

氏名	村上 純
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 9 0 号
学位授与の日付	平成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Silencing of <i>O6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> gene by methylation of an upstream promoter increases the sensitivity of oral cancer cells to alkylating agents used in their chemotherapy (口腔癌細胞におけるMGMT遺伝子のメチル化による転写抑制ならびにアルキル化剤感受性に関する研究)
論文審査委員	教授 福井 一博 教授 松村 智弘 教授 岸 幹二

学位論文内容の要旨

緒言

口腔癌治療において抗癌剤は有効な治療法のひとつである。しかしながら、抗癌剤に対する感受性には個人差があり、その感受性を投与前に予測できれば、癌治療において有効な薬剤選択が行える。

抗癌剤の中で、各種アルキル化剤は、癌治療に広く用いられている。アルキル化剤は、DNAのグアニンのO⁶位等にアルキル基を付与することにより、抗癌作用を発揮する。一方、O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(以下MGMT)は、その付与されたアルキル基を除去するDNA修復酵素であり、その活性レベルはアルキル化剤に対する感受性に影響する。例えば、ヒト由来癌細胞株の中にはMGMT低発現株が存在するが、その細胞は、アルキル化剤に対して高い感受性を有することが知られている。そのようなMGMT発現抑制は、CpGメチル化に代表されるエピジェネティックな転写阻害により生じている可能性が示唆されている。しかし、そのメチル化の部位、発現との関連等については不明な点が多い。

本研究では、ヒト口腔癌細胞株におけるMGMT遺伝子のプロモーター領域のメチル化とMGMT発現レベルを調べ、さらにそれらとアルキル化剤感受性との関連性について検討した。

材料と方法

1、使用細胞株

使用細胞株はヒト口腔癌細胞株7株を用いた。培養は、10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle mediumを用いて、95%空気+5%炭酸ガス条件下、CO₂インキュベーターにて37℃で行った。

2、MGMT発現レベル

各細胞株からmRNAと総タンパクを抽出し、RT-PCR法およびマウス抗MGMTモノクローナル抗体 MT 3.1 Ab-1 (Neomarkers, Fremont, CA)を用いたウェスタンブロットティング法によって、MGMT発現レベルを調べた。

3、MGMTプロモーター領域におけるCpGメチル化の解析

各細胞株からDNAを抽出し、バイサルファイト処理後、MGMT遺伝子のプロモーター領域から非翻訳第一エクソン内領域をPCRで増幅した。PCR産物をTAクローニングベクターに挿入し、その塩基配列を決定した。バイサルファイト処理によってウラシルへの置換が生じなかったシトシンをメチルシトシンとしてメチル化部位を検索した。

4、アルキル化剤感受性

アルキル化剤N-メチル-N ニトロソウレア (MNU)およびN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)に対する感受性をコロニー形成法によって調べた。

結果

1、口腔癌細胞におけるMGMT発現レベル

ヒト口腔内悪性腫瘍細胞 7 株は、MGMT高発現細胞株4株と低発現細胞株3株に分かれた。尚、RT-PCRおよび、ウェスタンブロットティングのMGMT発現の結果は一致していた。

2、MGMTプロモーター領域におけるメチル化解析

MGMT高発現細胞株4株では、プロモーター下流および第一エクソン内のCpG配列部位にメチル化を認めた。一方、MGMT低発現細胞株3株では、いずれもプロモーター下流および第一エクソン内のCpG配列部位に加えて、プロモーター上流にもメチル化を認めた。

3、アルキル化剤感受性

MGMT低発現細胞株3株は、MGMT高発現細胞株4株に比べてMNNG、MNUに対して顕著に高い感受性を示した。

考察とまとめ

近年の遺伝子発現でのエピジェネティックな転写制御において、プロモーター領域のメチル化は、ヒストンのアセチル化等と共に重要なメカニズムとして認識されている。本研究により、口腔癌細胞株でのMGMTのプロモーター上流領域のメチル化がMGMT発現レベルに関与し、アルキル化剤感受性にも影響することが示唆された。本研究で示したMGMTプロモーター上流のメチル化の検出は、アルキル化剤感受性のスクリーニングテストとして応用でき、検査結果に基づいた薬剤選択に貢献できると考える。

論文審査結果の要旨

臨床上広く用いられている抗癌剤の一つであるアルキル化剤は、DNAのグアニンのO⁶位等にアルキル基を付与することにより、抗癌作用を発揮する。一方、O⁶-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(以下MGMTase)は、その付与されたアルキル基を除去するDNA修復酵素であり、その活性レベルはアルキル化剤に対する感受性に影響する。

これまで、MGMT発現制御は、CpGメチル化に代表されるエピジェネティックな転写阻害の関連が示唆されてきたが、そのメチル化の部位、発現との関連等については不明な点が多かった。本研究は、ヒト口腔癌細胞株におけるアルキル化剤感受性を、MGMTaseをコードするMGMT遺伝子のプロモーター領域のメチル化とMGMT発現レベルの観点から検討したものである。

ヒト口腔癌細胞株7株を用いた本研究においては、MGMT遺伝子転写開始部位上流と第一エクソン領域の2峰性にメチル化を有した群と、第一エクソン領域のみにメチル化を有した群に分かれた。各細胞株でのMGMT mRNA、タンパク発現は、2峰性にメチル化を有した群において両者の発現抑制を認め、第一エクソン領域のみにメチル化を有した群では発現抑制を認めなかった。さらに2峰性にメチル化を有した群は、アルキル化剤*N*-メチル-*N*-ニトロソウレアおよび*N*-メチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジンに対して、高い殺細胞作用を示すことが明らかとなった。一方、第一エクソン領域のみにメチル化を有した群は、アルキル化剤に対して低感受性であった。

これらの結果は、口腔癌でのMGMTプロモーター領域に置けるメチル化とアルキル化剤感受性との関連を示したもので、極めて意義がある。さらに、今回の結果は、アルキル化剤感受性試験といった臨床応用の可能性を含んでおり期待できる。従って、本論文は博士(歯学)の学位の授与に値するものと判定した。