

	なかむら あつ お
氏 名	中 村 厚 夫
学 位	博 士 (医学)
学位記番号	新大博(医)第1666号
学位授与の日付	平成17年 1月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博士論文名	Increased <i>hTR</i> Expression During Transition from Adenoma to Carcinoma Is Not Associated with Promoter Methylation (腺腫の癌化に伴う <i>hTR</i> の発現増強にプロモーター領域のメチル化は関与しない)
論文審査委員	主査 教授 木 南 凌 副査 教授 内 藤 眞 副査 教授 青 柳 豊

博士論文の要旨

[背景、目的] テロメラーゼと呼ばれる一種の逆転写酵素が、各種の癌の90%程度で再活性化し、癌細胞の不老化に強く関与していることはよく知られている。本酵素は癌化に伴って発現してくる活性中心蛋白(*hTERT*)と、構成的に発現しているRNA成分(*hTR*)からなるリボヌクレオ蛋白であるが、*hTR*の癌化に伴う発現制御機構は未だ不明である。今回我々は、種々の異型度を有する大腸腺腫と癌組織を対象とした*hTR*に対する *in situ* hybridization を行うことによって、癌化のいかなる過程で*hTR*の発現増強が生じているのかを検討した。さらに同一の検体を用いて*hTERT*の発現の有無と*hTR*の5'非翻訳領域におけるメチル化状態を検索することにより、*hTR*と*hTERT*の発現の関係と、*hTR*発現制御におけるメチル化の意義を検討した。

[対象と方法] 内視鏡的粘膜切除、あるいは外科的に切除された大腸腺腫 15 例、大腸癌 19 例、非腫瘍性大腸粘膜 3 例を対象とした。全例に関し標本の半分を病理学的な検索に供し、残りの半分を用いて*hTR*に対する *in situ* hybridization と RT-PCR による*hTERT*の発現の有無の確認を行った。また全ての標本よりゲノムDNAを抽出し、*hTR*の5'非翻訳領域に設定した2箇所を増幅領域に関して(-297~-57(set-A)、-193~-3(set-B))methylation specific PCR (MSP)を行った。また各増幅サンプルを Mae III と Fok I で切断することにより、-178 から-160 の領域のメチル化の有無を検索した。さらに2症例に関しては増幅サンプルの塩基配列を直接シーケンスにより決定した。

[結果] *hTR*は、高異型度腺腫を含め非癌組織にはその発現が一例も認められなかったのに対し、粘膜内癌を含む全ての癌症例において明瞭なシグナルが観察された。*hTERT*の発現は、*hTR*と同様に非癌組織には一例も認められなかったが、癌組織においては19症例中16例においてのみ発現が認められ、発現の有無と腫瘍異型度と

の間に有意な関係は認められなかった。MSPの結果は、set-Bにおいては癌、非癌と関係なく全ての症例において非メチル化状態であったのに対し、set-Aにおいては、5'側のプライマー領域は全例メチル化されていた。MSP産物の制限酵素による切断では、メチル化プライマーで増幅された産物も含めて、全て非メチル化産物を切断する Fok I によって切断された。また MSP 産物のシーケンスによって、転写開始点より 5'側 270 塩基までに含まれる CpG は、全て非メチル化状態であることが示された。

[考察] 以上より、*hTR* は粘膜内癌の段階ですでに発現が増強されていることが確認された。この結果、ならびにテロメラーゼと癌との関係から、粘膜内癌を癌とは診断しない欧米の病理診断に対し、粘膜内癌を癌と診断する日本の病理診断の妥当性が示唆された。また *hTR* の発現増強と *hTERT* の発現の有無は常に相関するものではないことが明らかとなり、両者の発現制御は独立して成されているものと推察された。*hTR* が構成的に発現していること、-270 までに含まれる CpG が癌、非癌と関係なく全て非メチル化状態であったことは、-270 までの領域が *hTR* のプロモーター領域であることを示唆し、同領域のメチル化状態の変化が、癌化に伴う *hTR* の発現変化に及ぼす影響は極めて少ないこと示唆するものと推察された。

審査結果の要旨

テロメラーゼは各種の癌の約 90%で再活性化し、癌細胞の不死化に強く関与している。本酵素は癌化に伴って発現してくる活性中心蛋白(*hTERT*)と、構成的に発現している RNA 成分(*hTR*)からなるリボヌクレオ蛋白である。*hTERT* の研究は多くあるが、*hTR* の癌化に伴う発現制御機構は未だ不明である。申請者らは種々の異型度を有する大腸腺腫と癌組織(大腸腺腫 15 例、大腸癌 19 例、非腫瘍性大腸粘膜 3 例)を対象とし、*hTR* の発現増強および *hTERT* の発現の有無と *hTR* の 5'非翻訳領域におけるメチル化状態を検討している。方法は、*hTR* では *in situ* hybridization、*hTERT* に対しては RT-PCR 法を用い、メチル化については MSP 法を用いている。

hTR の発現は高異型度腺腫を含め非癌組織では一例も認められないのに対し、粘膜内癌を含む全ての癌症例では明瞭なシグナルが観察されている。一方、*hTERT* の発現は癌組織の 19 症例中 16 例で発現を認めている。メチル化については、5'側のプライマー領域は全例メチル化されていたが、転写開始点より 5'側 270 塩基までに含まれる CpG は、全て非メチル化状態であることが示されている。

これらの結果から、*hTR* は粘膜内癌の段階ですでに発現が増強されていることが確認されている。-270 までの領域が *hTR* のプロモーター領域であることが示唆され、同領域のメチル化状態の変化が、癌化に伴う *hTR* の発現変化に及ぼす影響は極めて少ない、と申請者は推察している。

本研究は、*hTR* 発現と粘膜内癌との関連性を示し、粘膜内癌を癌とは診断しない欧米の病理診断に対し、粘膜内癌を癌と診断する日本の病理診断の妥当性を示唆した点で、博士論文としての価値を認める。