



膵癌進展過程において TrkA promoter の AP-1 結合部位付近のメチル化はTrkA発現を亢進させる

藤本, 昌代

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2013-04-03

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2968

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002968>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



膵癌進展過程においてTrkA promoterのAP-1結合部位付近の メチル化はTrkA発現を亢進させる

藤本 昌代

神戸大学大学院医学系研究科生体情報医学講座分子病理学分野

(指導教官：前田 盛教授)

連絡先：藤本 昌代，生体情報医学講座分子病理学分野
神戸大学大学院医学系研究科

兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-1

神戸大学大学院医学系研究科

T E L : 078-382-5485

F A X : 078-362-0297

(平成16年1月19日受付)

要 約

神経成長因子 (NGF) と高親和性受容体TrkAは種々の癌の進展に関わっていると考えられている。私共は癌細胞株や膵癌組織を用いてTrkA発現制御機構を調べた。各種大腸癌細胞株と膵癌細胞株におけるバイスルファイト・マッピングでは5'側非翻訳領域にあるAP-1類似配列周囲のメチル化の蓄積に伴い、定常状態のTrkA発現は増加し、正の相関関係が見られた。また、TrkAプロモーターはAP-1類似配列を欠いた変異体で、より高い活性を示し、AP-1類似配列がTrkA転写を負に制御することが示唆された。ゲルシフトアッセイでは主にc-Jun二量体がAP-1類似配列に結合したが、DNAメチル化により、この結合は阻害された。従って、メチル化によるTrkAの発現促進は、負に働くAP-1類似配列へのc-Jun蛋白の結合を直接阻害することによって起こることが示唆された。一方、進行膵癌例の病理組織においても、特に浸潤先端部でTrkA発現の増加とAP-1類似配列周囲のメチル化集積が認められた。TrkA遺伝子プロモーターでは非CpGアイランドのメチル化により TrkA 発現が促進し膵癌の進展に寄与しうることが示された。

緒 言

膵癌は、リンパ管・血管・末梢神経を介した浸潤・転移能の為に予後が非常に悪く^{1, 2)}、神経周囲浸潤を

起こす率が特に高い^{1, 3)}。

神経成長因子 (NGF) は神経系の種々の細胞から分泌されるサイトカインで、神経の発達、分化、生存、アストロサイトの分化等に関わっている^{4, 5)}。受容体としては高親和性のTrkAと低親和性のp75^{NGFR}が存在して、NGFとの結合によりTrkA内部のチロシンキナーゼが活性化され細胞内に情報が伝えられる⁴⁻⁶⁾。NGFと受容体は神経芽細胞腫^{7, 8)}や神経膠腫⁹⁾等の神経由来の腫瘍のみならず、前立腺癌¹⁰⁾、乳癌¹¹⁾、肺癌¹²⁾、膵癌¹³⁾などにも発現が見られ、癌細胞の移動、成長、生存に関わっているとされる。膵臓癌組織でも正常と比べ高濃度のNGFとTrkAが検出され、TrkAは主に膵癌細胞に、NGFとp75^{NGFR}が末梢神経束に認められたことから¹³⁻¹⁵⁾、NGF-TrkA経路と膵癌の神経周囲浸潤との関連性が推定された。

CpGメチル化は癌進展機構の一つとして重要であるとされ¹⁶⁾、CpGアイランドの過剰メチル化による遺伝子抑制が、細胞周期関連遺伝子 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b})、DNA修復遺伝子 (hMLH1, MGMT, BRCA1)、細胞接着関連遺伝子 (CDH1, TIMP3, DAPK)、p53関連遺伝子 (p14^{ARF}, p73)、代謝酵素遺伝子 (GSTP1)、APC/ β -catenin経路 (APC) 等に見られる¹⁷⁾。一方、DNA不安定性と癌遺伝子活性化につながるゲノム全体の脱メチル化¹⁸⁾も前立腺癌、肝癌、子宮癌などに見られる。

膵癌進展過程におけるTrkA遺伝子のエピジェネティックな発現調節機構を明らかにするために、私共は膵癌

キーワード：メチル化, TrkA, 膵臓, AP-1, 非 CpG アイランド

細胞株と膵癌切除組織検体におけるTrkA遺伝子プロモーターのメチル化状態と遺伝子発現との関係について調べた。

方 法

1) 細胞株培養

ヒト膵癌細胞 (PANC1, MIAPaCa2), ヒト大腸癌細胞株 (COLO320, SW480, HT29) はRPMI1640にて, ヒト神経芽細胞腫細胞株SK-N-SHは α MEMにて, 10%胎児ウシ血清と各100U/mlのペニシリンとストレプトマイシンを加えた培地で, 37°Cの加湿した5%二酸化炭素環境下で培養した。

2) ヒトTrkA遺伝子の5'側上流領域のクローニング

TrkA遺伝子プロモーターの既報配列¹⁹⁾ (GenBank AB019480) をもとに2種類のアンチセンスプライマー (5'-ACCGAGCAGCCTGAGCTCAAGAAGGTG-3', 5'-ACACAGTGATCGCCTTCTTCCTC-3')を設定し, ゲノムウォーカーキット (Clontech) を用いてPCR反応を行い, 更に上流側に約1.7kbのDNAフラグメントを得た (AP-1(+):-1637/+83)。更に制限酵素処理とPCR法を用いて転写開始部位・翻訳開始部位付近を欠失したDNAフラグメントを作成し (AP-1(-):-1637/+53), それぞれをpGL3-Basicベクター (Promega) に組み込んだコンストラクトを作成した。各々の塩基配列はダイデオキシターミネータ法によりABI prism 310 自動シーケンサー (Applied Biosystems) にて解析した。

3) ルシフェラーゼアッセイ

上記コンストラクト (AP-1(+)/pGL3-Basicベクター又はAP-1(-)/pGL3-Basicベクター) とpRL-TKベクターとを, 遺伝子導入試薬Effectene (Qiagen) を用いて, 膵癌, 大腸癌, 神経芽細胞腫由来の培養細胞に共導入した。導入6時間後のプロモーター活性を, Dual Luciferase Assay system を用いて, ATP-30 10ルミノメーター (Advantec) にて測定した。各コンストラクトの導入効率はpRL-TKベクター転写活性で補正した。導入実験は3回行って平均値±標準偏差として表した。

4) RNA抽出及びRT-PCR

膵癌培養細胞, 大腸癌培養細胞から抽出したRNA 1 μ gから逆転写によりcDNAを作製し, プライマー (sense:5'-TCGGCTCAGTCGCCTGAATC-3', antisense:5'-ATCACCGTGGCTGACTGCTC-3') を用いてPCRで増幅を行い, その産物を3%アガロースゲルで電気泳動した。

5) サザンブロットによるメチル化スクリーニング

培養細胞 (PANC1, MIAPaCa2, COLO320, SW480, HT29, SK-N-SH) とヒト胎盤から抽出した10 μ gのDNAを, 3 μ gのMspIまたはHpaIIで24時間処理後に電気泳動し, ナイロン膜 (Hibond N+ nylon membrane, Amersham) に転写した後, 上記1.7kb DNA (-1637/+83, AP-1(+)) をプローブとしてサザンブロット法を行った。65°Cでプローブと12時間反応させた後, 0.1%SDSを含む2 \times SSPEで2回, 0.1%SDSを含む1 \times SSPEで2回, 0.1%SDSを含む0.1 \times SSPEで1回洗浄し, BAS2000 (FUJIX) で解析を行った。

6) バイスルファイト・マッピング

既報に従って²⁰⁻²²⁾, 各種細胞株のDNAを0.5 μ g含んだ10 μ lの低温融解アガロースビーズを作成し, 水酸化ナトリウム (最終濃度 0.1M) で変性させ, ハイドロキニン1mMと硫酸水素ナトリウム3.5Mを含むバテスルファイト溶液 (pH5) に50°C 16時間浸透した。ビーズをTris-EDTAで洗浄後に, 水酸化ナトリウム (0.5N) で30分脱硫化後, 塩酸 (1N) で中和, Tris-EDTAで洗浄した。DNA 0.1 μ g相当のビーズを鋳型にプライマー (sense: 5'-GGGGAGGTTTGGTAGTTGTA-3', antisense: 5'-TATCAACCAACCAACAAACTAC-3') を用いてPCRを行い, 転写開始部位と翻訳開始部位の間の163bpの領域におけるCpGメチル化を調べた。増幅されたDNAはTAベクター (Invitrogen) を用いてクローニングし, 1検体当たり5個以上のクローンのシーケンスを決定し, CpGメチル化の状態を調べた。

7) 5アザデオキシシチジン (5-aza-dC) 処理

指数増加期の細胞 (5.3 $\times 10^4$ /cm²) を1 μ Mの5-aza-dC (Sigma) で24時間処理後にPBSで洗浄, 120時間後にDNAとRNAを回収した。バイスルファイト法でDNAの脱メチル化を確認すると共に, RNAを用いて半定量的RT-PCRを行い, TrkAのmRNAレベルの変化を調べた。5-aza-dC処理の各種細胞株のDNAとRNAを回収し対照とした。

8) SssI 処理

2) で得たコンストラクト (AP-1(+)) をS-アデノシルメチオニン (160mM) 存在下にSssI CpGメチラーゼ (New England Bio Labs) にてメチル化した後, 各種細胞株に導入し, ルシフェラーゼ活性測定を行った。

9) ゲルシフトアッセイ

定法に従いSK-N-SH細胞から核蛋白を抽出した。AP-1類似配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドを作成し (sense: 5'-CTGCCCCGCCTGAGCGAGGCGGCGCCCGCGGATGCTGC-3', antisense: 5'-GCAGCATCGCGCGCGCCCGCCTCGCTCAGGCGGGGCAG-3'),

5' 端を[γ - 32 P] ATPでラベルした。SssIでメチル化したオリゴヌクレオチドも同様にラベルした。これらの二本鎖 DNA は核抽出蛋白と25°Cで30分間c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2 に対する各抗体存在下に反応させた後、5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (100V, 2時間) し乾燥後にBAS2000で解析した。

10) 免疫染色

第IV期膵管細胞癌のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を用いて、抗NGF (Santa Cruz社), 抗TrkA (Santa Cruz社), 抗p75^{NGFR} (Promega社) 抗体にて免疫組織化学を行った。内訳は男性7人と女性1人、年齢は54-67歳 (平均62.5歳) であった (表1)。標本はキシレンで脱パラフィンを行い、エタノール系列で脱水した後、抗原賦活の為クエン酸緩衝液 (10mM, pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理 (350W, 10分) を行い、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害するために、標本を3%過酸化水素を含むメタノール二10分間反応させた。次に一次抗体と60分間室温で反応させた後、LSABキット (DAKO) を用いてアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体法を行い、0.03%過酸化水素を含むDABで発色反応を行った。免疫染色の評価は陰性 (陽性細胞なし), 弱陽性 (30%未満の陽性細胞), 陽性 (30-60%の陽性細胞), 強陽性 (60%以上の陽性細胞または強い染色性) の4段階で行った。

11) マイクロダイセクション

上記膵癌組織から7 μ m厚に薄切しHE染色した標本を、LM200マイクロダイセクションシステム (オリンパス) にて1例につき3箇所ずつ、非腫瘍部、腫瘍中心部、神経周囲浸潤部を選択的に採取した、プロテナーゼK (0.2mg/ml), Tris-HCL (10mM, pH8.0), EDTA (10mM), 1% Tween20を含む25 μ lの溶解溶液で検体を一晚処理した後、DNAを含む細胞溶解液から6)と同様に作成したビーズを鋳型として下記のプライマーでPCRを行い、バイスルファイトマッピングを行ってTrkA遺伝子翻訳開始部位周辺109bpのCpGメチル化を解析した (sense: 5'-GGGGAGGTTTGGTAGTTGTA-3', antisense: 5'-TATCAACCAAACCAACAACTAC-3', nested sense: 5'-TTGGTAGTTGTAGTTGGGAG-3', nested antisense: 5'-CCAACCTATACCAACCAAACCTACC-3')。

結果

1) TrkAのクローニング

TrkAプロモーター既報配列の上流側1.7kbのDNA

(GenBank AY321513) はCpGに富み、転写開始部位と翻訳開始部位の間に1カ所のAP-1類似配列 (TGAGCGA) を認めた。

2) 定常状態のTrkA mRNA発現とプロモーター活性

定常状態のmRNA発現は陽性コントロールのSK-N-SHが一番高く、次いでSW480, MIAPaCa2が高く、HT29, COLO320, PANC1では低くなっていた (図1a)。一方、TrkAプロモーター (AP-1(+)) の一過性導入実験ではルシフェラーゼ活性はCOLO320で18.62と最も高く、PANC1で3.25と最低値を取り (図1b), TrkAプロモーター活性と定常状態のmRNA発現には関連が見られなかった。このように外因性に導入したプロモーター活性と内因性の遺伝子発現に解離が見られることから、TrkAの発現にエピジェネティックな機構が働いていることが示唆された。

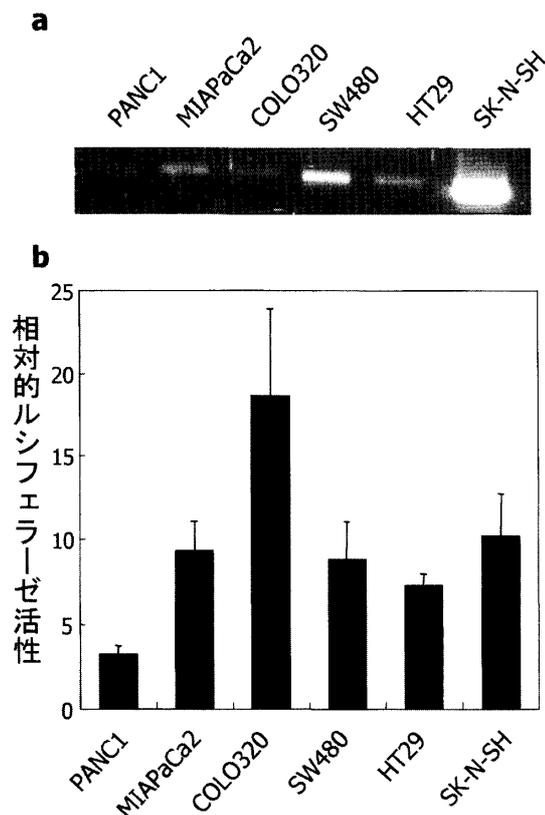


図1: (a) 定常状態のTrkA mRNA発現。発現量はSW480, MIAPaCa2で高く、HT29, COLO320, PANC1では低かった。SK-N-SHは陽性コントロールである。(b) TrkAプロモーターの一過性導入実験。ルシフェラーゼ活性はCOLO320で18.62と最高値、PANC1で3.25と最低値を取りTrkAプロモーター活性と定常状態のmRNA発現には関連が見られなかった。

3) メチル化マッピング

TrkAプロモーターに多数見られたCpG部位についてメチル化の検索を行った。HpaII消化後DNAを用

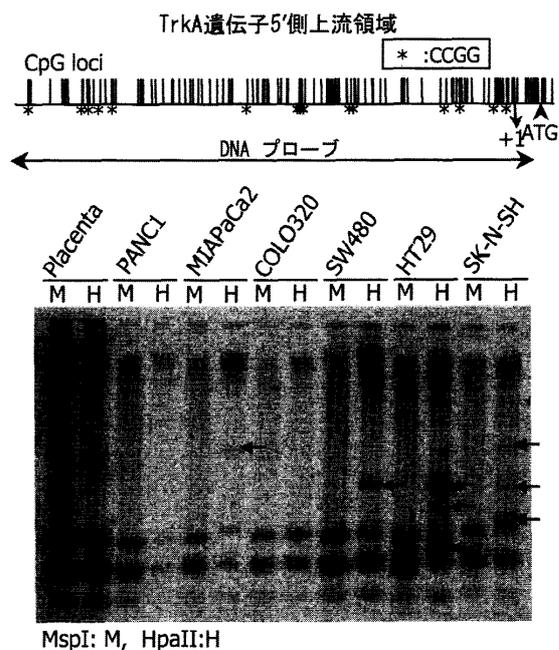


図 2: メチル化抵抗性の MspI, メチル化感受性の HpaIIにて処理後のサザンプロット。HpaIIのレーンでMIAPaCa2, SW480, HT29, SK-N-SHにメチル化を示すバンドを認め, PANC1, COLO320には認めなかった。プローブDNAの模式図を上に表示。CpGを縦線で, 制限酵素認識部位 (CCGG) を星印で示す。

いたサザンプロットではMIAPaCa2, SW480, HT29, SK-N-SHにメチル化を示すバンドを認め, PANC1, COLO320, 胎盤DNAには認めなかった (図 2)。転写開始部位・翻訳開始部位付近のメチル化をバイスルファイトマッピングで解析したところ, 膵癌細胞では, MIAPaCa2のCpGが大部分メチル化されていたがPANC1にはメチル化CpGはほとんど見られなかった (図 3)。大腸癌細胞に関しては5つのクローン間のばらつきが目立つものの, HT29, SW480ではCOLO320と比べて多数のメチル化CpGを認めた, このように各細胞株のメチル化数はサザンプロットと同様の傾向を示した。

4) 5-aza-dC処理

メチル化の多いMIAPaCa2, HT29に5-aza-dC処理を行うと定常状態のTrkA mRNAは減少したが, メチル化が少ないPANC1では5-aza-dC処理にてTrkA mRNAに変化がなかった (図 3, 4a)。

5) SssI処理

5-aza-dC処理とは逆に, SssI処理後の転写活性はPANC1で220%, MIAPa2で301%, SK-N-SHで900%といずれにおいても上昇が見られた (図 4b)。

6) AP-1 類似配列欠損コンストラクトのルシフェラーゼ活性

AP-1 類似配列欠損コンストラクト (AP-1(-))を用

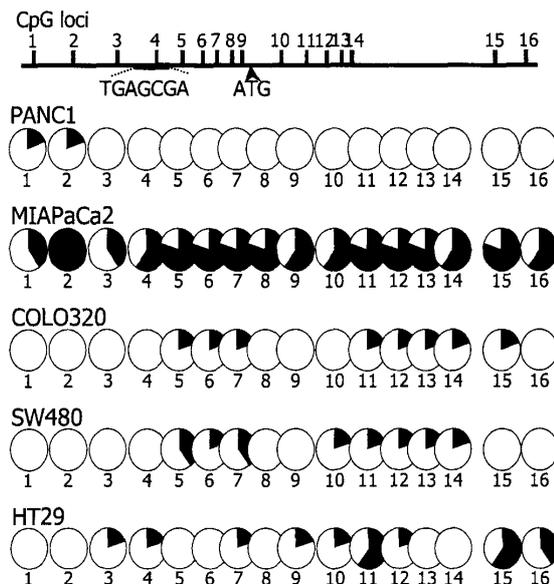


図 3: バイスルファイトマッピングによるTrkAプロモーターのメチル化解析。MIAPaCa2では大部分のCpGがメチル化されていたが, PANC1にはメチル化Cはほとんど見られなかった。上に解析部位 (+13/+165) の模式図を示すが, 縦線はCpG部位で番号は下の円グラフに対応している。円グラフは5クローン中のメチル化の割合を示す。

いたルシフェラーゼ活性はSssI処理後と同様にPANC1で379%, MIAPaCa2で201%, SK-N-SHで239%といずれにおいても上昇が見られた (図 4c)。

7) ゲルシフトアッセイ

EMSAを行いAP-1類似配列 (図 5a) への蛋白結合を調べた。メチル化していないAP-1類似配列を含むオリゴヌクレオチドはDNA-蛋白複合体を形成し, 主に抗c-Jun抗体でスーパーシフトを受け, 抗JunD, Fra2抗体で部分的にブロックシフトを受けた。オリゴヌクレオチドをメチル化したところ, DNA-蛋白複合体は形成されず, スーパーシフトやブロックシフトは見られなかった (図 5b)。

8) 免疫染色とメチル化マッピング

第IV期の膵癌症例8例 (表1) のうち6例で, TrkAは主に腫瘍細胞に見られ, 末梢神経や正常膵部のTrkA発現は弱かった。代表的な症例を図6に示す。膵癌各部位からマイクロダイセクションで採取された細胞をメチル化マッピングしたところ, 正常膵から癌中心部, 神経周囲浸潤した浸潤先端部に行くに従い, AP-1類似配列周囲にメチル化が集積する傾向が見られた (図 7, 5-7番目のCpG)。

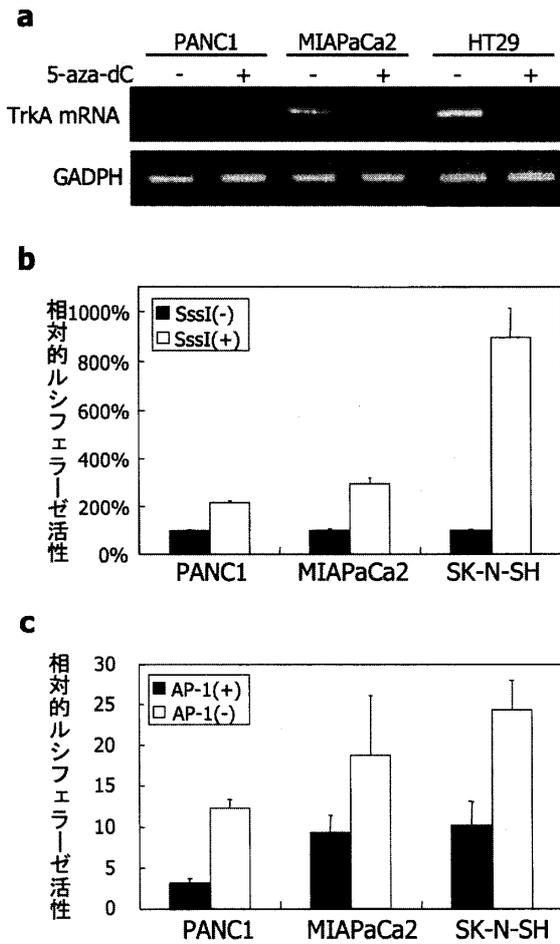


図 4：(a) 5-aza-dC処理前後のTrkA mRNA発現。MIAPaCa2, HT29では5-aza-dC処理にて、定常状態のTrkA mRNAは著明に減少したが、PANC1では処理前後で変化がなかった。(b) SssI処理前後のルシフェラーゼ活性。PANC1 (220%), MIAPaCa2 (301%), SK-N-SH (900%) と転写活性の上昇が見られた。グラフは6サンプルの平均±標準偏差を表す。(c) AP-1類似配列欠損コンストラクト (AP-1(+)) のルシフェラーゼ活性。PANC1 (379%), MIAPaCa2 (201%), SK-N-SH (239%) といずれにおいても上昇が見られた。グラフは6サンプルの平均±標準偏差を表す。

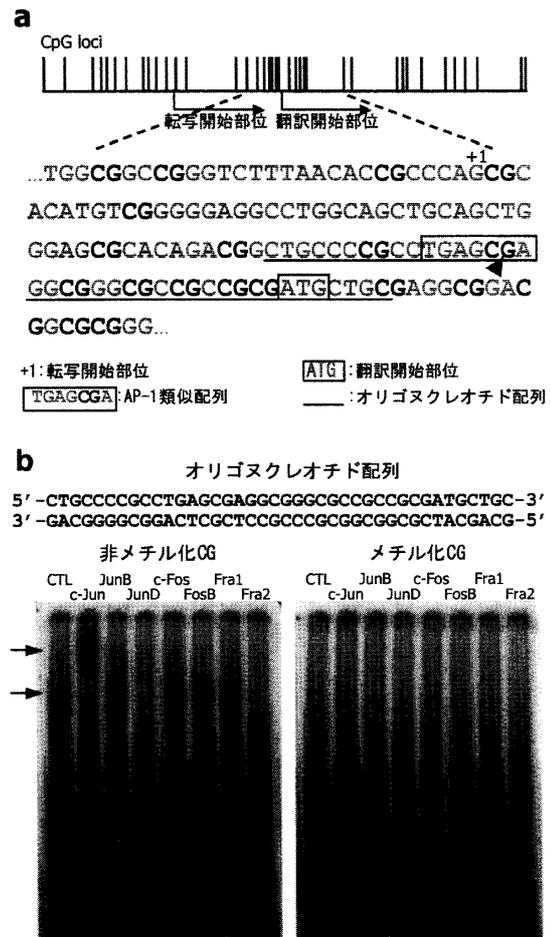


図 5：(a) TrkA転写開始部位・翻訳開始部位周囲のCpG部位。CpGを縦線で表す。AP-1類似配列(TGAGCGA)は転写開始部位(+1)と翻訳開始部位(ATG)の間に位置する。ゲルシフトアッセイに用いたオリゴヌクレオチドに相当する配列を下線で示す。(b) SK-N-SHの核抽出物と上記のAP-1類似配列を含むオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイ。メチル化していないオリゴヌクレオチドではDNA-蛋白複合体を形成し、主に抗c-Jun抗体でスーパーシフトを受け、抗JunD, Fra2抗体で部分的にブロックシフトを受けた(矢印)。メチル化したオリゴヌクレオチドではDNA-蛋白複合体は形成されなかった。

表 1：膵管癌症例のまとめと免疫染色

症例				免疫染色 ^b											
No.	組織型	ステージ	神経周囲浸潤 ^a	TrkA				NGF				p75 ^{NGFR}			
				癌細胞	神経線維	膵管	ラ氏島	癌細胞	神経線維	膵管	ラ氏島	癌細胞	神経線維	膵管	ラ氏島
1	中分化	IVa	ne2	+	±	+	+	+	+	+	++	-	++	-	-
2	高分化	IVb	ne3	+	±	+	±	-	±	++	++	-	++	-	-
3	高分化	≥IVa	ne2	+	-	N ^c	++	-	+	N ^c	++	-	++	N ^c	-
4	粘液	IVb	ne2	+	+	N ^c	N ^c	-	±	N ^c	N ^c	-	++	N ^c	N ^c
5	高分化	IVb	ne1	-	-	N ^c	++	±	±	N ^c	++	-	++	N ^c	-
6	粘液	IVb	ne0	-	-	N ^c	+	-	+	N ^c	+	±	++	N ^c	±
7	中分化	IVb	ne3	+	-	±	+	+	±	+	+	±	++	±	±
8	高分化	IVb	ne1	+	-	+	+	+	+	++	++	±	++	±	±

a 神経周囲浸潤：侵されている末梢神経線維の割合で4段階に分けている(ne0: 0%; ne1: <40%; ne2: 40-60%; ne3: >60%)

b 免疫染色：-:陰性; ±:弱陽性(<30%); +:陽性(30-60%); ++:強陽性(>60%または染色性の強いもの)

c N: 標本上評価不能

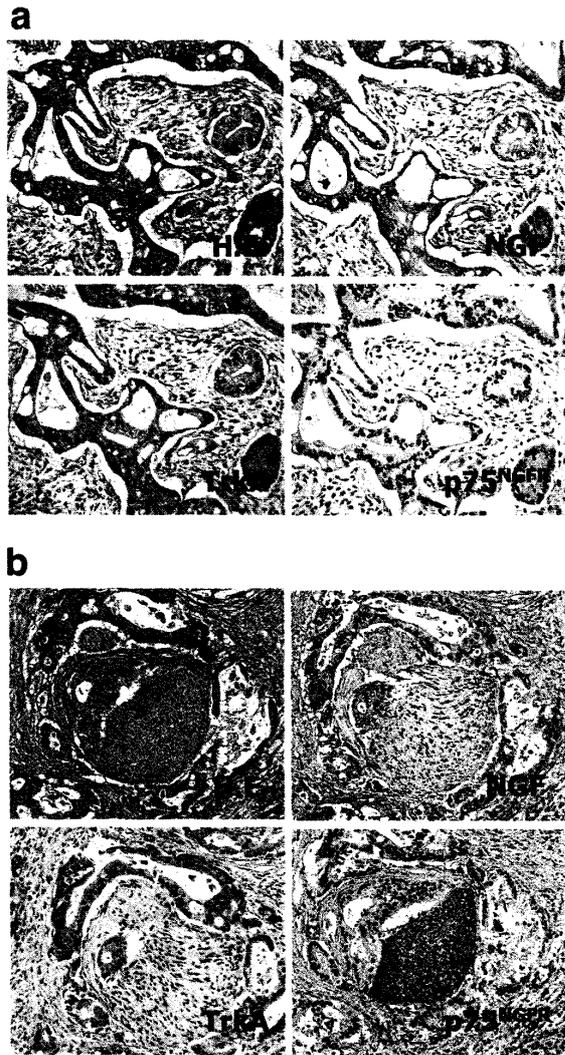


図 6：第IV期の膵癌症例 1 (図 1) の免疫染色。(a)癌中心部。TrkAとNGFが主に腫瘍細胞に見られ、p75^{NGFR}の発現はなかった。(b) 神経周囲浸潤部。神経周囲の腫瘍細胞にTrkA発現を強く、NGF発現を弱く認め、p75^{NGFR}発現は末梢神経束に見られた。

考 察

NGFの高親和性受容体TrkAの癌進展過程における発現調節機構について検討した。TrkAプロモーターコンストラクトを一過性に導入して測定された転写活性は、半定量的RT-PCRで評価した定常状態でのmRNA発現とは相関せず、エピジェネティックな機構により遺伝子発現が制御される可能性が考えられた。TrkAプロモーターにはCpGアイランドの基準は満たさないものの²³⁾、多数のCpGが転写・翻訳開始部位付近に認められた。また、サザンプロットとバイスルファイトマッピングで各細胞株のDNAメチル化を解析すると、定常状態のTrkA mRNA発現はメチル化の程度と正の相関関係を示した。

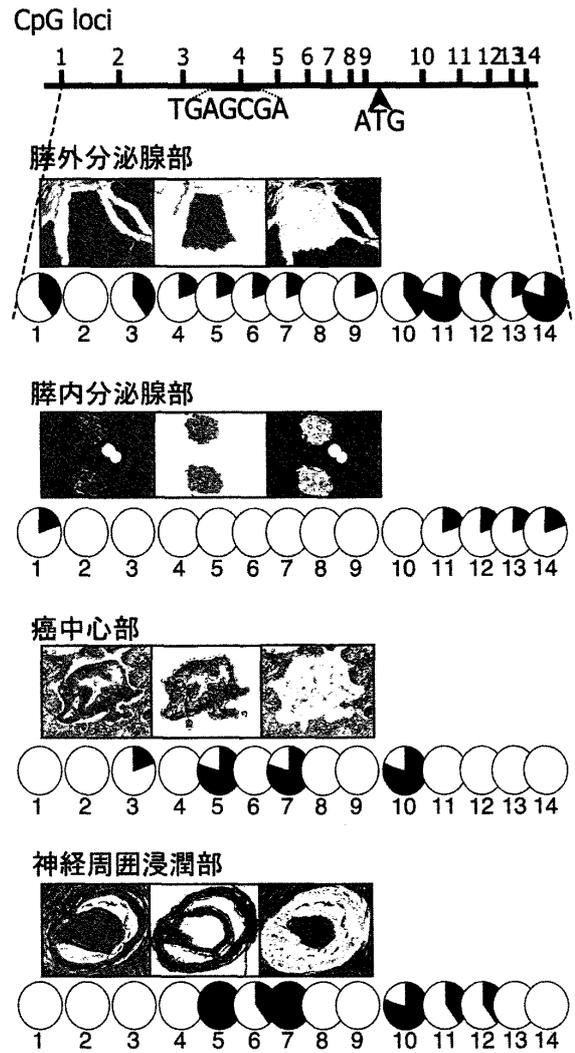


図 7：膵癌マイクロダイセクション検体のバイスルファイトマッピング。上に解析部位 (+13/+129) の模式図を示すが、縦線は CpG 部位で番号は下の円グラフに対応している。円グラフは 5 クローンの中のメチル化の割合を示す。正常膵から癌中心部、神経周囲に浸潤した先端部に行くに従い、AP-1類似配列周囲にメチル化が集積する傾向が見られた。写真は左からそれぞれマイクロダイセクション施行前、採取検体、施行後の画像である。

通常は、プロモーターのCpGアイランドではDNAメチル化によって転写抑制が起こることが知られており、メチル化CpG結合蛋白の非特異的な結合とヒストン修飾酵素のリクルートを介してクロマチン凝集、遺伝子抑制がおこる^{24, 25)}。しかし一方で、転写因子結合部位においてはメチル基が付加されたために配列特異的な転写因子の結合能が変化することも起こりうる²⁶⁾。更に転写因子結合部位自体でなく、その近傍のCpGメチル化が直接的に転写因子のDNA結合能に影響することや^{27, 28)}、メチル化依存性で配列特異的なDNA結合蛋白が間接的に転写因子のDNA結合能に影響す

る²⁹⁾ことも報告されてきた。本研究ではTrkA遺伝子転写開始部位近傍のAP-1類似配列におけるメチル化集積が遺伝子発現を促進する機構について更に検討した。

メチル化によるTrkA転写亢進機序としては、(a) 転写抑制的なAP-1類似部位がメチル化自体や、そこに結合する転写抑制因子によって不活化される可能性や、(b) メチル化部位が新たなAP-1として認識されること³⁰⁾が考えられるが、今回、AP-1類似部位を欠いたプロモーターの活性が低下したことから、この部位が転写抑制に働くことが示唆された。またゲルシフトアッセイではAP-1類似部位に結合していたc-Jun二量体がメチル化によって結合阻害を受けたことから、AP-1類似部位周囲のメチル化が直接的に、負に働くAP-1へのc-Jun結合を阻害した結果、TrkA転写が促進されたと考えられた。このように非CpGアイランドにおけるCpGのメチル化が癌の進展過程においてエピジェネティックに遺伝子発現を抑制する可能性が示唆された。

一方、膵癌病理組織検体の免疫染色では、神経周囲浸潤を呈する第IV期の膵管癌の細胞質にTrkAの強発現を認めたが(図6)これは以前の報告^{14, 15)}と同様の傾向であり、膵癌におけるTrkAの重要性が示唆された。また膵癌組織を選択的に切り出して詳細なメチル化解析を行ったところ、膵癌浸潤先端部に行くに従い、AP-1類似配列直下にメチル化の集積が観察された(図7, 5-7番目のCpG)。症例数は少ないが、神経周囲浸潤部では癌中心部と比べて多くのメチル化CpGが見られ、メチル化とTrkA発現は生体内でも正の相関が示された。このように膵癌病変においてTrkA発現はエピジェネティックな調節を受けており、発現調節の多様性と可塑性は、膵癌が神経周囲に浸潤していく過程で重要と考えられた。翻訳開始部位直下のメチル化(図7, 10-14番目のCpG)は非癌部の膵臓に多数見られるが、癌細胞株や癌検体にTrkA発現とは関連しておらず、発現制御に有意ではないと考えられる。しかし一方で、メチル化の集積自体はクロマチン凝集を惹起しTrkA遺伝子発現抑制につながる事が予想されるため³¹⁾、TrkAプロモーターメチル化は一時的で可塑的な正の調節機構として膵癌進展の過程に役割を果たしていることが示唆された。また、大腸癌細胞株でもTrkAのエピジェネティックな発現調節が示されており、NGF-TrkA系が他臓器の癌の進展にも同様に関与している可能性がある。このように、癌が原発部位から周囲組織に広がる際に、環境に応じて新たに獲得される癌細胞の形質は、最終的には遺伝子変化によって安定化すると考えられる³²⁾。

エピジェネティックな遺伝子発現調節機構に遺伝子変異と比べて可塑的で、細胞や組織の周囲環境に容易に影響されるものであり、腫瘍組織の形態に基づいた部位特異的な解析が必須である。

謝辞

ご指導いただきました北澤荘平先生、北澤理子先生(神戸大学大学院医学系研究科生体情報医学講座、分子病理学分野)、TrkAのcDNAを供与下さったDr. Luis F. Parada (Center for Developmental Biology, UT Southwestern Medical Center) と犬童康弘先生(熊本大学大学院医学薬学研究部、先端生命医療科学部門成育再建・移植医学講座、臨床医学系研究分野小児科学)、並びに、有用な助言を頂きました牛島俊和先生(国立がんセンター研究所、発がん研究部)に感謝申し上げます。

文献

- 1) Bockman, D.E., Buchler, M., Beger, H.G.: Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterol.* 107: 219-230, 1994.
- 2) Schneider, M.B.: Expression of nerve growth factors in pancreatic neural tissue and pancreatic cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 49 : 1205-1210, 2001.
- 3) Friess, H., Uhl, W., Berger, H.G.: Surgical treatment of pancreatic cancer. *Dig. Surg.* 11 : 378-386, 1994.
- 4) Barrett, G.L.: The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 61 : 205-229, 2000.
- 5) Bothwell, M.: Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18 : 223-253, 1995.
- 6) Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., Chao, M.V.: High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350 : 678-683, 1991.
- 7) Nakagawara, A., Arima, M., Azar, C.G., Scavarda, N.J., Brodeur, G.W.: Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. *Cancer Res.* 52 : 1364-1368, 1992.

- 8) Suzuki, T., Bogenmann, E., Shimada, H., Stram, D., Seeger, R.C.: Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 85 : 377-384, 1993.
- 9) Eberhart, C.G., Kaufman, W.E., Tihan, T., Burger, P.C.: Apoptosis, neuronal maturation, and neurotrophin expression within medulloblastoma nodules. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60 : 462-469, 2001.
- 10) George, D.J., Suzuki, H., Bova, G.S., Isaacs, J.T.: Mutational analysis of the TrkA gene in prostate cancer. *Prostate* 36 : 172-180, 1998.
- 11) Descamps, S., Toillon, R.A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J.P., Hondermarck, H.: Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276 17864-17870, 2001.
- 12) Ricci, A., Greco, S., Mariotta, S., Felici, L., Bronzetti, E., Cavazzana, A., Cardillo, G., Amenta, F., Bisetti, A., Barbolini, G.: Neurotrophins and neurotrophin receptors in human lung cancer. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25 : 439-446, 2001.
- 13) Zhu, Z., Friess, H., diMola, F.F., Zimmermann, A., Graber, H.U., Korc, M., Buchler, M.W.: Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 17 : 2419-2428, 1999.
- 14) Miknyoczki, S.J., Lang, D., Huang, L., Klein-Szanto, A.J., Dionne, C.A., Ruggeri, B.A.: Neurotrophins and Trk receptors in human pancreatic ductal adenocarcinoma : expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *Int. J. Cancer* 81 : 417-427, 1999.
- 15) Sakamoto, Y., Kitajima, Y., Edakuni, G., Sasatomi, E., Mori, M., Kitahara, K., Miyazaki, K.: Expression of Trk tyrosine kinase receptor is a biologic marker for cell proliferation and perineural invasion of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* 8 : 477-484, 2001.
- 16) Ehrlich, M.: DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21 : 5400-5413, 2002.
- 17) Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., Herman, J. : A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 61 : 3225-3229, 2001.
- 18) Clark, S. J., Melki, J.: DNA methylation and gene silencing in cancer : which is the guilty party? *Oncogene* 21 : 5380-5387, 2002.
- 19) Indo, Y., Mardy, S., Tsuruta, M., Karim, M.A., Matsuda, I.: Structure and organization of the human TRKA gene encoding a high affinity receptor for nerve growth factor. *Jpn. J. Hum. Genet.* 42: 343-351, 1997.
- 20) Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 89: 1827-1831, 1992.
- 21) Kitazawa, S., Kitazawa, R., Maeda, S.: Identification of methylated cytosine from archival formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Lab. Invest.* 80 : 275-276, 2000.
- 22) Olek, A., Oswald, J., Walter, J.: A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 24 : 5064-5066, 1996.
- 23) Bird, A.P.: CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321: 209-213, 1986.
- 24) Wade, P.A.: Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 23: 1131-1137, 2001.
- 25) Jones, P.A., Laird, P.W.: Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* 21: 163-167, 1999
- 26) Razin, A., Riggs, A.D.: DNA methylation and gene function. *Science* 210 : 604-610, 1980.
- 27) Kitazawa, S., Kitazawa, R., Maeda, S.: Transcriptional regulation of rat cyclin D1 gene by CpG methylation status in promoter region. *J. Biol. Chem.* 274 : 28787-28793, 1999.
- 28) Zhu, W.G., Srinivasan, K., Dai, Z., Duan, W., Druhan, L.J., Ding, H., Yee, L., Villalona-Calero, M.A., Plass, C., Otterson, G.A.: Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21^{cip1} promoter. *Mol. Cell. Biol.* 23 : 4056-4065, 2003.
- 29) Zhang, X.Y., Ehrlich, K.C., Wang, R.Y., Ehrlich, M.: Effect of site-specific DNA methylation and mutagenesis on recognition by

- methylated DNA-binding protein from human placenta, *Nucleic Acids Res.* 14 : 8387-8397, 1986.
- 30) Tulchinsky, E.M., Georgiev, G.P., Lukanidin, E.M.: Novel AP-1 binding site created by DNA-methylation. *Oncogene* 12: 1737-1745, 1996.
- 31) Bird, A.P., Wolffe, A.P.: Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 99 : 451-454, 1999.
- 32) Rubin, H.: The significance of biological heterogeneity. *Cancer Metastasis Rev.* 9 : 1-20, 1990.

Methylation around the AP-1 binding site in the TrkA promoter positively affects TrkA expression during pancreatic cancer progression

Masayo Fujimoto

Division of Molecular Pathology, Department of Biomedical Informatics,
Kobe University Graduate School of Medicine

ABSTRACT: Nerve growth factor and its high affinity receptor TrkA are thought to be involved in the progression of various cancers. This study investigated the mechanism regulating aberrant or increased TrkA expression in various cancer cell lines and during pancreatic cancer progression. Sodium bisulfite mapping revealed that steady-state TrkA expression positively correlated with accumulation of methylated CpG around the AP-1-like site in the 5'-untranslated region. Moreover, deletion of the AP-1-like site increased TrkA promoter activity, indicating that this site functions as a negative regulator of TrkA expression. Electrophoretic mobility shift assay showed that the AP-1-like site was mainly bound by c-Jun homodimers. Binding was blocked by the induction of methylation, indicating that activation of TrkA gene expression by methylation was caused by direct interference of c-Jun binding to the negative regulatory AP-1-like site. Furthermore, the accumulation of methylated CpG, especially around the AP-1-like site, was also observed with increased TrkA immunohistochemical staining in cases of advanced pancreatic adenocarcinoma. Taken together with the fact that the TrkA promoter lacks typical CpG islands, CpG methylation at sites other than the CpG island can play a crucial epigenetic role in the versatility and plasticity of TrkA expression during cancer progression.