

氏名	加藤 高晴
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 443 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	PSD 遺伝子の異常メチル化に伴う Rac1 の不活化と潰瘍性大腸炎関連大腸癌の癌化についての検討
論文審査委員	(委員長) 教授 山本 博 徳 (委員) 教授 吉田 行 雄 准教授 富 永 薫

論文内容の要旨

1 研究目的

潰瘍性大腸炎は、原因不明の非特異性炎症性腸疾患であり罹患者数は年々増加している。罹病期間の長期化とともに大腸癌の発生率が上昇する事が広く知られており、早期発見が重要な課題となる。潰瘍性大腸炎における発癌には、慢性肝炎やヘリコバクターピロリ胃炎と同様に慢性炎症の関与が示唆されている。慢性炎症に伴う発癌過程においては、癌部のみならず非癌部においても DNA のメチル化異常が観察されており、癌化の背景に遺伝子修飾異常が強く関与していると考えられる。我々はこれまで Methylation sensitive amplified fragment length polymorphism (MS-AFLP) 法を用いて DNA メチル化異常の網羅的検索を行ってきた。MS-AFLP 法とはゲノム全域の 9,654 か所に分布する Not1 領域のメチル化を包括的に評価する方法で、ゲノム中のメチル化の異常を網羅的に検索する事ができる。この手法により潰瘍性大腸炎関連大腸癌患者の癌部において高度にメチル化している 23 遺伝子を同定した。そのひとつである PSD (Pleckstrin and Sec7 domain-containing) 遺伝子は G 蛋白質を活性化させる Guanine nucleotide exchange factor (GEF) である。GEF は各種発癌との関与が報告されており、我々はこの PSD 遺伝子に注目してきた。これまでの検討から PSD 遺伝子のメチル化の程度は潰瘍性大腸炎の発癌過程において段階的に上昇しており、アポトーシスの誘導が阻害されている事が示唆された。PSD 遺伝子は G 蛋白質の一種である Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate1) を活性化させる事が報告されている。Rac1 は各種ストレスに対してアポトーシスの誘導や、炎症刺激により好中球遊走能獲得や活性酸素種の産生といった様々な免疫応答を司る事が報告されている。これらの機序から PSD 遺伝子のメチル化異常は Rac1 の不活化を介して発癌に関与している事が示唆される。本研究目的を、メチル化による PSD 遺伝子の不活化が Rac1 の働きに及ぼす影響を検討し、PSD 遺伝子の異常メチル化を介する潰瘍性大腸炎の発癌のメカニズムを明らかにする事とした。

2 研究方法

大腸粘膜の代替として正常ヒト皮膚線維芽細胞株 (normal human dermal fibroblasts; NHDF) を、好中球の培養細胞系モデルとして知られているヒト前骨髄性白血病由来細胞株

(human promyelocytic leukemia; HL-60)を用い、siRNAの導入によりPSD遺伝子を抑制し機能解析を行った。具体的には上皮成長因子(epidermal growth factor; EGF)刺激によるRac1蛋白質の活性化およびF-アクチンの細胞膜への集積の程度をPSD遺伝子の発現の有無で比較した。F-アクチンは細胞骨格を構成するアクチンフィラメントの一種であり、Rac1の下流に位置し活性化により細胞膜へ集積し細胞膜を波動化させ、腸管上皮細胞からのサイトカイン放出機構であるエキソサイトーシスを調節している。また潰瘍性大腸炎の臨床モデルとしてNHDFとHL-60の共培養実験において、リポ多糖(Lipopolysaccharide; LPS)刺激による活性酸素種の産生およびアポトーシスの誘導をNHDFのPSD遺伝子の発現の有無で比較した。LPSはグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分(エンドトキシン)であり広く生物系の基礎研究で炎症性刺激として多用されている。さらにmigration assayを行い、NHDFのPSD遺伝子の発現の有無でHL-60の遊走能を比較した。また臨床症例における検討として、6例の潰瘍性大腸炎関連大腸癌患者の癌部および非癌部組織と15例の潰瘍性大腸炎非癌患者の直腸組織標本を用いて、PSD遺伝子のメチル化の有無による細胞内のF-アクチンの発現、好中球の浸潤程度の違いを免疫組織染色法により比較検討した。統計解析はスチューデントt検定等をパラメトリック検定に用い、カイ2乗、フィッシャーの正確確立検定、マン・ホイットニー・ウィルコクソン検定等をノンパラメトリック解析に用いた。

3 研究成果

siRNAの導入によりPSD遺伝子を抑制すると、NHDF細胞株をEGFで刺激した際のRac1の活性化とF-アクチンの細胞膜への集積が抑制される事が確認された(F-アクチン, siCont群; $42.97 \pm 8.22\%$ vs. siPSD群; $14.83 \pm 3.93\%$, $P=0.0366$)。またNHDFのPSD遺伝子を抑制すると、LPS投与での刺激による活性酸素種の産生(siCont群; 16.67 ± 3.06 vs. siPSD群; 2.67 ± 10.58 , $P=0.0013$)の阻害とカスパーゼの活性化の阻害(siCont群; 34.67 ± 2.51 vs. siPSD群; 6.00 ± 2.65 , $P=0.0002$)が共に観察された。さらにはNHDFのPSD遺伝子の抑制で、LPS刺激によるHL-60の遊走も有意に阻害された(siCont群; 2.333 ± 0.471 vs. siPSD群; 8.0 ± 0.816 , $P=0.0136$)。組織標本においては、PSD遺伝子の異常メチル化群では非メチル化群に比べF-アクチンの発現が有意に低下し(メチル化群; 0.69 ± 0.86 vs 非メチル化群; 1.57 ± 0.51 , $p = 0.0031$)好中球の浸潤程度も有意に低下していた(メチル化群; 0.51 ± 0.55 vs 非メチル化群; 1.01 ± 0.55 , $p = 0.0166$)。

4 考察

本研究では、潰瘍性大腸炎の大腸粘膜におけるPSD遺伝子の異常メチル化が、Rac1を介する免疫応答を破綻させ好中球遊走やアポトーシス機構を阻害する事で潰瘍性大腸炎の癌化に関与している事が示唆された。今回検討した症例に関しては、担癌患者では非担癌患者と比較して罹病期間が有意に長いため、PSD遺伝子の異常メチル化は、発癌の誘因ではなく、長い期間炎症に暴露された結果とも考えられる。しかし、非メチル化群とメチル化群で罹病期間を比較してみると有意な差はなく(非メチル化; 10.042 ± 1.761 年 vs メチル化群; 9.944 ± 2.45 年, $p=0.9739$)、罹病期間との相関は認められなかった。今回の検討では症例数も決して多く無く、そのため潰瘍性大腸炎の病型や検体採取時の活動性を考慮した検討を行うまでには至らなかった。さらには標本採取の部位も限定的であり今後症例を重ねて検討す

る必要がある。今回の検討範囲内においては、PSD 遺伝子の異常メチル化が潰瘍性大腸炎の癌化に関与している事が示唆された。

5 結論

潰瘍性大腸炎の発癌過程における PSD 遺伝子の異常メチル化の意義を、Rac1 の不活化を介するメカニズムから検討した。潰瘍性大腸炎の大腸粘膜に PSD 遺伝子の異常メチル化が起きると PSD 遺伝子の発現が低下する。これに伴い細胞膜の波動化が抑制され、PSD 遺伝子の下流に存在する Rac1 の活性が阻害される。その結果、Rac1 を介する免疫応答、好中球遊走や آپトーシス機構が破綻し潰瘍性大腸炎の発癌に深く関与している事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

審査結果のコメントに従った修正が適切になされ、学位に値する論文として仕上がっている。PSD 遺伝子のメチル化が潰瘍性大腸炎患者の発癌を誘導する原因的異常であるということをも本論文にまとめられた今回の加藤氏による研究から断定的に結論付けることはできないが、加藤氏自身もその点に関しても十分に考察しており、今回の研究結果は限定的な結果であると述べている。

臨床的な疑問に完全に答えを出す結果ではなくとも PSD 遺伝子のメチル化と潰瘍性大腸炎患者における発癌に関連した新たな知見をしめした新規性のある研究であり、その研究方法、結果も十分信頼性のあるものと判断できる。

よって加藤氏の本研究結果を学位論文として審議し、合格の判定とする。

最終試験の結果の要旨

研究結果の報告において適切なまとめが出来ており、説明も明確になされていた。審査委員の質問に対しても適切に答えられ、十分な知識と考察力を有していると判断された。

審査委員会における審議において指摘されたコメントに関しても十分な理解の元、適切な修正を加えることが出来ていた。

以上のことを踏まえ、加藤 高晴の最終試験の結果を合格と判定する。