

|          |  |
|----------|--|
| 氏名       | まえだ よしこ<br>前田佳子  |
| 学位の種類    | 博士(医学)   |
| 学位記番号    | 甲第504号   |
| 学位授与年月日  | 平成17年 3月11日  |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第1項該当   |
| 学位論文題目   | ヒト肝癌細胞における p16 遺伝子プロモーター領域のメチル化：<br>Rb 蛋白リン酸化と細胞増殖への影響 |
| 学位論文審査委員 | (主査) 大浜 栄作<br>(副査) 汐田 剛史 村脇 義和                         |

## 学位論文の内容の要旨

肝細胞癌の発症には多くの因子が関与しているが、このうち癌遺伝子の増幅や過剰発現、癌抑制遺伝子の欠失や変異などが重要とされている。癌抑制遺伝子の1つである p16 は、細胞周期と関係しており、サイクリン D のパートナーである cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) または CDK6 に直接結合し、サイクリン D による retinoblastoma (Rb) 蛋白のリン酸化を阻害することにより細胞周期を負に調節している。癌における p16 遺伝子の不活性化には、homozygous deletion や塩基置換などのジェネティックな異常とともに、メチル化による p16 遺伝子産物の発現低下が知られている。本研究では、肝癌細胞株を用いて p16 遺伝子のメチル化の有無を検討するとともに、その意義を明らかにするために、Rb 蛋白のリン酸化、細胞増殖への影響を検討した。加えて、ジェネティックな変化の有無についても検討した。

## 方法

6 種類のヒト肝癌細胞株 (HepG2、HuH6、Hep3B、HuH7、HLF、PLC/PRF/5) を用い、通常培養と脱メチル化剤 5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza-CdR) 添加培養後に DNA、RNA、蛋白を採取した。p16 のメチル化検出は DNA modification kit を用い、sodium bisulfite 処理にてシトシンをウラシルに化学修飾し、修飾前後で CpG island 領域について methylation-specific PCR (MSP) および unmethylation-specific PCR により行った。抗 p16 抗体、抗 Rb 蛋白抗体、抗リン酸化 Rb 蛋白抗体を用いたウエスタンブロットを行った。細胞増殖は MMT(dimethylthiazol diphenyltetrazolium) アッセイで行った。p16 の exon 1 $\alpha$ 、exon 2 について multiplex PCR にて homozygous deletion の有無、シーケンス反応にて塩基配列を解析した。

## 結 果

MSP では HuH7、HLF でメチル化が認められたが、HepG2、HuH6、Hep3B、PLC/PRF/5 ではメチル化は認めなかった。p16mRNA 発現は、5-Aza-CdR 非添加時には HepG2、Hep3B、HLF、PLC/PRF/5 で mRNA 発現を認めた。HuH6、HuH7 では 5-Aza-CdR 非添加で転写産物を認めなかったが、5-Aza-CdR 添加により発現が確認された。5-Aza-CdR 添加後の p16 蛋白発現は HuH6 と HLF で明らかに増加しており、HuH7 でもわずかに増強していた。Rb 蛋白のセリン残基のリン酸化を検討すると、5-Aza-CdR 添加後に HuH6、HuH7、PLC/PRF/5 で Rb 蛋白リン酸化の減少を認めた。HuH7 を用いて細胞増殖を MMT アッセイで検討すると、0.1、0.5、1  $\mu$ M の 5-Aza-CdR 添加培養で 5 日後以降に有意に細胞増殖が抑制された。すべての肝癌細胞株で homozygous deletion は exon 1  $\alpha$ 、exon 2 ともに認めなかった。塩基配列の検討では exon 1  $\alpha$  には塩基の変化は認めず、exon 2 では HuH6 を除く HepG2、Hep3B、HuH7、HLF、PLC/PRF/5 のすべての細胞に7つの塩基変化が認められたが、アミノ酸変化は無かった。一方 HuH6 では exon 2 に2つの塩基変化があり、コドン 58 ではアミノ酸変化は無かったが、コドン 70 ではプロリンがセリンに変化していた。

## 考 察

メチル化に関しては HepG2、HuH6、HuH7、HLF で検出され、HuH7 では p16 のプロモーター領域のメチル化は p16 蛋白発現、Rb 蛋白のリン酸化、細胞増殖に影響していた。これらの結果から、肝癌細胞株では p16 遺伝子プロモーター領域のメチル化は p16 蛋白の機能低下を生じ、Rb 蛋白のリン酸化を介して癌細胞の増殖過程に寄与していると考えられる。

HuH6 では exon 2 に2つの塩基変化が認められたが、5-Aza-CdR 添加で p16 の mRNA と蛋白発現が増強し、Rb 蛋白のリン酸化が減少していることから、HuH6 の p16 発現に関してこの塩基配列の変化は重要ではないと考えられた。

## 結 論

肝癌細胞における p16 遺伝子の mRNA と蛋白発現低下は遺伝子異常によるものではなく、プロモーター領域のメチル化が重要と推察された。また、HuH6、HuH7 では p16 遺伝子のメチル化により Rb 蛋白のリン酸化が影響を受け、肝細胞癌の増殖、進展に関与していると推測された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

癌抑制遺伝子 p16 は CDK/サイクリン複合体を阻害し Rb 蛋白のリン酸化を抑制することにより、細胞周期を負に調節している。本研究ではヒト肝癌細胞株での p16 遺伝子のメチル化により mRNA、蛋白発現が消失あるいは低下している事を、脱メチル化剤の添加、塩基配列の解析、

homozygous deletion の検討で確認し、さらに p16 遺伝子のメチル化による発現異常により Rb 蛋白がリン酸化され、細胞増殖を促進することを明らかにした。本研究は肝癌細胞の増殖において p16 遺伝子のメチル化が重要な役割を演じていることを明らかにしたものであり、今後の臨床応用の観点からも明らかに学術水準を高めたものと認める。