

シンポジウム3 婦人科腫瘍とエピジェネティクス—臨床へのトランスレーション—

(2) 卵巣癌の発生および進展のエピジェネティクス解析—BRCA1 メチル化
および S100A4 脱メチル化の臨床的意義

信州大学 堀内 晶子

【目的】

近年、DNA メチル化を始めとするエピジェネティック機構が遺伝子の活性化・不活性化に関与することが示され、癌の発生・進展においても注目されている。特に、悪性腫瘍においては、腫瘍抑制遺伝子のメチル化による発現低下が重視されているが、一方、細胞の増殖・浸潤を促進する遺伝子の脱メチル化による発現亢進機序も存在する。そこで本研究では、卵巣癌の発生および進展に関与する遺伝子の発現変化を、メチル化と脱メチル化の両面から解析した。BRCA1 は家族性卵巣癌に関与する腫瘍抑制遺伝子であるが、散発性卵巣癌における意義は不明であった。そこで、第一に、散発性卵巣癌における BRCA1 発現とメチル化を検討し、第二には、転移に関連するカルシウム結合蛋白質である増殖因子 S100A4 の発現変化と脱メチル化による発現調節機序を検討した。

【方法】

<研究1>卵巣癌の発生過程における BRCA1 遺伝子の発現低下とメチル化の意義：

(1) 上皮性卵巣腫瘍 119 例のパラフィン包埋切片に対して抗 BRCA1 抗体を用いて免疫染色を行った。パラフィン切片から microdissection 法にて抽出した DNA を用いて、BRCA1 領域の Loss of heterozygosity (LOH) を解析した。また、BRCA1 promoter のメチル化の有無を methylation specific PCR (MSP) 法にて解析した。

(2) BRCA1 発現と患者生存期間との関連性を解析した。

(3) 卵巣癌細胞株に BRCA1 特異的 siRNA を導入し、BRCA1 発現抑制による cisplatin と paclitaxel の感受性および放射線感受性の変化を

WST-1 assay, フローサイトメトリーおよび ApoStrand ELISA 法にて解析した。

<研究2>卵巣癌の播種性転移における S100A4 の役割と脱メチル化による発現調節：

(1) 上皮性卵巣腫瘍 113 例に対して、抗 S100A4 抗体を用い免疫染色を行い、その発現と、細胞内局在を検討した。また、S100A4 発現と患者生存期間の相関性を検討した。

(2) 培養卵巣表層上皮 (OSE) 細胞、不死化卵巣表層上皮細胞 (OSE2a：熊本大学片岡秀隆教授より供与) および 4 種の卵巣癌細胞株 (A2780, A2780/CDDP, SKOV3, OVCAR3) における S100A4 発現を RT-PCR 法、Western blot 法にて検討した。卵巣癌細胞の増殖能、浸潤能およびヌードマウス・モデルでの腹腔内播種性転移能を評価し、S100A4 発現との相関を検討した。S100A4 特異的 siRNA にて S100A4 発現を抑制し、浸潤能の変化を検討した。

(3) OSE 細胞および卵巣癌細胞の DNA を用いて bisulfate-PCR-sequence 法にて S100A4 遺伝子のメチル化を検討した。また、レポーターアッセイにて、転写活性部位を検討した。脱メチル化剤 (5Aza-dC) による S100A4 発現の変化を検討した。また、上皮性卵巣腫瘍組織のメチル化の有無を検討し、S100A4 発現との相関を検討した。

【成績】

<研究1>卵巣癌の発生過程における BRCA1 遺伝子の発現低下とメチル化の意義：

(1) 卵巣癌における BRCA1 遺伝子の発現、アリル欠失、およびメチル化：正常卵巣表層上皮細胞は BRCA1 陽性であったが、上皮性卵巣腫瘍では BRCA1 発現消失は良性腫瘍および境界悪性腫瘍

に比較し、癌において有意に高頻度に認められた。LOHは良性腫瘍0%、境界悪性腫瘍15%、癌58%に認められたが、BRCA1発現とは相関関係はなかった。BRCA1遺伝子のメチル化は良性および境界悪性腫瘍では認めず、癌でのみ20/64例(31%)に検出された。BRCA1メチル化と蛋白発現との間に有意な相関が認められ、また同一症例において境界悪性病変部分はメチル化陰性・BRCA1陽性、癌病変部分ではメチル化陽性・BRCA1陰性であった。

(2) 卵巣癌患者におけるBRCA1発現の予後因子としての意義：患者の生存期間はBRCA1陰性症例でBRCA1陽性症例よりも長い傾向が認められた。さらに、p53発現と組み合わせた検討ではBRCA1陽性・p53発現陽性群に比べて、BRCA1陰性・p53発現陰性の症例が有意に予後良好であった。

(3) BRCA1発現の抗癌剤感受性に及ぼす影響：p53野生型A2780細胞ではBRCA1発現抑制によりcisplatin感受性が増強した。一方で、p53欠失SKOV3細胞およびp53変異A2780/CDDP細胞ではcisplatin感受性に変化は認められなかった。paclitaxel感受性はcisplatinと異なりA2780細胞でむしろ低下する傾向を示した。A2780細胞においてBRCA1発現抑制によりcisplatin添加後にp53およびP21発現が誘導され、apoptosis細胞および断片化PARPが有意に増加した。

<研究2>卵巣癌の播種性転移におけるS100A4の役割と脱メチル化による発現調節：

(1) 卵巣癌におけるS100A4の発現と局在、および予後因子としての意義：正常卵巣表層上皮細胞はS100A4陰性であったが、上皮性卵巣腫瘍ではS100A4発現が細胞質および核に観察された。特に核発現陽性は良性腫瘍0/24例(0%)、境界悪性腫瘍3/20例(5%)、癌16/75例(24.6%)と癌で有意に高頻度であった。核・細胞質分離抽出蛋白の検討で核内S100A4発現が確認された。患者生存期間ではS100A4核陽性症例は陰性例に比し有意に短縮しており($p=0.0045$)、多変量解析にて独立

した予後因子であった。

(2) 卵巣癌細胞におけるS100A4の発現と局在、および浸潤能・播種性転移能との相関：培養OSE細胞はS100A4発現陰性であった。卵巣癌細胞のうちOVCAR3は細胞質・核とも陰性、SKOV3細胞は細胞質のみ陽性、A2780およびA2780/CDDP細胞では細胞質・核に発現が認められた。卵巣癌細胞のin vitro浸潤能およびマウスモデル播種形成能はOVCAR3<SKOV3<A2780およびA2780/CDDPの順に亢進していた。siRNAを用いたS100A4発現抑制により細胞運動能・浸潤能が抑制された。

(3) 卵巣癌細胞におけるS100A4発現調節のエピジェネティック機序、および卵巣癌におけるS100A4脱メチル化：第1イントロン領域のCpGサイトは、OSE細胞およびS100A4低発現癌細胞(OVCAR3)ではメチル化されていた。一方、S100A4高発現細胞(A2780/CDDP)では脱メチル化されており、メチル化の有無がS100A4蛋白発現と相関していた。レポーターアッセイの結果、S100A4遺伝子の転写は同領域でコントロールされていた。OVCAR3細胞では5Aza-dC添加によりS100A4発現が増強した。卵巣癌症例の検討でも、蛋白発現と脱メチル化は相関していた。

【結論】

卵巣癌の発生および進展機序におけるエピジェネティクスの役割を、それぞれにおいて鍵となる遺伝子のメチル化および脱メチル化の両面から解析した。今回の検討で、散発性卵巣癌の発生においてもBRCA1発現の消失が重要であり、そのメカニズムとしてBRCA1遺伝子promotor領域のメチル化が関与していた。さらに、BRCA1発現はcisplatin感受性に影響を及ぼすことが判明した。

癌の進展過程では、S100A4発現は脱メチル化により増強し、それに伴い癌細胞がより悪性度を増すことが示唆された。今後、エピジェネティックな変化を標的としたがん治療を開発していくうえで、メチル化だけでなく脱メチル化の面からも検討を行うことが必要と考えられる。