



Title	Promoter hypermethylation silences cyclooxygenase-2 (Cox-2) and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells
Author(s)	村田, 浩昭
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46021">https://hdl.handle.net/11094/46021</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	村田 浩昭
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19112 号
学位授与年月日	平成 17 年 2 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Promoter hypermethylation silences <i>cyclooxygenase-2 (Cox-2)</i> and regulates growth of human hepatocellular carcinoma cells. (プロモーターのメチル化がヒト肝癌細胞のシクロオキシゲナーゼ 2 ( <i>Cox-2</i> ) 遺伝子の転写を抑制し、成長を制御する。)
論文審査委員	(主査) 教授 堀 正二 (副査) 教授 仲野 徹 教授 門田 守人

#### 論文内容の要旨

##### [目的]

Cyclooxygenase-2 (COX-2) は、prostaglandin (PG) の産生に関わる誘導型の律速酵素である。近年、様々の固形癌において COX-2 の強発現が確認され (Murata H, *et al.*, *Am J Gastroenterol* 1999 ほか)、アスピリンなどの非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) や COX-2 選択的阻害剤により、これらの癌の発生や進展が抑制される可能性が報告されている。しかし、肝臓癌 (HCC) に対するこれらの効果は疫学的には報告されておらず、これらの薬剤が HCC に及ぼす影響は判然としていない。

CpG アイランドと呼ばれる CpG 配列に富む配列をプロモーターにもつ遺伝子では、同部のシトシンメチル化により、遺伝子の転写、発現が抑制される (Murata H, *et al.*, *Oncogene* 2002 ほか)。Cox-2 に関しては、胃癌、大腸癌においてプロモーターのメチル化が遺伝子発現を抑制するとの報告がある。HCC では、早期の HCC においては COX-2 の強発現が認められるが、進行癌においてはその発現が減弱している。そこで HCC における COX-2 発現の制御にプロモーターのメチル化が関与しているのではないかと仮説を立て、その制御の意義を含めて *in vitro* での検討を行うことを目的とした。

##### [方法ならびに成績]

Hep3B、HepG2、SK-Hep1、HuH7、PLC、FLC-7 の 6 種の HCC 培養細胞株のプロモーターメチル化を検討した。転写開始点の上流、-431 nt、-372 nt、-138 nt (*Cox-2* の転写因子である NF- $\kappa$ B、NF-IL6 の結合部位近傍) における CpG 部位のメチル化を、2つの互いに isoschizomer である HpaII (メチル化感受性) と MspI (メチル化非感受性) の制限酵素により、細胞より抽出した核 DNA を処理し、各々 3ヶ所を含むようにプライマーを設定して PCR 増幅をおこなった。MspI 処理後に増幅されないことにより、同部には遺伝子変異がないことを確認し、HpaII 処理後に増幅が認められれば、同部がメチル化のため切断されなかったことが示される。Hep3B、FLC-7 細胞では高度に、HepG2、SK-Hep1 細胞では中等度に *Cox-2* プロモーターのメチル化を認めたが、HuH7、PLC 細胞ではメチル化を認めなかった。

高度にメチル化を認めた Hep3B 細胞に対して脱メチル化剤である、5-aza-2'-deoxycytidine を非添加または 1-10

$\mu\text{M}$  添加し4日間培養すると、脱メチル化剤の濃度依存性に mRNA (RT-PCR)、タンパク (Western blotting: WB) レベルでの COX-2 発現が認められた。また、COX-2 により触媒産生される PGE<sub>2</sub> の上清中への放出量は、濃度依存的に増加した (ELISA)。興味あることに、COX-2 の発現にともなって細胞周期を制御する cyclin D1 の発現は抑制され (WB)、細胞数の増加も抑制された (WST-8 アッセイ)。COX-2 の選択的阻害剤である celecoxib を 1  $\mu\text{M}$  添加し培養すると、脱メチル化剤により増加していた PGE<sub>2</sub> の産生は抑制され、脱メチル化剤による細胞成長抑制が認められなくなった。一方、Cox-2 プロモーターのメチル化を認めない HuH7 細胞では、これらの変化は認められなかった。脱メチル化剤添加は、培養上清中 LDH の増加を起さず、細胞毒性は有意ではなかった。

#### [総括]

一部の HCC 培養細胞においては、プロモーターのメチル化が Cox-2 遺伝子の発現を抑制しており、同部の脱メチル化により Cox-2 発現が誘導された。COX-2 阻害剤添加にて、脱メチル化剤により認められた細胞成長の抑制が相殺されたことから、脱メチル化剤により同時に転写が刺激される他の遺伝子ではなく、主に Cox-2 遺伝子の発現誘導がこれらの細胞成長の制御に強く関わっていることが示された。COX-2 阻害剤や NSAIDs は、細胞のアポトーシス誘導を含め、発癌抑制効果 (chemoprevention)、癌進展防止効果が期待されている。しかし、HCC におけるこれらの薬剤投与については、その効果を裏付ける疫学的証拠はなく、また今回の検討結果より細胞増殖を刺激する可能性もあることから、今後 *in vivo* での検討を行う必要がある。

### 論文審査の結果の要旨

プロスタグランジン産生に関わる Cyclooxygenase-2 (COX-2) は多くの固形癌や前癌病変で高発現しているが、肝癌では、癌進展に伴いむしろその発現が低下することが知られている。本論文では複数の肝癌細胞株を用い、Cox-2 の発現低下がその遺伝子プロモーター領域に存在する CpG アイランドのシトシンメチル化によることが示された。すなわち、メチル化した CpG には作用しない制限酵素を利用し6種の肝癌細胞のうち4種で Cox-2 遺伝子プロモーターがメチル化されている事を示すと共に、脱メチル化薬がそのプロモーターメチル化を解除し COX-2 発現とプロスタグランジン産生を回復する事を証明した。

一般に COX-2 の発現増強は癌細胞の細胞死を抑制し癌増殖に促進的に作用すると信じられているが、本論文ではさらにプロモーターメチル化による COX-2 発現抑制が癌細胞における Cyclin D1 の発現と細胞増加に結びついている事を、脱メチル化薬ならびに COX-2 選択的阻害剤を用い証明した。

肝癌のみならず他の固形癌においても未分化癌で腫瘍細胞の COX-2 発現が欠失している場合があるが、Cox-2 遺伝子変異の報告はなくその成因は不明であった。本論文はこのような COX-2 発現低下が遺伝子プロモーター領域のエピジェネティックな変化による事と癌進展を促進する可能性を示したものであり、学位授与に値すると考える。