



# 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。



【 118 】

氏 名・(本 籍)	藤本 昌代	( 兵庫県 )
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	
学 位 記 番 号	博い第1578号	
学位授与の 要 件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の 日 付	平成16年3月31日	

【 学位論文題目 】

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

審 査 委 員

主 査	教 授	横 崎	宏
	教 授	春 日	雅 人
	教 授	黒 田	嘉 和

## 【緒言】

膵癌は、その浸潤・転移能の為に予後が非常に悪く、中でも神経周囲浸潤を起す率が特に高い。一方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。受容体として高親和性のTrkAと低親和性のp75<sup>NGFR</sup>を持ち、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。NGFと受容体は種々の癌に発現し、癌細胞の移動、成長、生存に関わっているとされる。膵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<sup>NGFR</sup>が末梢神経束に認められたことから、NGF-TrkA経路と神経周囲浸潤の関連性が推定された。一方CpGメチル化は癌進展機構の一つとして重要である。本研究ではTrkA遺伝子の5'側上流領域をエピジェネティカルに解析した。

## 【方法】

### 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 $\alpha$ MEMにて、37°Cの加湿した5%二酸化炭素環境下で培養した。

### 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既報配列の更に上流をゲノムウォーカーキットを用いて伸長し、約1.7kbのクローニングを行った後、PCRによって2種類のDNAフラグメント (AP-1(+):-1637/+83, AP-1(-):-1637/+53) を作成し、pGL3-Basicベクターに組み込んだコンストラクトを得た。

### 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) とpRL-TKベクターとを膵癌、大腸癌、神経芽細胞腫由来の培養細胞に共導入し、6時間後のプロモーター活性をルミノメーターにて測定した。

### RNA抽出及びRT-PCR

膵癌培養細胞、大腸癌培養細胞からRNAを抽出し、逆転写によりcDNAを作製しPCRにて増幅後、電気泳動を行った。

### サザンブロットによるメチル化スクリーニング

膵癌培養細胞、大腸癌培養細胞からDNAを抽出し、Msp I、Hpa II処理後に上記1.7kb DNA (AP-1(+)) をプローブとしてサザンブロット法を行った。

### バイスルファイト・マッピング

アガローススピーズに封入した細胞株DNAを、水酸化ナトリウム、バイスルファイ

ト溶液で処理後中和・洗浄し、そのPCR産物の塩基配列を決定し、CpGメチル化の状態を調べた。

### 5アザデオキシシチジン (5-aza-dC) 処理

指数増加期の細胞 ( $5.3 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ) に1  $\mu$ Mの5-aza-dCを24時間作用させ、120時間後にDNAとRNAを回収、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。

### SssI処理

上で得たコンストラクト (AP-1(+)) をS-アデノシルメチオニン存在下にSssI CpGメチラーゼでメチル化した後、ルシフェラーゼ活性測定を行った。

### ゲルシフトアッセイ

SK-N-SH細胞から核蛋白を抽出しAP-1類似配列を含む二本鎖オリゴヌクレオチドとSssIでメチル化したオリゴヌクレオチドを作成し、5'端を[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATPでラベルした。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、Fral、Fra2に対する各抗体存在下で反応させた後電気泳動を行った。

### 免疫染色

膵管細胞癌標本を用いて、抗NGF (Santa Cruz社)、抗TrkA (Santa Cruz社)、抗p75<sup>NGFR</sup> (Promega社) 抗体にて免疫組織化学を行った。

### マイクロダイセクション

膵癌組織標本よりマイクロダイセクションシステムにて非腫瘍部、腫瘍中心部、神経周囲浸潤部を選択的に採取してDNAを抽出し、バイスルファイト法を行って各々のTrkA遺伝子翻訳開始部位周辺のCpGメチル化を解析した。

## 【結果】

### 定常状態のTrkA mRNA発現とプロモーター活性

外因性に導入した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ず、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。

### メチル化マッピング

サザンブロットではMIAPaCa2、SW480、HT29、SK-N-SHにメチル化を示すバンドを認め、PANC1、COLO320には認めなかった。バイスルファイト・マッピングでも各細胞株のメチル化はサザンブロットと同様の傾向を示した。

### 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、元々メチル化が少ないPANC1ではTrkA mRNAに変化がなかった。

### SssI 処理

SssI 処理後の転写活性は PANC1、MIAPaCa2、HT29 のいずれにおいても上昇が見られた。

### 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 (-)) を用いたルシフェラーゼ活性は SssI 処理後と同様に PANC1、MIAPaCa2、HT29 のいずれにおいても上昇が見られた。

### ゲルシフトアッセイ

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。

### 免疫染色とメチル化マッピング

第 IV 期の膵癌症例 8 例のうち 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発現は弱かった。膵癌各部位からマイクロダイセグ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。

### 【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。コンストラクトの一過性導入によって測定されたプロモーター活性は半定量的 RT-PCR で評価した定常状態での mRNA 発現と相関せず、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。CpG アイランドの基準は満たさないものの、多数の CpG が TrkA 遺伝子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・マッピングでは、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。

通常プロモーターの CpG アイランドでは DNA メチル化による転写抑制が起こることが知られ、メチル化 CpG 結合蛋白の配列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クロマチン凝集、遺伝子抑制が起こる。しかし一方で、転写因子結合部位やその周辺のメチル化により、配列特異的な DNA 結合蛋白や転写因子の DNA 結合能に影響すると報告されてきた。

メチル化の集積が見られた AP-1 類似配列の TrkA 発現における役割を更に検討したところ、AP-1 類似配列を欠いたプロモーターの活性が低下したことから、この部位は転写抑制に働くことが示唆され、またゲルシフトアッセイでは

AP-1 類似配列に結合していた 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 類似配列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制御する可能性が示唆された。

膵癌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、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。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、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、NGF-TrkA 系が他臓器の癌進展にも関与している可能性がある。癌が原発部位から周囲組織に広がる際に、環境に応じて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。

エピジェネティックな遺伝子発現調節機構は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ため、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。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1593号	氏名	藤本 昌代
論文題目	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		
審査委員	主 査 横 崎 宏 副 査 春 日 雅 人 副 査 黒 田 嘉 和		
審査終了日	平成 16 年 2 月 26 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

膵癌はその浸潤・転移能のために予後が非常に悪く、中でも神経周囲浸潤を起こす率が特に高い。神経成長因子(nerve growth factor, NGF)は種々の神経系細胞から分泌され、神経の発達、分化、生存、アストロサイトの分化等に関与するサイトカインである。NGF 受容体としては高親和性 TrkA と低親和性 p75<sup>NGFR</sup> が知られ、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。NGF と受容体は神経由来腫瘍のみならず、膵癌を始めとする様々な癌腫に発現が確認され、膵癌組織では正常に比較して高濃度の NGF と TrkA が検出され、TrkA は膵癌細胞に、NGF と p75<sup>NGFR</sup> は末梢神経線維束に主として発現していることが報告され、NGF-TrkA 経路が膵癌の神経周囲浸潤に関与する可能性が指摘されている。本研究者は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目的で、膵癌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発現との関係について解析した。

検索に用いた培養細胞は膵癌株 (PANC1, MIA PaCa2)、大腸癌株 (COLO320, SW480, HT29)、神経芽細胞腫株 SK-N-SH の 6 株である。膵癌切除組織は 8 例でいずれも臨床病期 IV 期の膵管細胞癌である。TrkA 遺伝子 5'側上流約 1.7 Kb をクローニング後、PCR により 2 種類 (AP-1(+):-1637/+83, AP-1(-):-1637/+53) のフラグメントを作成し pGL3-Basic ベクターに組み込みルシフェラーゼアッセイに使用した。TrkA mRNA 発現は特異的プライマーによる RT-PCR にて解析した。TrkA プロモーターメチル化のスクリーニングにはメチル化感受性・非感受性制限酵素処理後のゲノム DNA に対するサザンブロット法を用い、さらに各細胞株およびマイクロダイセクションにより得られた膵癌組織に関してはバイスルファイト法によるメチル化マッピングを行った。細胞株の脱メチル化には 5 アザデオキシシチジン処理を行い、TrkA 発現状態の変化を解析した。また、SssI CpG メチラーゼ処理した AP-1(+):-1637/+83 コンストラクトを各細胞株に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより TrkA 転写活性の変化を検討した。TrkA 転写開始・翻訳開始部位周囲の AP-1 結合配列での DNA タンパク複合体の解析にはゲルシフトアッセイを用いた。なお、膵癌組織における TrkA、p75<sup>NGFR</sup>、NGF の発現局在解析には各特異抗体を用いた免疫組織化学を施行した。

新たにクローニングした TrkA プロモーター上流配列は 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。培養細胞株定常状態での TrkA mRNA 発現を見ると、SK-N-SH が最も高く、次いで SW480、MIAPaCa2 が高い発現を示したが、HT29、COLO320、PANC1 は低発現であった。一方、TrkA プロモーター (AP-1(+)) の一過性導入によるルシフェラーゼ活性は COLO320 で最も高く、PANC1 では最低値を示し、プロモーター活性と mRNA 発現に解離を認めたことより、TrkA 発現にエピジェネティックな機構が働くことが示唆された。サザンプロット法による TrkA プロモーター領域 CpG 部位のメチル化マッピングでは、MIAPaCa2、SW48、HT29、SK-N-SH にメチル化を示すバンドが認められたが、PANC1、COLO320 には認められなかった。さらに、バイスルファイトマッピングによるメチル化 CpG 数はサザンプロット法の結果と良く関連した。次に、各細胞株を 5 アザデオキシシチジン処理した所、メチル化の多い MIAPaCa2、HT29 では TrkA mRNA は減少したが、メチル化が少ない PANC1 では発現量に変化を認めず、一方、SssI 処理後の転写活性は PANC1、MIAPaCa2、HT29 いずれにおいても上昇した。ゲルシフトアッセイでは、メチル化していない AP-1 類似配列を含むプローブでは主に抗 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る DNA-蛋白複合体を形成したが、プローブのメチル化により DNA-蛋白複合体は形成されなかった。膵癌切除組織の検索では、8 例中 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発現は弱かった。また、膵癌各部位からマイクロダイセクションで得られた DNA のメチル化マッピングを行った所、正常膵から癌中心部、神経周囲浸潤した浸潤先進部に行くに従い、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。

以上、本研究は膵癌の進展における NGF-受容体系の役割を NGF 受容体 TrkA の発現調節機構の面から解析したものであるが、従来殆ど行われなかった TrkA プロモーター領域の AP-1 類似配列周囲非 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新たな知見を得たものとして、価値ある集積と認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。