

学位論文題名

# 膀胱癌における癌抑制蛋白質ゲルソリンの発現低下機構

## 学位論文内容の要旨

緒言：アクチン調節蛋白質ゲルソリンは種々のヒト癌において発現の低下が認められている。膀胱癌においてもゲルソリンの発現は低下ないし消失しており、膀胱癌細胞にレトロウイルスを用いてゲルソリンを遺伝子導入することで腫瘍増殖抑制がおこったという報告から、ゲルソリンの発現低下が腫瘍増殖に重要な役割を果たしていることが示唆される。癌化の過程における遺伝子の制御機構としてDNAメチル化、ヒストンアセチル化といった遺伝情報のエピジェネティックな調節が癌抑制遺伝子の不活性化の原因として注目されている。そこで今回、膀胱癌におけるゲルソリンの発現低下機構についてクロマチン構造を中心に検討した。

材料と方法：正常尿路上皮細胞由来不死化細胞株 (SV-HUC-1)、正常尿路上皮細胞 (HMUK-1)、膀胱癌細胞株 (DAB-1, KU-7, UMUC-2, T24)、を用いて以下の実験を行った。突然変異の有無を確認するために、ゲルソリンプロモーター領域をPCR増幅し、その産物をシーケンスすることによって塩基配列を確認した。メチル化の評価はSV-HUC-1とUMUC-2にbisulfite処理とPCR増幅を行い、クローニングの後シーケンスを行うことでDNAのメチル化の有無を調べた。他の癌細胞株(DAB-1, KU-7, T24)については、メチル化特異的制限酵素HpaIIによる非メチル化CG配列切断後のPCR産物の有無を検出することによってゲルソリンプロモーター領域のメチル化の有無を検討した。ヒストンアセチル化の評価はAnti-Acetylated Histone H3, H4抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。免疫沈降されたDNAをナイロンメンブレンにプロットし、ジゴキシゲニン標識したゲルソリンプロモーター領域のDNAプローブをハイブリダイゼーションさせ、発光を検出することによりゲルソリン特異的なヒストンアセチル化の強度を検出した。またそれぞれの細胞株をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンA (TSA) で処理することによりヒストンアセチル化の状態を回復させ、正常細胞由来不死化細胞株と膀胱癌細胞株におけるTSAに対する反応性の違いについて検討した。さらにゲルソリンプロモーターを有するルシフェラーゼ発現ベクターを膀胱癌細胞株に導入しTSA処理後のプロモーター活性を測定した。同様の条件でTSA処理後蛋白質抽出し発現をWestern blot法を用いてゲルソリン蛋白質発現量を検出した。SV-HUC-1とDAB-1, KU-7の間でin vivo footprinting法を用いてゲルソリンプロモーター領域への転写因子の結合の有無や、クロマチン構造について検討した。培養細胞をin vivoで硫酸ジメチル(DMS)

にて処理して抽出したDNAを1Mピペリジンをういて切断した。次にこれらのDNAをテンプレートとしてプライマーを用いて初回伸長反応を行い、これにリンカーを結合させたDNA断片をテンプレートとしたPCR増幅を行い、最後に5'端を[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPで標識したプライマーによる伸長反応によってラダーを検出した。

結果：膀胱癌細胞株由来のゲルソリンプロモーター領域の検索した範囲において、突然変異による構造異常は検出できなかった。メチル化による転写の抑制が起こりうる塩基配列CGについては、プロモーター領域33個の塩基CG部位において、メチル化CGはSV-HUC-1でもUMUC-2でも共に存在せず、この解析をExon1の領域に延長してもメチル化を受けているCGは存在しなかった。さらに、正常細胞由来不死化細胞株と癌細胞4種について、メチル化特異的制限酵素HpaIIを用いて非メチル化CGを切断すると、PCR産物は認められず、この領域での膀胱癌におけるゲルソリン遺伝子の発現低下を説明するメチル化の相違は認められなかった。ゲルソリンプロモーター領域特異的なヒストンH4、H3のアセチル化について調べたところ、すべての膀胱癌細胞株で正常細胞由来不死化細胞株と比較してアセチル化ヒストンの割合が低下しており、ゲルソリンプロモーター領域のヒストンは脱アセチル化状態にあることがわかった。さらに膀胱癌細胞株では正常細胞に比較してTSA処置によるアセチル化がより強く促進された。これに加えて、膀胱癌細胞株ではTSA処理により、プロモーター活性、蛋白質発現量共に濃度依存性に増加した。次に*in vivo* footprintingによりゲルソリンプロモーターDNAの構造について解析したところ、転写開始点から5.側-34bpの部位で他の領域とは明らかに強度の異なるDMSに対するsuper hyper-sensitive領域が認められた。一方正常由来細胞ではこの領域は認められなかった。さらに前後のDNA配列を検討してみると、-41bpから-36bpに正向きGC-Boxが、-32bpから-27bpに逆向きGC-Boxがこの領域をはさみこむ形で配列されていた。この前後のGC-Boxが互いにG-C結合してステム構造を呈し、中心の-34bpの塩基Tをループ状に突出させたステム・ループ構造の存在が膀胱癌細胞株において示唆された。

考察：膀胱癌細胞株では、正常細胞由来不死化細胞株と比較してゲルソリンのプロモーター領域に突然変異、DNAメチル化の相違は認められなかった。ヒストンとそのアセチル化は染色体全体に及ぶグローバルなものであるが、その機能は個々のアセチル化部位によって異なった働きを示すことが知られている。ここでゲルソリンプロモーター領域のクロマチン構造に目を向けてみると、膀胱癌細胞株ではゲルソリンプロモーター領域のヒストンが脱アセチル化の状態にあり、これによって転写活性が正常に比べて低下していた。またTSA処理を行うことで、膀胱癌細胞株ではゲルソリンプロモーター領域のヒストンのアセチル化を正常より強く受けることがアセチル化ヒストン抗体を用いた免疫沈降により示された。すなわち膀胱癌細胞株においてはすでにヒストンが脱アセチル化状態にあるため、TSAによるアセチル化の回復効果も大きかったものと考えられる。このことから、膀胱癌ではプロモーター領域のヒストンが正常よりも強く脱アセチル化されていることでゲルソリンの発現低下が起こっていた。さらにこの脱アセチル化による蛋白質発現の低下はTSA処理によりヒストンをアセチル化することで可逆的に回復させられ、プロモーター活性と、

蛋白質発現が増加するということが示された。またin vivo footprintingによって膀胱癌細胞においてのみDMSに対するsuper hyper-sensitive 領域を認めたことから、膀胱癌におけるステム・ループ構造が周囲のクロマチン構造の影響を遮断している可能性が示唆された。

結語：膀胱癌におけるゲルソリンの発現低下には、プロモーター領域のヒストンの脱アセチル化が関与していた。また膀胱癌細胞においてのみsuper hyper-sensitive 領域を認め、ゲルソリンプロモーターのステム・ループ構造による転写抑制機構の存在が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 柳 知 彦  
副 査 教 授 葛 卷 暹  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊

## 学位論文題名

### 膀胱癌における癌抑制蛋白質ゲルソリンの発現低下機構

アクチン調節蛋白質ゲルソリンは膀胱癌をはじめ種々のヒト癌において発現低下が認められている。膀胱癌細胞にレトロウイルスを用いてゲルソリンを遺伝子導入することで腫瘍増殖抑制がおこることから、ゲルソリンの発現低下が癌抑制蛋白質としてはたらいっているとされる。今回膀胱癌におけるゲルソリンの発現低下機構について検討した。正常尿路上皮細胞由来不死化細胞株 (SV-HUC-1)、正常尿路上皮細胞 (HMUK-1)、膀胱癌細胞 (DAB-1、KU-7、UMUC-2、T24)、を用いて以下の実験を行った。突然変異の有無を確認するために、ゲルソリンプロモーター領域をシーケンスすることによって塩基配列を確認したところ、癌と正常で差は認められず突然変異による異常は検出できなかった。メチル化の評価は、メチル化特異的制限酵素による DNA 切断後の PCR 産物の有無を検出したが、広範囲なメチル化の異常は認められなかった。さらに bisulfite 処理とシーケンスを行うことでゲルソリンプロモーター領域の個々のメチル化の有無を検討した。プロモーター領域の CG 塩基においてメチル化 CG は存在せず、膀胱癌におけるゲルソリン遺伝子の発現低下を説明するメチル化の異常は認められなかった。ヒストンアセチル化の評価は、抗アセチル化ヒストン抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、ゲルソリンプロモーター領域の DNA プローブをハイブリダイズし、ゲルソリン特異的なヒストンアセチル化の強度を検出した。またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) で処理することによりヒストンアセチル化の状態を回復させ、膀胱癌細胞株における TSA に対する反応性について検討した。すべての膀胱癌細胞株で正常細胞由来不死化細胞株と比較してアセチル化ヒストンの割合が低下していた。さらに膀胱癌細胞株では TSA 処置によるアセチル化がより強く促進された。この結果癌細胞においてゲルソリンプロモーター領域のヒストンは脱アセチル化状態にあり、TSA 処理によりアセチル化状態が回復

できることが示された。さらに TSA 処理後のプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイを用いて、蛋白質発現量を Western blot 法を用いて検出したところ、共に濃度依存性に増加した。次にゲルソリンプロモーター領域への転写因子の結合や、クロマチン構造を *in vivo* footprinting 法を用いて検討した。培養細胞を硫酸ジメチルにて処理してピペリジンを用いて切断し、プライマーによる伸長反応によってラダーを検出すると、膀胱癌細胞株で転写開始点から 5' 側-34bp の部位で他の領域とは明らかに強度の異なる super hyper-sensitive 領域が認められた。これは正常由来細胞では認められなかった。さらに前後の DNA 配列を検討してみると、正向きと逆向きの GC-Box がこの領域をはさみこむ形で配列されており、この前後の GC-Box が互いに G-C 結合してステム構造を呈し、中心の塩基をループ状に突出させたステム・ループ構造の存在とこれによる転写調節機構が膀胱癌細胞株のみにおいて示唆された。

この論文に対して、ゲルソリンのエピジェネティックな調節に関する過去の報告と今回の相違点、ヒストンの脱アセチル化の機序、*in vivo* footprinting についてステム・ループ構造の詳細と報告例について質問があった。さらに臨床的な側面からゲルソリンを用いた遺伝子治療の臨床応用の可能性、遺伝子治療全般の今後の展望について質問があった。これらの質問に対して申請者は、エピジェネティックな調節につき乳癌での薬剤調節の報告はあるが、ゲルソリン特異的なヒストンアセチル化を示したのは初めての報告であることを述べた。ステム・ループ構造もまだ2つの報告があるのみの新しい転写調節機構でありこれを紹介した。遺伝子治療に関しては、今回のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA をもとに、新規の FR228 によるゲルソリン発現を効率よく高める併用療法も含めた臨床応用の可能性、今回報告したような転写調節からの遺伝子治療が考えられると将来展望を述べた。

この論文は膀胱癌における癌抑制蛋白質ゲルソリンの発現低下機構について初めて詳細に検討した論文として高く評価され、今後癌でのゲルソリンの低下機構の更なる解析と、ゲルソリンの発現回復による遺伝子治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。