The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト肝細胞癌からの癌遺伝子のクローニング
Author(s)	落谷，孝広
Citation	大阪大学，1988，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36001
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

【3】

氏名・(本籍)	落谷孝広（おちやたかひろ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8080 号
学位授与の日付	昭和63年3月25日
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ヒト肝細胞癌からの癌遺伝子のクローニング**
論文審査委員	(主査) 教授 松原 謙一 (副査) 教授 吉川 寛　教授 内田 驍

論文内容の要旨

［目　的］

この数年間に，ヒト固形癌および株化癌細胞から得たＤＮＡをマウスＮＩＨ３Ｔ３細胞に導入（トランスフェクション）し，試験管内癌化（トランスフォーメーション）を起こさせることにより，癌遺伝子を検出する試みが相次いでなされた。この方法によって最も数多く検出されのがras遺伝子群であり，その他ヒトの癌遺伝子として，Ｂ－lym，trk，dblそしてhstなどが分離されている。しかし，ヒト肝癌に関する癌遺伝子の研究報告は極めて少ない。本実験の目的は，ヒト肝癌において優性に働いている癌遺伝子をクローニングし，その性質を明らかにすることにある。

［方法ならびに成績］

外科的手術により分離した肝癌組織15例，ヌードマウスに移植・継代されている肝細胞癌１例及び肝癌培養細胞株２例の計18例より高分子ＤＮＡを抽出し，ＮＩＨ３Ｔ３細胞にトランスフェクションを行った。その結果，固型癌３例及び細胞株１例の計４例にトランスフォーミング活性が検出された。これらのトランスフォーメーションの頻度はＤＮＡ１μｇ当り0.0083から0.013であり，活性ras遺伝子を運ぶ癌組織ＤＮＡ（0.01～0.12）に比べるとやや低いものの，第一次トランスフォーム細胞から抽出したＤＮＡを繰り返しトランスフェクショクンしても，それらの活性は安定に継代された。第一次および第二次トランスフォーム細胞は低血清濃度の培地でもよく増殖できる，位相差顕微鏡下で輝いて見える，軟寒天培地でコロニーを形成する，ヌードマウスに皮下注射した場合，強い造腫瘍性を示すなど，形質転換細胞としての特徴をよく備えている。

ヒト繰り返し配列であるAlu ＤＮＡをプローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行った結果，

第一次トランスフォーム細胞（ＨＣＣ１，７，11そしてLi７由来）はかなりの量のひとＤＮＡ断片を含むのに対し，ＨＣＣ１及び11由来の第二次トランスフォーム細胞では，制限酵素Bam ＨＩで切断すると，Alu ＤＮＡとハイブリッドを形成しうるＤＮＡが約10kbの断片として１本ずつ含まれていた。ＨＣＣ１に由来する癌遺伝子のトランスフォーミング活性はBam ＨＩで完全消化しても消失しないことが分かっていたため，Bam ＨＩ断片10kbの上に肝癌の癌遺伝子が存在することになる。この情報のもとに，第二次トランスフォーム細胞のＤＮＡをBam ＨＩで完全分解後，やはり同酵素で切断しておいたシャロン28ベクターにつなぎ，in vitroパッケージングした後，Alu ＤＮＡとハイブリッドを形成するクローンを選び出した。約10万個の組み換え体ファージを検索した中から，ヒトＤＮＡを持つ８個のクローンを得た。このうち，約10kbのヒトＤＮＡ断片を持つクローンがＮＩＮ３Ｔ３細胞をトランスフォームすることが分かった。このＤＮＡは１μｇ当り約400個のフォーカスを形成させつ能力を持っていた。

それではこの癌遺伝子が果たして既知の癌遺伝子のどれに対応するのか，あるいは全く別のタイプなのかを知るために，全長の塩基配列を決定し，ＥＭＢＬデータベースとホモロジーサーチを行った結果，既知のヒトＤＮＡ及びレトロウイルスとの間には類似性を見い出せなかった。従ってこの癌遺伝子はこれまでに報告のない新しいヒト癌遺伝子であり，肝癌（liver cancer）由来であることから，lcaと名付けた。

なお，lca ＤＮＡの一部をプローブにサザンハイブリダイゼーションを行ったところ，ＨＣＣ11由来の第二次，第三次トランスフォーム細胞のＤＮＡとハイブリダイズし，lca遺伝子が２例の別個の肝癌で同時に活性化していることが分かった。

次に，セルソーターを用いた染色体分離法及びハイブリッド細胞を用いたサザン法により，lca遺伝子はヒト２番染色体にあることが決定された。さらにin situハイブリダイゼーションによる詳細な検討により，２q14－21にマップされている。

lca遺伝子を12断片に分け，その各々をプローブとして用い，ＨＣＣ１由来の第二次トランスフォーム細胞で1.8kbのpol（A）$^{+}$mRNAとして特異的に発現している部分を明らかにした。これらのlca遺伝子のエキソンと思われるＤＮＡ断片をプローブにして，上記mRNAより作製したλgt10のcDNAライブラリーの中から，lca遺伝子のcDNAクローンを単離し，現在その塩基配列を決定している。

lca遺伝子の活性化の機構を明らかにする目的で，lcaに対応する正常型遺伝子をヒト健常人のＤＮＡライブラリーからクローニングした。両者の詳細な制限酵素地図を比較した限りでは全く相違が認められず，遺伝子の再配列が活性化の原因ではなさそうである。また，この正常型lca遺伝子にはＮＩＮ３Ｔ３細胞をトランスフォームする能力がないことから，この遺伝子の活性化は，塩基配列上のごくわずかな変異が原因ではないかと考えられる。

［総　　括］

ヒト肝癌組織ＤＮＡから，ＮＩＮ３Ｔ３細胞をトランスフォームする能力を持つ新しい癌遺伝子lcaをクローニングした。18例のうち２例もの肝癌においてこの癌遺伝子が検出された事実は，lca遺伝子の活性化がヒト肝癌の発生に重要であることを示唆している。

論文の審査結果の要旨

本研究は，ヒト肝細胞願に関与している癌遺伝子，lcaをクローニングしたものである。

それまで，米国を中心として多くの研究者が試みた結果が全て失敗であったことから，肝癌には活性型癌遺伝子がないのではないかとおもわれていたが，この発見は再び肝癌における同類の研究を著しく活発にした。

この癌遺伝子はこれまで得られたことのない新型のものであることも判り，その本態の究明は，肝癌の発生機序を知る上で重要な貢献となることは明らかであり，学位に値するものと考える。