



Title	Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues
Author(s)	金, 柄老
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46282
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 ^{キン}金 ^{ヘイ}柄 ^{ロウ}老

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19897 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 1 月 19 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 Methylation and expression of p16^{INK4} tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues
(原発性大腸癌組織における p16 癌抑制遺伝子のメチル化と発現)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 門 田 守 人

(副査)

教 授 野 口 眞 三 郎 教 授 林 紀 夫

論 文 内 容 の 要 旨

(目的) p16^{INK4} 癌抑制遺伝子は cyclin D1/CDK4 複合体の活性を抑制し、細胞周期を負に制御する。大腸癌細胞株では一般に、p16 プロモーターの CpG 領域のメチル化により p16 遺伝子発現は抑制されていることが知られている。しかし、ヒトの大腸癌組織における p16 遺伝子発現の調節機構については不明な点が多い。大腸癌組織でも、p16 遺伝子のメチル化が高頻度に検出されることが報告されているが、一方で、大腸癌組織における p16 蛋白質の過剰発現の報告も少なくない。本研究では、大腸癌組織サンプルを用いて p16 遺伝子のメチル化および遺伝子発現を調べ、p16 遺伝子発現の in vivo 調節機構について検討した。更に大腸癌組織での p16 遺伝子発現の生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

(方法と成績)

- 1) 5 種類の大腸癌細胞株より DNA を抽出し MSP (methylation specific PCR) によって p16 遺伝子のメチル化の有無を調べた。HCT116 細胞では、P16 遺伝子のメチル化バンドと非メチル化バンドの両方がみられ、単一の細胞株内での p16 methylation に関する heterogeneity の存在が示唆された。他の 4 株では、メチル化バンドのみが検出された。次に細胞株より RNA を抽出し、RT-PCR 法により p16 RNA 発現を調べた。HCT116 では弱い p16 RNA 発現を認めたが、他の 4 株では p16 RNA 発現を全く認めなかった。
- 2) 同様に、大腸癌 21 例について検討した。癌組織 9 例 (42.9%) でメチル化バンドがみられ、うち 6 例で中等度の p16 RNA 発現がみられた。メチル化を示した 9 例に対し Real time MSP によりメチル化率 (Methylation Index (M.I.): %Methylated DNA/Methylated DNA + Unmethylated DNA) を求めた。M.I. は多様であり (0.28-0.91)、high methylation 群 (M.I. > 0.5) では low methylation 群 (M.I. < 0.5) よりも有意に p16 RNA 発現が低下していた。
- 3) 正常・癌組織サンプル中の p16RNA 発現量は、Western blot 法で検出された p16 蛋白量とよく相関した (n=16)。また、Western blot による p16 蛋白量は、免疫染色による局在検討の結果、間質ではなく癌細胞での p16 蛋白発現とよく一致していた。
- 4) 大腸癌組織 55 例について p16 蛋白に対する免疫染色を行い、癌組織での発現と臨床病理学的因子を比較した結果、癌組織での p16 低発現群は p16 高発現群に比べて有意にリンパ節転移や大きな腫瘍径と関連性を認めた (p=0.003、

0.048)。

(総括) 大腸癌組織は細胞株と異なり多様な p16 遺伝子のメチル化を示した。癌組織での P16 遺伝子発現はメチル化の程度によって調節されており、メチル化が高度になると p16 蛋白発現は低下し、腫瘍の増大、転移を促進する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

p16^{INK4} 癌抑制遺伝子は cyclin D1/CDK4 複合体の活性を抑制し、細胞周期を負に制御する。大腸癌細胞株では p16 プロモーターの CpG 領域のメチル化により p16 遺伝子発現は抑制されることが知られている。大腸癌組織でも p16 遺伝子のメチル化が高頻度に検出されることが報告されているが、p16 遺伝子発現と比較検討した報告はない。本研究では大腸癌組織サンプルを用いて p16 遺伝子のメチル化及び遺伝子発現を調べ、p16 遺伝子発現の in vivo 調節機構について検討した。

1) 大腸癌細胞株では 5 種のうち 4 種においてメチル化バンドのみが検出され、p16 mRNA の発現を全く認めなかった。HCT116 一種のみがメチル化バンドと非メチル化バンドの両方を示し、p16 mRNA 発現を弱く認めた。

2) 大腸癌組織では細胞群と異なり、多様な p16 遺伝子のメチル化を示した。癌組織での p16 遺伝子発現はメチル化の程度によって調節されており、メチル化が高度になると p16 蛋白発現は低下し、腫瘍の増大、転移を促進する可能性が示唆された。

本研究では大腸癌組織における p16 遺伝子のメチル化の程度と p16 遺伝子発現とをはじめて同時に比較検討した。その結果、p16 遺伝子の in vivo gene silencing のメカニズムを明らかにし、大腸癌進展の解明に貢献したので学位授与に値すると認める。