

ホルマリン固定・パラフィン包埋病理組織をもちいた包括的エピジェネシス解析

●北澤 莊平

神戸大学大学院医学系研究科分子病理学分野

〈研究の目的と進め方〉

病理診断に用いられるホルマリン固定・パラフィン包埋試料は、病理学教室・病理検査室に、詳細な臨床情報や病理組織学的解析データとともに膨大な数が保存されてきた。過去に蓄積されてきたホルマリン固定・パラフィン包埋病理検体をポストゲノム時代の分子病態解析のために活用することを目的として本研究を計画した。1)ホルマリン固定・パラフィン包埋の操作がメチル化シトシン検出に及ぼす影響を評価し、2) 応用研究として前立腺癌病理解剖症例について、造骨性骨転移に関与するとされる骨形成因子 (BMP) -6の発現と遺伝子プロモータ領域のCpGメチル化の解析をおこない、原発巣と転移巣における比較検討を行うことを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

1) ホルマリン固定パラフィン包埋がメチル化DNA検出に及ぼす影響：サイクリンD1遺伝子プロモータ領域に既知のメチル化を有するラット白血病細胞株を用いて、種々の固定条件を設定して検討する。
2) 前立腺癌における骨形成因子 (BMP) -6遺伝子プロモータ領域のCpGメチル化の解析：私どもは、ヒトBMP-6遺伝子プロモータ領域をクローニングしCpG islandの存在を示した。本研究ではまず、前立腺癌細胞株を用いた検討を行い、Sp1結合部位周辺のシトシンメチル化がBMP-6遺伝子のsteady-stateにおける発現をepigeneticに規定することを明らかにし、さらに前立腺癌剖検症例を対象に前立腺癌原発部位と転移巣とにおけるBMP-6遺伝子プロモータ領域のメチル化シトシンの解析を行う。

〈研究期間の成果〉

1) ホルマリン固定パラフィン包埋がメチル化DNA検出に及ぼす影響：ホルマリン固定自体はメチル化シトシンの検出を妨げず、ホルマリンによってDNAの断片化を起こすことで寧ろsodium bisulfite処理後のPCR産物の検出効率を高めることが明らかとなった。しかし、ホルマリン固定期間が3日を越えた試料ではメチル化シトシン検出は困難であった。今回の検討により、通常の病理組織検体の内、生検・手術検体の大部分、病理解剖試料の約70%がメチル化シトシン解析に使用可能なことを示した。
2) 前立腺癌における骨形成因子 (BMP) -6遺伝子プロモータ領域のCpGメチル化の解析：私どもは、ヒトBMP-6遺伝子プロモータ領域をクローニングしCpG islandの存在を示した。本研究ではまず、前立腺癌細胞株を用いた検討を行い、Sp1結合部位周辺のシトシンメチル化がBMP-6遺伝子のsteady-stateにおける発現をepigeneticに規定することを明らかにした。さらに前立腺癌剖検症例を対象に前立腺癌原発部位と転移巣とにおけるBMP-6遺伝子プロモータ領域のメチル化シトシンの解析を行った。各部位でのBMP遺伝子発現はin situ hybridizationにて比較検討した。前立腺癌原発部位ではBMP-6遺伝子プロモータ領域Sp1結合部位周辺にシトシンのメチル化を示すが、転移・浸潤部位では脱メチル化しており、それに呼

応してBMP-6遺伝子発現の亢進を認めた。メチル化シトシンの検出は14年前の剖検症例のパラフィン包埋試料からも可能であった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究により、過去に蓄積された膨大な数のホルマリン固定・パラフィン包埋試料を有効活用する包括的エピジェネシス解析への道が開かれた。病理形態学の過去の蓄積を、ポストゲノムに有効的に継承する方法として多くの学会において大いなる反響を得た。また国際学会のシンポジウムに採択され、学術賞の対象研究課題に選定された。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

包括的な解析研究を行う予定であったが、症例収集に限界があり、周辺施設を含めた地域限定的な解析にとどまった。メチル化を指標とした国際疫学的な研究には、個人レベルでの対応では限界があった。班員としての研究も2000年度に限定されており、研究経費にも限界があった。

〈今後の課題〉

ミャンマー、タイ、インドネシアとの共同研究により、腫瘍発生・進展過程におけるメチル化の疫学的検討を進めること。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)
Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S. Identification of methylated cytosine from archival formalin-fixed paraffin-embedded specimens, *Lab Invest* 80, 275-276 (2000).
Tamada H, Kitazawa R, Gohji K, Kitazawa S. Epigenetic regulation of human bone morphogenetic protein 6 gene expression in prostatic cancer, *J Bone Miner Res* 16, 487-496 (2001).
Sakamoto Y, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. Methylation of CpG loci in 5'-flanking region alters steady-state expression of adenomatous polyposis coli gene in colon cancer cell line, *J Cell Biochem* 80, 415-423 (2001).
Kitazawa S, Kitazawa R. Epigenetic control of mouse RANK ligand (RANKL) gene expression, *BBRC* 293, 126-131 (2001)
Agus D, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. MeCP2 and promoter methylation cooperatively regulate E-cadherin gene expression in colorectal carcinoma, *Cancer Sci* 94, 442-447 (2003).
Fujimoto M, Kitazawa R, Maeda S, Kitazawa S. Methylation adjacent to negatively regulating AP-1 site reactivates TrkA gene expression during cancer progression, *Oncogene* 24, 5108-5118 (2005).
2) -4) 特になし