

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金—中国人研究者・技術者招聘—報告書

2009年 2月 15日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った中国人研究者・技術者招聘について報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 村田 真理子



所属機関名： 三重大学大学院

所属部署： 医学系研究科 職名： 教授

〒 514-8507
所在地： 津市江戸橋2-174

電話： 059-231-5011 内線： _____

1. 助成金額： 700,000 円

2. 研究テーマ

Epstein-Barrウイルス感染上咽頭癌発症におけるDNAメチル化と酸化ニトロ化ストレスの役割解明

3. 成果の概要 (100字程度)

ヒト上咽頭癌由来培養細胞を用いて、メチル化特異的PCR法を用いてメチル化の変化を検討した。その結果、ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1)を含む癌抑制遺伝子候補を見いだした。

4. 被招聘者

氏名： 張 哲 (Zhe Zhang) 職名： 講師

所属機関： 広西医科大学 部署： 第一臨床学院

5. 滞在日程概要 (日付、主な活動・工程等)

2008年11月23日、来日

12月 炎症によるエピジェネティクス変化の検討

2009年1月 炎症による酸化ニトロ化DNA損傷の解析

1月23日、24日 第8回分子予防環境医学研究会(東京大学大学院医学系研究科)に出席し

Hypermethylation of UCHL1 promoter in nasopharyngeal carcinomaを口頭発表した。

2月 DNAメチル化部位の解析

2月15日、帰国

Epstein-Barr ウィルス感染上咽頭癌発症における DNA メチル化と酸化ニトロ化ストレスの役割解明

招聘研究者名 張 哲
中国所属機関 中国広西医科大学 第一臨床学院 耳鼻咽喉頭頸部外科
日本所属機関 日本三重大学大学院医学系研究科環境分子医学
申請者名 教授 村田 真理子
共同研究者名 黄光武, 莫穎禧, 馬寧, 平工雄介, 及川伸二

要 旨

上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma; NPC) は東南アジアおよび中国南部において有病率が高く予後不良である。Epstein-Barr (EB) ウィルス感染が関与することに加えて、がん抑制遺伝子のエピジェネティック異常が発がん重要な役割を果たすと考えられている。ヒト NPC における新規がん抑制遺伝子候補を探索するために、我々はプロモーター領域の hypermethylation により不活化されている遺伝子を全ゲノムスクリーニングし、ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (*UCHL1*)が NPC における異常 hypermethylation のターゲットであることを見いだした。我々は 6 種の培養細胞株と正常上咽頭上皮組織を用いて RT-PCR により *UCHL1* の発現レベルを解析した。正常上咽頭組織においては中程度の *UCHL1* 発現が見られた。一方、6 種の培養細胞株のうち 5 種の細胞で *UCHL1* は発現低下し、C666-1 においては発現がなかった。メチル化特異的 PCR (methylation-specific PCR, MSP), により 6 種すべての NPC 培養細胞株および原発腫瘍の 74% (23/31)で *UCHL1* プロモーター領域の hypermethylation が観察されたのに対し、非 NPC 患者の正常上皮にはなかった。DNA methyltransferase 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) により NPC 培養細胞での *UCHL1* 発現低下は劇的に改善された。*UCHL1* のエピジェネティックな不活化は NPC において頻度が高く、また腫瘍特異性が高いことから、*UCHL1* は NPC における新規がん抑制遺伝子候補であると考えられる。さらに、我々は ニトロ化 DNA 損傷である 8-nitroguanine と酸化的 DNA 損傷である 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG)を NPC 生検標本を用いて蛍光二重免疫染色した。NPC 腫瘍細胞および間質の炎症細胞において強い DNA 損傷が認められた。EB ウィルス感染を介した酸化ニトロ化ストレスによる DNA 損傷が発がんのイニシエーション・プロモーションに重要な役割を果たし、*UCHL1* の hypermethylation によるがん抑制遺伝子作用の喪失が NPC のプログレッションに寄与すると考えられた。

Key Words: Epstein-Barr ウィルス, 上咽頭癌, *UCHL1*, DNA メチル化, 酸化ニトロ化ストレス

緒 言:

上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma; NPC) は著しく民族特性および地域特性をもつ癌である。この癌は東南アジアおよび中国南部において有病率が高く、特に広東と広西地域に多く、非常に重要な健康問題である。その一方で、世界の他の地域では稀な疾病である。すべての NPC は事実上強く Epstein-Barr (EB) ウィルス感染に関係するが[1, 2], NPC 発症の分子機構は未だに不明な点が多い[3]。近年 10 年間で、より注目されたのは NPC の進展におけるエピジェネティクスの役割についてである。プロモーション領域の hypermethylation によるエピジェネティックながん抑制遺伝子 (tumor suppressor genes, TSGs) の抑制はしばしば NPC の病態に見いだされる。NPC の新しい TSGs を探索するために、DNA methyltransferase を薬物により阻害し、マイクロアレイを用いた発現解析を行うことで、ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (*UCHL1*)

が NPC における異常 hypermethylation のターゲットであることを見いだした。本研究において、我々は半定量的 RT-PCR によりマイクロアレイの結果を確認し、上咽頭癌培養細胞株および原発腫瘍における *UCL1* のメチル化異常について検討した。さらに、我々は EB ウィルス感染下における酸化ニトロ化ストレスによる DNA 損傷について NPC 生検標本を用い免疫染色法により観察した。

対象と方法：

NPC 培養細胞株, NPC 生検および正常上咽頭組織

NPC 培養細胞(CNE1, CNE2 TW03, HNE1, C666 および HONE1) は 37°C にて常法により培養した。広西医科大学耳鼻咽喉科頭頸部外科学(中国, 南寧)において、研究への参加についてインフォームド・コンセントの得られた新規上咽頭癌患者より腫瘍生検 31 検体を得た。診断は熟練した病理医により WHO 分類に従って行われた。正常上咽頭上皮組織は扁桃摘出術にて健常対照より得た。生検標本は DNA および RNA 抽出まで液体窒素中で保存した。

5-Aza-dC 処理, RNA 抽出 と半定量 RT-PCR

NPC 培養細胞株4種 (CNE1, CNE2, HONE1 および C666-1)を 6-well ディッシュに 24 時間培養し、その後4 日間 10 μ M 5-aza-dCにより処理した。試薬および培養液は24 時間毎に交換した。無処理の細胞を対照とした。TRIzol 試薬を用いてNPC 培養細胞よりRNA を抽出した。1 μ g のtotal RNA から MMLV reverse transcriptase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) を用い、マニュアルに従ってcDNAを合成した。PCR反応は 計 20 μ l の反応液 (1xPCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 pmol deoxynucleotide triphosphates, 100 pmol primers, 1 unit AmpiTaq Gold (Applied Biosystems, Branchburg, NJ)) にて行った。PCR は 95°C・10 分間の後、94°C・30 秒間、各アニーリング温度にて45秒間、72°C・90 秒間を34 サイクルとした。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールとした。

DNA 抽出と精製

生検組織をホモゲナイズし、50 μ g/ml proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA) で56°C・3時間酵素反応した。高分子ゲノム DNA を通常の phenol/chloroform 処理し、エタノールにより抽出した。NPC 培養細胞の DNAは TIANamp Genomic DNA Kit (Tiangen Biotech, Beijing, China)を用いて抽出した。

ゲノムDNAの bisulfite処理

bisulfite 処理は Olek et al. [4]の方法を一部改変して行った。すなわち、500 ng のゲノム DNA を0.3 M NaOH で37°C・15 分間インキュベーションして1本鎖とし、2倍量の 2% 低融点アガロースを加えた。アガロース/DNA 混合液を冷やしたミネラルオイル中に滴下し アガロースビーズを作製した。ビーズは200 μ l の 5 M bisulphate solution (2.5 M sodium metabisulphite, Sigma; 100 mM hydroquinone, Sigma; pH5.0)を含むチューブに入れた。反応液を 50°C・16時間、暗所にてインキュベーションした。1 ml のTE buffer による平衡化で反応を止め、500 μ l の 0.2 M NaOHにより脱スルホン化した。ビーズを 1 ml の蒸留水で洗い、PCR 反応に供した。

メチル化特異的PCR(methylation-specific PCR, MSP)

bisulfite処理 DNA 2 μ l を加え、計20 μ l の PCR 反応液(1xPCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 pmol deoxynucleotide triphosphates, primers 100 pmol, 1 unit Hot start ExTaq polymerase (Takara Bio INC))にてPCR反応を行った。PCR は 95°C・3 分間の後、94°C・30 秒間、各アニーリング温度にて45秒間、72°C・90 秒間を38 サイクルとした。MSP 生成物は2% アガロースゲル電気泳動し、ethidium bromideにより染色した。

免疫組織学的検討

8-Nitroguanine と 8-oxodG の免疫染色性を上咽頭生検標本において二重蛍光免疫染色法により評価した。すなわち、6- μm 厚のパラフィン切片を rabbit polyclonal anti-8-nitroguanine antibody (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および mouse monoclonal anti-8-oxodG antibody (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi, Japan) にて室温で一晩インキュベーションした。その後、Alexa 594-labeled goat antibody against rabbit IgG と Alexa 488-labeled goat antibody against mouse IgG (1:400 each, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) で 3 時間反応させた。染色されたスライドを倒立型レーザー स्क্যান顕微鏡 (Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan) にて観察した。

結果:

脱メチル化剤のみによる *UCHL1* 発現の回復

当初のマイクロアレイによる発現解析で発現上昇していた TSGs の候補遺伝子は、培養細胞を脱メチル化試薬 5-aza-dC および ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 trichostatin A (TSA) で処理していたため、脱メチル化ではなく脱アセチル化酵素阻害により回復した可能性がある。そのため、我々は 4 種の NPC 培養細胞株を 5-aza-dC のみで処理した。Fig.1 に示すように、半定量 RT-PCR 解析により、4 種の NPC 培養細胞株において *UCHL1* は脱メチル化のみにより転写活性が回復することが示され、NPC においてプロモーター領域の hypermethylation が *UCHL1* の低発現に関する重要事象であることが明らかになった。

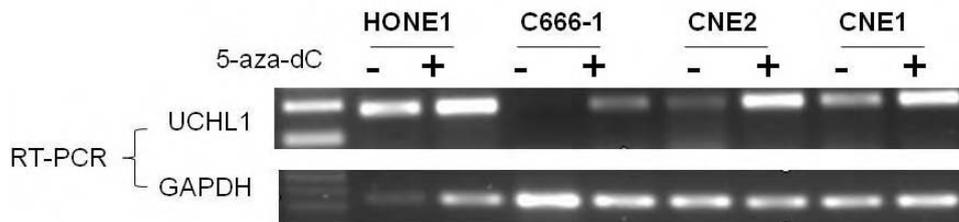


Fig. 1. 5-aza-dC 単独処理による *UCHL1* の発現の回復。

NPC 培養細胞および原発腫瘍における *UCHL1* の hypermethylation

DNA methyltransferase 阻害剤 5-aza-dC 処理により、発現回復したことから *UCHL1* のプロモーター領域が DNA hypermethylation のターゲットであることが示された。しかしこの遺伝子の発現が間接的効果である可能性が残されている。そこで我々は MSP により *UCHL1* のメチル化の状況を調べた。*UCHL1* プロモーター領域の hypermethylation は NPC 培養細胞株 6 種すべて (100%) で検出され、また NPC 患者 31 名中 24 名の原発腫瘍 (74%) でメチル化が検出された。一方、正常上咽頭上皮組織では *UCHL1* のメチル化は検出されなかった (Fig. 2)。

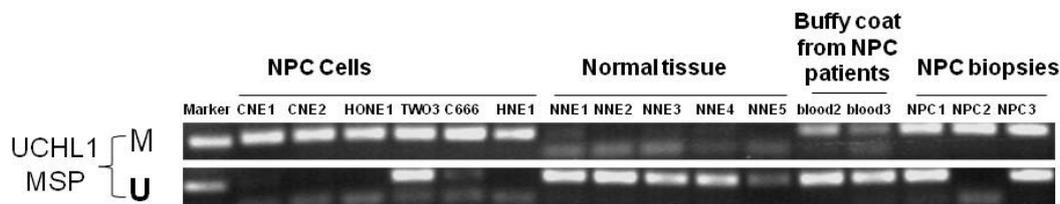


Fig. 2. NPC 培養細胞、原発腫瘍および正常上咽頭上皮 における *UCHL1* のメチル化

NPC 組織における 8-nitroguanine および 8-oxodG の検出

我々は二重蛍光免疫染色法により NPC 患者の上咽頭組織における DNA 損傷について検討した。癌細胞

では 8-nitroguanine と 8-oxodG の強い染色性が認められた。これらの DNA 損傷塩基は核に明瞭に観察され、8-nitroguanine は細胞質にも少し認められた。さらに、これらの免疫染色性は NCP 患者の癌腫の下にある間質の炎症細胞でも観察された。これらの DNA 損傷は EB ウィルス陽性慢性上咽頭炎患者の上皮組織でも観察されたが、EB ウィルス陰性患者ではほとんど認められなかった。

考 察：

UCHL1 は PGP9.5 [5] としても知られており、カルボキ末端側ユビキチン加水分解酵素であり、細胞のユビキチンレベルを制御している。最近の研究から、この遺伝子はがん抑制遺伝子の候補であることが示されている [5-7]。 *UCHL1* はアポトーシスを含む細胞増殖阻害により腫瘍細胞の成長を抑制し、また脱ユビキチン化により p53 を安定化させる作用をもつ [7]。本研究において、我々は NPC のメチル化異常のターゲットを同定するために、5-aza-dC および TSA で処理した 2 種の培養細胞株の発現プロファイルを解析し、 *UCHL1* のプロモーター領域の hypermethylation を見いだした。 *UCHL1* mRNA 発現が NPC 細胞株で down-regulation しており、また *UCHL1* プロモーターが NPC 細胞株および原発腫瘍で過剰にメチル化していることを明らかにした。過剰メチル化した DNA は正常な組織では見られず、画期的な分子腫瘍マーカーになる可能性を示した。MSP の結果より、 *UCHL1* プロモーター領域はすべての NPC 培養細胞株および 74% の NPC 患者でメチル化のターゲットとなっていることを示した。それゆえに、 *UCHL1* メチル化は NPC 患者において頻度が高く in vitro の培養細胞のみの現象でないことを示した。加えて、正常の上咽頭組織においては *UCHL1* メチル化が認められず、 *UCHL1* のメチル化によるサイレンシングは発がんに特異的な過程であることが示唆された。したがって、 *UCHL1* は NPC のがん抑制遺伝子の有力な候補と考えられる。メチル化 *UCHL1* は NPC 診断の有用なバイオマーカーとなる可能性がある。我々は NPC 組織において変異原性 DNA 損傷である 8-nitroguanine および 8-oxodG が核に強く染まることを見だし、EB ウィルス持続感染による慢性炎症に起因するものと考えられた。結論として、EB ウィルス感染を介した酸化ニトロ化ストレスによる DNA 損傷が発がんのイニシエーション・プロモーションに重要な役割を果たし、 *UCHL1* の hypermethylation によるがん抑制遺伝子作用の喪失が NPC のプログレッションに寄与すると考えられた。

引用文献：

1. Raab-Traub, N., Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol*, 12, 431-41(2002).
2. Tao, Q., et al., Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers--genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Front Biosci*, 11, 2672-713(2006).
3. Tao, Q. and A.T. Chan, Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Rev Mol Med*, 9, 1-24(2007).
4. Olek, A., et al., A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 24, 5064-6(1996).
5. Yamashita, K., et al., PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res*, 66, 3921-7(2006).
6. Tokumaru, Y., et al., The role of PGP9.5 as a tumor suppressor gene in human cancer. *Int J Cancer*, 123, 753-9(2008).
7. Yu, J., et al., Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology*, 48, 508-18(2008).

注：本研究は、2009年1月24日『第8回分子予防環境医学研究会』にて口演発表。

作成日：2009年3月3日