



High level of ezrin mRNA expression in an osteosarcoma biopsysample with lung metastasis

荻野, 芽子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4046

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004046>

※ 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。



【 1 5 2 】

氏 名・（本 籍） 荻野 芽子 （ 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1850号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

High level of ezrin mRNA expression in an osteosarcoma biopsy
sample with lung metastasis

（肺転移のある骨肉腫症例の生検腫瘍組織においてezrin mRNA
の高発現を認めた）

審 査 委 員

主 査 教 授 西尾 久英

教 授 横崎 宏

教 授 千原 和夫

【緒言】

オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症は尿素サイクル異常症の中で最も多い先天代謝異常症である。OTC 遺伝子は Xp21.1 上にあり、肝臓と小腸粘膜において発現している。遺伝子の全長は 73kb にわたり、蛋白翻訳領域は 1,026 塩基で 10 エクソンより成る。

OTC 欠損症の臨床像は多様である。通常、男性では新生児期に重篤な高アンモニア血症を伴う昏睡で発症するが、遅発例もみられる。一方、変異遺伝子のヘテロ接合の女性は、X 染色体不活化の偏りによって発症することがあるが、症状は軽症男性例に類似している。

現在までに 341 種以上の OTC 遺伝子変異が同定されているが、明らかなホットスポットはみられない。通常、サザンブロット法や、SSCP 法、全 10 エクソンおよび周辺イントロンの塩基配列解析により遺伝子解析が行なわれているが、酵素診断によって OTC 欠損症と診断された症例にいて変異が同定される割合は約 80%に過ぎない。

今回我々は、日本人 OTC 欠損症 5 例（新生児期発症型男児 2 例、症候性女児 2 例、遅発型男児 1 例）の OTC 遺伝子変異解析を行った。従来法である全 10 エクソンおよび周辺イントロンの塩基配列解析により 4 症例の変異を同定したが、他の 1 例では変異がみられなかった。驚くべきことに、肝臓の OTC mRNA の解析により、イントロンの中央部が mRNA に組み込まれていることが明らかとなった。さらに、その周辺のゲノム DNA を解析した結果、イントロン内の点変異により新たなスプライスアクセプターサイトが形成されたことが、その原因であると判明した。

今回報告した 5 症例中 3 症例は新規の遺伝子変異であり、さらに、エクソンよりはなれたイントロン中央部の変異は、OTC 遺伝子において初めての報告である。

【症例および方法】

症 例

症例 1：24 歳男性。日齢 2 に高アンモニア血症($>3000 \mu\text{g/dl}$)を伴う昏睡状態となった。腹膜透析を施行し、高アンモニア血症および臨床症状は改善されたが、重篤な神経学的後遺症を残した。肝生検組織の OTC 酵素活性は正常コントロールのおよそ 1%であり、新生児期発症型の OTC 欠損症と診断した。

症例 2：日齢 1 に痙攣と昏睡のため当院へ入院した男児。高アンモニア血症($>400 \mu\text{g/dl}$)を認めた。腹膜透析により臨床症状は改善したが、重篤な神経学的後遺症を残した。肝生検組織の OTC 酵素活性は測定感度以下であり新生児期発症型の OTC 欠損症と診断した。1 歳時に死亡した。

症例 3：8 歳の女児。発育発達に問題なく成長したが、5 歳時に高アンモニア血症($311 \mu\text{g/dl}$)を伴う意識障害で発症した。高アンモニア血症はブドウ糖とアルギニン輸液により改善した。尿中オロト酸、ウラシルの上昇を認め、血清グルタミンの上昇、アルギニンの低下を認めたことより、OTC 欠損症の症候性女性保因者と診断した。

症例 4：6 歳の女児。発育発達に問題なく成長したが、1 歳時に高アンモニア血症($598 \mu\text{g/dl}$)を伴う意識障害で発症した。高アンモニア血症はブドウ糖輸液により改善した。尿中オロト酸、ウラシルの上昇を認め、血清グルタミンの上昇、アルギニンの低下を認めたことより、OTC 欠損症の症候性女性保因者と診断した。

症例 5：3 歳の男児。発育発達に問題なく成長したが、10 カ月時に高アンモニア血症($194 \mu\text{g/dl}$)を伴う頻回の嘔吐で発症した。尿中オロト酸の上昇を認め、血清グルタミンの上昇、アルギニン、シトルリンの低下を認めたことより、遅発型 OTC 欠損症と診断した。

OTC ゲノム DNA の解析

リンパ球よりゲノム DNA を抽出し、隣接するイントロンの配列を含む全 10 エクソンを PCR 法によって増幅した。増幅産物の塩基配列を直接塩基配列解析法によって解析した。

OTC mRNA の解析

症例 2 および正常対象肝組織より RNA を抽出し、RT-PCR 法によってエクソン 1-6 および 5-10 を増幅した。増幅産物をサブクローニングし、塩基配列を決定した。

【結果】

症例 1、3、4、5 の解析

OTC ゲノム DNA の隣接するイントロン配列を含む全 10 エクソンを PCR 法によって増幅し、塩基配列を解析することによって、症例 1、3、4、5 において以下の変異を同定した。

症例 1 (新生児発症型男児)：エクソン 6 内のナンセンス変異(c.578G>A) (p.193W>X)。

症例 3 (症候性女性保因者)：エクソン 5 内のナンセンス変異のヘテロ接合(c.421C>C/T) (p.141R>R/X)。

症例 4 (症候性女性保因者)：イントロン 4 のスプライスドナーサイトの点変異のヘテロ接合(c.386+1G>G/C)。

症例 5 (遅発型男児): エクソン 5 内のミスセンス変異(c.515T>A)(p.172I>N)。

症例 2 の解析

ゲノム DNA の解析によって症例 2 では、全 10 エクソンおよび隣接するイントロンの塩基配列に変異はみられなかった。そこで、mRNA を解析するために肝臓より RNA を抽出し、エクソン 1-6 および 5-10 を RT-PCR 法により増幅した。その結果、いずれの増幅においても正常対象より大きいサイズのバンドが明瞭に増幅され、正常サイズのバンドはわずかに認められた。大きいサイズのバンドの塩基配列を解析したところ、エクソン 5 と 6 の間に 135 塩基の挿入が認められた。この配列を解析したところ、イントロン 5 内の塩基配列と一致し、その配列はエクソン 5 から 267 塩基下流、エクソン 6 から 1789 塩基上流に位置していた。この 135 塩基の挿入配列の 3' 端および 5' 端の塩基配列を検討した。Gene Bank に登録されている塩基配列では 3' 端はブライズドナーサイトで保存されている GT につながり Shapio スコアは 0.90 であった。しかし、5' 端ではスプライスアクセプターサイトで保存されている AG 配列はみられず、Shapio スコアは 0.74 と低値であった。

症例 2 においてこの 135 塩基の配列が mRNA に組み込まれた機序を明らかにするために、挿入配列周辺のゲノム DNA の塩基配列を解析した。その結果、135 塩基の挿入配列の 2 塩基上流の塩基が G から A に変異していた。この変異により挿入配列の上流の 2 塩基が GG からスプライスアクセプターサイトで保存されている AG へと変換し、Shapio のスコアは 0.74 から 0.91 へと上昇した。

以上の結果より、イントロン内の点変異によりスプライスアクセプターサイトが形成され、潜在性スプライズドナーサイトとともに働くことにより、イントロン内の配列が mRNA に組み込まれたことが明らかになった。135 塩基挿入配列には停止コドンがあるため、OTC 蛋白の産生はみられないと考えられる。

【考察】

今回の解析において、2 例のナンセンス変異、1 例のミスセンス変異、2 例のスプライスサイトの変異を認め、そのうちの 1 例はイントロン中央部の変異によってスプライスアクセプターサイトを形成するというものであった。さらに、これら 5 例のうち 3 例は新規の変異であった。

症例 1 および症例 3 でみられたナンセンス変異(c.578G>A および c.421C>T)は既報のもので、新生児期発症型として報告されている。今回の検討においても症例 1 は新生児期発症型であった。一方、症例 3 は女児であり X 染色体不活化の偏りによって発症したものと考えられる。そのため遅発型の表現型を呈していた。

症例 4 はスプライズドナーサイト変異(c.386+1G>C)のヘテロ接合女児例であり、この変異は新規の変異である。症例 4 も女児例であり、X 染色体不活化の偏りによって遅発型として発症したものと考えられる。

症例 5 は新規のミスセンス変異(c.515T>A)を認めた遅発型男児例で、172 番目のアミノ酸がイソロイシンからアスパラギンに変化していた。以下の点から、このミスセンス変異が OTC 欠損症の責任変異であると考えられる。①172 番目のイソロイシンからアスパラギンへの変異の報告は無いが、同部位がフェニルアラニンへ変異した女児例、メチオニンへと変異した新生児期発症例の報告がある。②このイソロイシンは OTC モノマーの中心部分であるアルファヘリックスの一部で、カルバミルリン酸結合に重要な領域である。③同部のアミノ酸はヒトからラットまで種を超えて保存がされている。④この変異(c.515T>A)は多型としての報告はなく、50 以上の正常対象においても認めなかった。

今回我々は、症例 2 において、OTC 遺伝子では世界で初めてイントロン中央部の変異を同定した。この変異によりスプライスアクセプターサイトが形成され、潜在性スプライズドナーサイトとともに働くことにより、イントロン内の配列がエクソンとして mRNA に組み込まれるようになったことが明らかとなった。通常、疾患の原因となる遺伝子変異のおよそ 15%がスプライシング変異と報告されているが、これらの多くはスプライスサイト周辺の変異によるものである。本症例のようにイントロン中央部の変異によりスプライスサイトが形成され、新たなエクソンが作られることは稀であり、他の遺伝子においてわずかに報告されているのみである。

本研究において、5 症例の OTC 欠損症の遺伝子変異を同定した。3 症例に新規の変異を認め、この内の 1 例はイントロン中央部の変異であった。ゲノム DNA と mRNA を調べることにより、従来同定できなかった OTC 遺伝子変異を見出すことが可能となる。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 1852 号	氏 名	荻野 芽子
論文題目 Title of Dissertation	High level of ezrin mRNA expression in an osteosarcoma biopsy sample with lung metastasis 肺転移のある骨肉腫症例の生検腫瘍組織において ezrin mRNA の高発現を認めた		
審査委員 Examiner	主 査 西尾久英 Chief Examiner 副 査 横 崎 宏 Vice-examiner 副 査 千原和夫 Vice-examiner		
審査終了日	平成 19 年 4 月 18 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【緒言】

骨肉腫は若年発症の悪性骨腫瘍の中で最も多く、その予後は化学療法と外科的手術によって飛躍的に改善したが、再発や転移のある症例の5年生存率は未だに低い。現状では、手術前の化学療法に対する腫瘍組織壊死率が90%以上で5年生存率は70%以上とされている。しかしながら骨肉腫の予後を反映する分子学的なマーカーは未だ見出されていない。

近年、細胞骨格を担う蛋白 ezrin の腫瘍転移における働きが注目されている。ezrin は播種性の骨肉腫症例で蛍光組織染色により強く染色されたことから、骨肉腫の転移に関わる重要な予後因子と考えられている。しかしこれらの解析は、蛍光組織染色によるものであり半定量的に ezrin 蛋白を評価しているのみである。従って ezrin mRNA 発現を real-time 定量 PCR 法により定量的に解析することは、臨床的にも非常に意味がある。しかし骨肉腫の生検組織での ezrin mRNA 発現の報告は未だない。

一方、glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)は解糖系における働きのみならず、アポトーシスにおける関与や、種々の腫瘍での高発現が報告されている。しかし骨肉腫の生検組織における GAPDH mRNA 発現については未だ検討されていない。そこで今回申請者らは骨肉腫の4症例を対象に real-time 定量 PCR 法により ezrin と GAPDH の mRNA 発現を定量的に解析し、その臨床像と発現量について検討した。また、解糖系で GAPDH の下流に位置する酵素である Enolase-1(Eno-1)、ezrin と相補的に結合してアポトーシスを担う Fas についても同様に検討した。その結果、肺転移のある症例の生検組織では、転移のない他の症例と比較して、約5倍の ezrin mRNA 発現量を認めた。一方 GAPDH mRNA 発現量と今回検討した骨肉腫症例の悪性度に関係は認めなかった。

今回申請者らは、肺転移のある骨肉腫症例の生検組織において、ezrin mRNA が高発現していることを初めて報告した。

【対象および方法】

対象

当院にて2004年4月から2006年3月までに生検を行った骨肉腫4症例を対象とした。初診時より全ての症例をフォローしており、全例本研究に参加することの承諾を得た。

骨肉腫凍結標本は、全例診断のための初回生検時に得た。症例1は化学療法が著効したが、症例2は化学療法に抵抗性で、大量化学療法によって寛解を得た。症例1と2の腫瘍組織壊死率は、それぞれ90%、70%であった。症例1、2、3は局所、遠隔転移ともに認めていなかった。一方、症例4は、大腿骨発症で初発時より多発肺転移を認め、化学療法に抵抗性であった。

骨肉腫培養細胞における検討は、当施設で樹立した KTHOS 細胞及び、American Type Culture Collection より購入した MG-63、KHOS の3つのヒト骨肉腫培養細胞株を用いて行った。全ての細胞は、10%牛胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium 中で培養した。

Real-Time 定量 PCR 解析

総 RNA の抽出は、Isogen solution によって行った。逆転写反応は、1μg の RNA を鋳型として行い、DNA 混入の影響がないことを確認するために、RT-negative control として逆転写酵素を含まないチューブを同時に作製し同様の反応を行った。

総 RNA より逆転写反応によって得られた産物を、ezrin、GAPDH、Fas、Eno-1 の各遺伝子に特異的なプライマーとプローブのセット、及び Taq Man Universal PCR Master Mix を用いて 7500 Fast Real-Time PCR system によって解析した。ゲノム DNA 混入の

影響を除くために、ezrin、Fas、Eno-1 のプライマーはイントロンを挟むようにデザインされている。18S rRNA と GAPDH の系では DNA 混入の影響が無いことを確認するために、前述の RT-negative control との比較を行った。cDNA の増幅は、95 度 20 秒の後に、95 度 3 秒、62 度 30 秒を 40 サイクル行った。内在コントロールとして、通常 GAPDH や β アクチンのようなハウスキーピング遺伝子が用いられているが、骨腫瘍細胞系ではこれらの因子は変動しやすいことが知られており、18S rRNA が他に比べて内在コントロールとして優れていると報告されていることから、18s rRNA を内在コントロールとして用いた。各サンプルは、2 チューブで反応を行い、結果は 3 回の実験の平均で表した。

統計解析

生検組織と培養細胞における GAPDH と Eno-1 の mRNA 発現量は、Mann-Whitney U test により解析、p 値が 0.05 未満を有意とした。GAPDH と Eno-1 の mRNA 発現量の相関関係は、Pearson correlation coefficient により解析、p 値が 0.01 未満を有意とした。

【結果】

今回行った 18S rRNA 及び GAPDH における定量 PCR 法においてゲノム DNA の混入の影響がないことを確認するために、逆転写酵素を含む系と含まない系で比較を行った。その結果、両者の増幅の間には 10 サイクル以上の差があり、このことから定量 PCR におけるゲノム DNA 混入の影響は除外された。

GAPDH はアポトーシスにおいて重要な働きを担い、GAPDH mRNA 発現量と腫瘍の悪性度は相関していることが報告されている。そこで今回申請者らの 4 症例の生検組織を検討したが、悪性度との相関は認めなかった。さらに GAPDH mRNA 発現は、生検組織より培養細胞のほうが高かった。この GAPDH mRNA 発現量の差の原因を調べるために、解糖系で GAPDH の下流に位置する酵素 Eno-1 について調べた。その結果、GAPDH と Eno-1 mRNA 発現量には、明らかな相関関係を認めた (Pearson correlation coefficient $r=0.939, p<0.01$)。よって GAPDH mRNA 発現は、悪性度よりもむしろ高い糖代謝活性を反映しており、培養細胞における GAPDH 高発現は、糖代謝がより活性化しているためと考えられた。

次に、生検組織における ezrin mRNA 発現について解析を行った。その結果、興味深いことに、肺転移のある症例 4 は、転移のない他の症例と比較して、約 5 倍の ezrin mRNA 発現量を認め、転移のある骨肉腫で ezrin はより発現していると考えられた。また ezrin mRNA 発現量を生検組織の 4 症例と 3 つの培養細胞とで比較すると、培養細胞のほうが高かった。

Fas 関連アポトーシスは、ezrin と Fas が関与していることが知られている。そこで、Fas mRNA 発現量についても生検組織で検討した。その結果、Fas mRNA 発現量と悪性度に相関を認めなかったことより、本腫瘍では ezrin は Fas と独立して機能している可能性が考えられた。

今回骨肉腫細胞を分子生物学的に検討することにより、肺転移のある症例で ezrin mRNA 発現が高いことが明らかとなった。

【考察】

GAPDH はハウスキーピング遺伝子であり、通常内在コントロールに使用され、また肺癌、膵癌、子宮頸癌等での高発現が報告されているが、骨肉腫での GAPDH 発現を検討した報告はない。今回申請者らの報告は、骨肉腫の GAPDH 発現について検討した初めての

報告である。今回の検討では、生検組織間で悪性度との関連はみられず、生検組織と培養細胞の比較において、培養細胞における GAPDH mRNA の高発現を認めた。さらに GAPDH mRNA 発現量はその下流に位置する Eno-1 と明らかな相関関係を認めた。このことより GAPDH mRNA 発現は糖代謝活性を反映していると考えられた。GAPDH mRNA が、生検組織より培養細胞に著明に発現していたことは、血漿より培地の糖レベルが高値であることが関係しているかもしれない。

申請者らは、real-time 定量 PCR 法により生検組織の ezrin mRNA 発現を検討した。症例数が少ないので、統計学的な検討は行っていないが、肺転移のある症例では、転移のない他の症例と比較して、約 5 倍の ezrin mRNA 発現を認めた。従来の報告では、蛍光組織染色により半定量的に ezrin 蛋白を評価しているのみであり、今回申請者らは、real-time 定量 PCR 法 により mRNA 発現をより定量的に解析することができた。

さらに申請者らの研究で ezrin mRNA 発現量は生検組織より培養細胞で高かったが、これは培養細胞の細胞成長速度と関係があるのかもしれない。

ezrin と Fas は相補的に結合して、Fas 関連アポトーシスを担っている。骨肉腫培養細胞の実験によると Fas 発現は、悪性度と相反すると報告されている。しかし申請者らの研究では Fas mRNA 発現は、悪性度と相反していなかった。何らかの他の因子が関与している可能性がある。

ezrin は、悪性骨腫瘍の転移や、転移性の細胞表面蛋白のシグナル伝達を担っている。また星細胞腫、悪性黒色腫、肝細胞癌等、種々の癌において、ezrin の高発現と悪性度が相関すると報告されている。一方で重症の卵巣癌では、この関係は相反するとの報告もある。Khanna らは、小児骨肉腫症例の培養細胞の ezrin 免疫組織染色で、低発現群より高発現群のほうが無病率は低かったと報告している。また Weng らは、悪性軟部肉腫で ezrin 免疫染色を行い、ezrin は悪性度を示すマーカーになると言っている。しかし従来の報告は、ezrin 蛋白を半定量的に評価したものにすぎない。今回申請者らの結果は、従来の報告と合致するものであり、さらに転移のある骨肉腫症例で ezrin mRNA が高発現していることを定量的に評価したものである。

今回、転移のある骨肉腫症例の生検組織において、ezrin mRNA が高発現をしていることを報告した。小児の骨肉腫症例において ezrin mRNA の定量は、転移ポテンシャルを知るのに有用な方法であることを示すものである。

本研究は、骨肉腫の悪性度・転移性を決定する因子を研究したものであるが、従来行われなかった GAPDH、ezrin、Fas 遺伝子転写産物量について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。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。