins SJ, Lobanenkov VV: Tumor-associated zinc-finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter tts DNA-binding specificity. **Cancer Res.** 62: 48-52, 2002.
- 10) Nakayama T, Watanabe M, Yamanaka M, Yoshifumi H, Suzuki H, Ito H, Yatani R, Shiraiishi T: The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor β 2 gene expression in human prostate cancers. **Lab. Invest.** 81: 1049-1057, 2001.

ラボ空間の最適環境づくりを お手伝いします。

研究用試薬
臨床検査薬
O A 機器

研究用総合機器
臨床検査用機器
事務用機器

OR 尾崎理化株式会社

本社 神奈川県津久井郡津久井町根小屋1888
〒220-0203 電話 042(784)2525 FAX 042(784)2555
E-mail: ozaki@green.ocn.ne.jp
横浜営業所 横浜市緑区いぶき野31-10
〒226-0028 電話 045(988)0531 FAX 045(988)0532
E-mail: ozaki.y@jeans.ocn.ne.jp
多摩営業所 東京都八王子市長沼町271-6-101
〒192-0907 電話 0426(37)2200 FAX 0426(32)7212
E-mail: ozatama@coral.ocn.ne.jp