

平成 20年 3月

中野星児 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三
副主査 難 波 栄 二
同 押 村 光 雄

主論文

Expression profile of LIT1/KCNQ10T1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers

(大腸がんにおけるLIT1/KCNQ10T1の発現プロファイルとKvDMR1領域のエピジェネティクス)

(著者：中野星児、村上和弘、目黒牧子、副島英伸、東元健、浦野健、久郷裕之、向井常博、池口正英、押村光雄)

平成18年11月 Cancer Science 97巻 1147頁～1154頁

学 位 論 文 要 旨

Expression profile of LIT1/KCNQ10T1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers

(大腸がんにおけるLIT1/KCNQ10T1の発現プロファイルとKvDMR1領域のエピジェネティクス)

ゲノムインプリンティング（ゲノム刷り込み）とは、母親と父親由来のゲノムにその親由来の起源が記憶される現象であり、その結果、母方と父方から受け継いだ1対の対立遺伝子（アレル）が識別され異なる発現を示す。この現象は、塩基配列に依存しない遺伝子発現調節機構であり、DNAメチル化やヒストンテールの様々な修飾によって制御されていることが知られており、エピジェネティクスとよばれる研究分野における代表例として注目を集めてきた。ゲノムインプリンティングの異常が、がん発症に伴い高頻度に見出されること、多くの腫瘍においてがん抑制遺伝子がDNAメチル化により不活性化を受けることなどからエピジェネティック修飾の破綻が、がん発生過程における異常の1つとして認識され始めた。本研究は、ゲノムインプリント遺伝子LIT1を中心に大腸がんにおける発現異常とそのメカニズムについて検索したものである。

方 法

同一患者から摘出されたがん部および非がん部、全69症例と大腸がん細胞株13株からDNAおよびRNAを抽出し、制限酵素断片長多型解析にてinformative caseをスクリーニング後、その症例についてヒト11番15.5領域に位置するLIT1、H19、IGF2の3刷り込み遺伝子について発現解析を行った。

KvDMR1のメチル化状態とLIT1の発現状態を検討するため、メチル化感受性制限酵素Not Iを用いたメチル化サザン解析、特定領域のメチル化状態を詳細に解析できるbisulfite sequence法にてKvDMR1領域のメチル化解析を行った。

多型を用いることなく発現状態を検索するため、大腸がん細胞株13株を用いてRNA-FISHを行った。これによってLIT1の発現を可視化し、DNA-FISHとRNA-FISHのスポット数からLIT1遺伝子の発現状態を決定した。

KvDMR1のヒストン修飾状態とLIT1の発現状態を検討するため、LIT1の発現状態が異なる代表的な3つの大腸がん細胞株を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。転写活性領域に見

出されることが知られているH3 K4ジメチル化、H3とH4アセチル化および転写不活性領域に見出されるH3K9 ジメチル化に対する抗体を用いて免疫沈降後、DNAを回収し修飾状態をPCRにて検出した。

結 果

69症例の大腸がん組織のがん部、および同一患者の非がん部についてインプリンティング解析を行った結果、ヒト11番染色体上の刷り込み遺伝子クラスターに位置するIGF2遺伝子のLOI (Loss of Imprinting) が56%とがん部において高頻度で検出された。さらに、がん部においてLOIが検出された同一個人に由来するすべての非がん部組織においてもIGF2のLOIが認められた。また、LIT1遺伝子については、がん部特異的にLOIが53%と高頻度に見出され、非がん部においてはLOIがまったく検出されないことを明らかにした。

さらに、大腸がん特異的にLOIを認めたLIT1について発現制御機能の分子基盤を大腸がん細胞株において詳細に検討した結果、プロモーター領域とされるKvDMR1のメチル化状態とDNA-FISHとRNA-FISH解析から決定したLIT1 LOIには相関関係が見出され、またこの発現状態に一致したヒストン修飾が見出された。

これまでにKvDMR1のメチル化状態とCDKN1Cの発現状態には相関関係が示唆されている。そこでCDKN1Cの発現解析を行ったところ、KvDMR1のメチル化状態との相関関係は認められず大腸がんでは示唆しているような制御が破綻している可能性が考えられた。

考 察

本研究は、大腸がん組織でIGF2は正常組織でもLOIを示したのに対し、LIT1はがん部特異的にLOIが認められ、IGF2とは異なった大腸がんへの関与が示唆され、IGF2が腫瘍形成の易罹患性を示すマーカーとなる可能性を強く支持する結果である。また、IGF2とLIT1が異なるエピジェネティックなメカニズムにより発現制御されていることも示唆している。

LIT1はnon-coding RNAであり、周囲の刷り込み遺伝子の発現を制御するインプリティングセンターとしての機能の他に本研究からLIT1 RNA自体が何らかの機能を持つ可能性も考えられる。

結 論

LIT1のLOIが大腸がんの発生・進展に関与する可能性を強く示唆し、またLIT1の発現異常とKvDMR1領域のDNAメチル化およびヒストン修飾に強い相関関係が認められたことから、LIT1の発現はエピジェネティックな修飾により厳格に制御されていることを明らかにした。