

論文内容の要旨

論文提出者氏名 稲垣 恭和

論文題目

CREB3L4, INTS3, and SNAPAP are targets for the 1q21 amplicon frequently detected in the hepatocellular carcinoma.

論文内容の要旨

特定の染色体領域の DNA の増幅は、悪性腫瘍の成長と発育に重要な役割をはたすことがある。CGH(comparative genomic hybridization)法の登場によりはじめて癌において網羅的に DNA コピー数の異常を検索できるようになったが、その解像度は5-10Mbに留まっていた。最近、SNP (single nucleotide polymorphism : SNP) 特異的オリゴヌクレオチドプローブが配置されたアレイの導入により、より高感度に染色体の増幅、欠失を検出することが可能となった。著者は、肝細胞癌(HCC)の発生、進展に関与する遺伝子を同定することを目的に、高感度オリゴヌクレオチドアレイを用い、HCC に生じた特定染色体領域の DNA コピー数の変化を解析し、新規遺伝子増幅領域の検出とその標的遺伝子の同定をおこなった。

19のHCCの細胞株(HLE, HLF, PLC/PRF5, Li7, Huh7, Hep3B, SNU354, SNU368, SNU387, SNU398, SNU423, SNU475, JHH-1, JHH-2, JHH-4, JHH-5, JHH-6, JHH-7, Huh-1)および、36例のHCC臨床検体から Puregene DNA isolation kit(Gentra Systems 社)を使用し、DNA を抽出した。全ゲノム領域をカバーする約12万個のSNP特異的プローブを搭載した Genechip 100K アレイ(Affymetrix 社)を用いて、HCC 細胞株に生じた DNA コピー数の変化を以下のように解析した。250ng の DNA を制限酵素(XbaI または HindIII)にて切断し、アダプターライゲーションを行い、PCR で増幅、断片化し、ビオチンでラベルし、マイクロアレイにハイブリダイズさせた。その後蛍光標識し、アレイをスキャンし、イメージ画像を取得後、専用解析ソフトを用いてシグナルの数値化・データ解析を行なった。アレイの結果は染色体標本上での FISH(fluorescence in situ hybridization)によって確認した。FISH については、BAC(bacterial artificial chromosome)をプローブとして用い、ニックトランスレーションによってビオチンでラベルし、分裂中期の染色体にハイブリダイズした。ビオチンでラベルされたプローブの信号は avidin-fluorescein で処理し蛍光染色し観察した。さらにアレイの結果を確認するため、ゲノム PCR 法により DNA コピー数の定量を行った。増幅領域内の遺伝子について、発現の程度を調べるため m RNA を Real time PCR 法を用い定量した。RNA は Trizol を用いて抽出し、Super ScriptIII逆転写酵素(Invitrogen 社)を使用し DNA を作成した。LightCycler を使用し FastStart DNA

Master Plus SYBR Green I (Roche Diagnostics 社)を使って real-time PCR を施行した。PCR で使用したプライマーは U.S. National Center for Biotechnology Information Entrez Gene database から得た塩基配列をもとに Primer3 version 0.4 で作成した。

HCC 細胞株におけるアレイでのゲノム DNA コピー数の解析で、SNU368 において 1q21 領域が増幅していることがわかった。この増幅領域は 700kb の範囲にわたっていた。この結果を確認するために、増幅領域内に存在する RP11-1115K24 をプローブとして用いて SNU368 の染色体標本上で FISH をおこなうと、高レベルの増幅を示す HSR(homogeneously staining region)をみとめた。また 1q21 増幅領域内に存在する RH12271 STS marker の DNA コピー数を、genome PCR 法を用いて 19 の細胞株において調べると、SNU368 において増幅していた。36 例の HCC 臨床検体においても同様に、RH12271 領域のコピー数を調べたところ、36 例中 32 例(89%)と高頻度に増幅していた。1q21 増幅領域における標的遺伝子を識別するために、領域内の 26 の遺伝子の発現の程度を 19 の細胞株において real time PCR 法にて定量したところ、5 つの遺伝子が SNU368 において発現が亢進していた。他の細胞株においても、増幅を伴わずにこれらの遺伝子の発現が亢進しているものもあった。よってこれらの遺伝子が 1q21 増幅領域の標的遺伝子である可能性が高いと判断した。また 18 例の HCC 臨床検体の癌部と非癌部におけるこれら 5 つの遺伝子の発現の程度を、real time PCR 法を用いて定量したところ、CREB3L4, INTS3, SNAPAP が非腫瘍部と比較し腫瘍部において有意差をもって発現が亢進していた。他の 2 つの遺伝子は腫瘍部において発現は亢進していなかった。これらの結果から CREB3L4, INTS3, SNAPAP が 1q21 増幅領域の標的遺伝子の可能性が高いと思われた。

オリゴヌクレオチドアレイを用い、HCC 細胞株における 1q21 増幅領域の検出に成功した。この領域の増幅は HCC 細胞株のみならず、HCC 臨床検体においてもよくみられる。これらの 3 つの遺伝子は SNU368 において、増幅こともない、発現が亢進しており、臨床検体においても非癌部に比べ、癌部で発現が亢進していた。CREB3L4 は CREB/ATF family の転写因子であり、AlbZIP とも呼ばれる。人において CREB3L4 transcripts はもっぱら前立腺にて発現しており、前立腺癌、乳癌の cell line においても発現している。前立腺癌を免疫染色すると、CREB3L4 蛋白レベルは非癌部より癌部で高いことが報告されている。INTS3 は Integrator のサブユニットの一つをコードする。integrator は RNA polymerase II に結合し small nuclear RNA のプロセッシングに関与する。SNAPAP はシナプス小胞の結合、融合に必要な SNARE 複合体蛋白の構成成分をコードする。INTS3, SNAPAP は腫瘍発現との関連はほとんど知られていない。これらの 3 つの遺伝子の活性化が HCC のみならず、他の腫瘍の発育、進展に関与している可能性があり、役割を明らかにする更なる機能的な研究が必要である。