

Title	Identification of a New Breast Cancer-related Gene by Restriction Landmark Genomic Scanning
Sub Title	ゲノム二次元電気泳動法による新たな乳癌関連遺伝子の同定
Author	麻賀, 創太
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.3 (2006. 9) ,p.9-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060902-0009

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Identification of a New Breast Cancer-related Gene by Restriction Landmark Genomic Scanning

(ゲノム二次元電気泳動法による新たな乳癌関連遺伝子の同定)

麻 賀 創 太

内容の要旨

ゲノム二次元電気泳動法 (以下RLGS) はゲノムDNAを制限酵素で切断し電気泳動を行うことで、DNA断片を平面上にスポットとして描出する手技である。RLGSの利点として、第一に、ゲノム検索の効率がよいという点があり、第二にスポットの変化が様々な遺伝子変化を反映し、特に制限酵素Not I を使用すれば、遺伝子のメチル化を捉えられるという点がある。今回は乳癌および正常乳腺組織を対象にRLGSを行い、その分析により新たな乳癌関連遺伝子を同定したので報告する。

まず、RLGSには14例の乳癌切除検体から得られた癌組織と正常乳腺組織を用いた。続いて遺伝子発現を確認するために行ったRT-PCRには、6種類のヒト乳癌細胞株、MCF-7、MDA-MB-435、T-47D、MDA-MB-231、SK-BR-3、BT-20と9例の乳癌組織を用いた。RLGSでは、まずゲノムDNAをNot I で処理後5'-端を³²Pで標識し、Puv II 処理を行い、第1回目の電気泳動を行った。終了後Pst I 処理を行い、平面状のゲルで2回目の電気泳動を施行し、オートラジオグラフィでスポットを描出した。癌組織と正常組織のスポット変化を目視で分析し、特徴的な変化のあるスポットにつきNot I トラッパーを用いてクローニングし塩基配列を同定した。Webで遺伝子領域を検索、発現をRT-PCRで確認した。

RLGSの結果、特徴的な変化を認めたスポットのうち2個に注目し、スポットA、Bと命名した。スポットAは4例の癌組織でのみ認められた。スポットBはすべての癌組織ならびに正常乳腺で認められたが、4例の癌組織では濃いスポットとなった。クローニングの結果、スポットAはvoltage-dependent calcium channel $\alpha 1H$ subunit gene (CACNA1H) の領域に98%の相同性が、スポットBは17q12領域、Grb7 gene の近傍に98%の相同性が認められた。RT-PCRの結果、3種のヒト乳癌細胞株と6例の乳癌組織でCACNA1Hの発現が確認された。

メチル化によるRLGSのスポット変化では、その濃度差が周囲の2倍以下となり、遺伝子増幅では一般にそれ以上となる。スポットAの濃度は他とほぼ等しく、CACNA1H遺伝子のメチル化を反映していると推測される。CACNA1Hのメチル化は成人T細胞白血病で報告がある。一方スポットBは著明に濃度が高く、遺伝子増幅を表現していると推測される。17q12領域にはerbB2遺伝子が存在し、乳癌でこの遺伝子の増幅が認められるとき周辺遺伝子も同時に増幅することが知られており、スポットBの領域もここに含まれる。

今回乳癌におけるCACNA1Hの発現が確認された。甲状腺髄様癌、消化管原発神経内分泌腫瘍、網膜芽細胞腫でこの遺伝子の発現が確認されているが、乳癌ではSage tagの確認がされているのみである。なおこの遺伝子の機能については今後更なる検討が必要である。

RLGSにより、乳癌においてCACNA1Hと17q12領域の変化が確認された。前者はメチル化による遺伝子発現が示唆され、後者は遺伝子の増幅が示唆された。続いてRT-PCRによりCACNA1Hの乳癌における発現が確認された。

論文審査の要旨

乳癌においては、これまでに様々な遺伝子変化が報告され、特定の遺伝子をターゲットとした治療法もすでに開発され始めているが、なお未知とされる部分も大きい。本研究では、まずヒト乳癌組織と同一患者の正常乳腺組織を用いてゲノム二次元電気泳動法 (RLGS) を行い、そこから得られるprofile上のスポット変化を検索し、変化を認めるスポットのクローニングを行うことで、乳癌における遺伝子変化について検討を行った。クローニングの結果、Voltage-dependent calcium channel $\alpha 1H$ subunit gene (CACNA1H) とGrb7近傍の17q12領域に一致したため、この結果をもとにCACNA1Hの発現をRT-PCR法で検討し、ヒト乳癌細胞株と乳癌組織の両方で発現を確認した。

審査では、まずRLGSにおけるスポット変化がいかなる遺伝子変化を反映しているかについての質問がなされた。RLGSにおいて制限酵素Not I断片を標識していることから、癌組織でスポットの出現を認めるCACNA1Hでは脱メチル化が、スポットの濃度上昇を認める17q12領域では増幅が示唆されると回答されたが、脱メチル化の確認についてはなお不十分な点があると指摘された。次に、CACNA1Hの発現が乳癌において果たしている意義について質問がなされた。CACNA1Hは神経細胞において発現し、神経伝達物質の分泌に関与しているが、乳癌において発現しているという報告がこれまでにないこと、Ca channel blockerであるベラパミルによってMCF-7の増殖抑制が認められたとの報告はあるが、CACNA1Hの関与については不明であるとの回答がなされた。さらに、CACNA1Hの発現と患者背景との間に何らかの相関があるか否かについて質問がなされた。これについては、RLGSでスポットの出現を認めた症例とRT-PCRでCACNA1Hの発現を認めた細胞株はいずれもER陽性であったが、CACNA1Hの発現を認めた乳癌組織の中にER陰性のものが含まれており、ERとの十分な相関性は確認できなかったと回答された。しかし、確率的にはER陽性でCACNA1Hの発現が多く認められており、症例の蓄積により有意差が出る可能性があるかと助言された。今回の研究では2つのスポットしか検討していない点について質問がなされたが、これに対しては、さらにいくつかの変化を認めるスポットについても検討したが、十分な結果が得られなかったこと、理由は不明であるが肝細胞癌などと比較し乳癌ではスポット変化に乏しいことが挙げられると回答された。この回答に対し、乳癌でスポット変化が乏しい理由として、乳癌においては、肉眼的に癌組織と考えられる部分であっても、間質などの正常部分の混入が多いことが挙げられるとの指摘がなされた。

以上のように、本研究ではなお検討すべき課題を残しているものの、乳癌においてこれまで未知であったCACNA1Hの発現が初めて確認されたという点において、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹

病理学 坂元 享宇 分子生物学 清水 信義

先端医科学 河上 裕

学力確認担当者: 池田 康夫、坂元 享宇

審査委員長: 坂元 享宇

試問日: 平成18年6月15日