

Title	Coexpression of cdk2/cdc2 and retinoblastoma gene products in colorectal cancer.
Author(s)	山本, 浩文
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39430">https://hdl.handle.net/11094/39430</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">〈a href="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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏 名	山 本 浩 文
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 1 2 2 0 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 2 月 2 8 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	Coexpression of cdk2/cdc2 and retinoblastoma gene products in colorectal cancer. (大腸癌における cdk2/cdc2 および RB 癌抑制遺伝子産物発現に関する検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 高 井 新 一 郎      教 授 秋 山 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目 的】

Rb 遺伝子は網膜芽細胞種の原因遺伝子として最初に単離された癌抑制遺伝子である。この遺伝子の不活化は、骨肉腫、肺癌、乳癌などの発症に関与していると考えられている。一方、大腸癌では Rb 遺伝子の不活化はまれであり、逆に遺伝子増幅や mRNA および蛋白レベルでの過剰発現が報告されている。Rb 遺伝子は細胞周期を制御する重要な蛋白 (pRB) をコードしており、この蛋白の細胞増殖抑制活性はその磷酸化酵素である cyclin - dependent kinase (cdk) によって調節されている。高等動物では G1/S 移行帯で cdk2 が pRB を磷酸化 (不活化) し、細胞を S 期へと進行させること、また、G2/S 移行帯では cdc2 が働き、細胞の分裂を促進させることが知られている。そこで本研究では、大腸癌で過剰発現を示す pRB の機能的側面を探るため、pRB とその磷酸化酵素である cdk2/cdc2 の発現を免疫染色および Western blotting 法を用いて検討した。

#### 【方法ならびに成績】

1. 手術で得られた大腸正常組織および癌組織 10 例を対象に、Western blotting 法にて cdk2, cdc2 および pRB の発現を調べた。一次抗体として cdk2 特異的ポリクローナル抗体 (UBI 社)、抗 cdc2 抗体 2A10 (MBL 社)、および抗 pRB 抗体として PMG3-245 (Pharminogen 社) を用いた。cdk2, cdc2 はともに正常粘膜に比し癌組織での発現亢進が認められた。デンストメトリーを用いて T/N 比を算出すると、それぞれ 1.27 - 4.63 (median 2.17), 1.13 - 10.81 (median 2.92) であった。一方 pRB のバンドは 110 - 116kD にかけて認められ、正常粘膜の抽出液からは 110kD の位置を中心とするバンドが検出され、癌組織の抽出液からは 110kD のバンドと 110kD 以上の高磷酸化型の pRB が検出された。pRB の T/N 比は 0.74 - 4.06 (median 1.38) であった。pRB の細胞周期制御機能を推察するために、高磷酸化型 pRB / 全 pRB 量を磷酸化率として算出してみると、正常粘膜では 24 - 48 % (median 34 %), 癌組織では 35 - 74 % (median 48 %) であり、10 例中 9 例で癌組織での磷酸化率の増加をみとめた。

2. 免疫染色によりこれらの蛋白の組織内局在を調べた。隣接正常粘膜を含む大腸癌組織 50 例を対象に、中性ホルマリン固定 (4°C, overnight) 後、パラフィン連続切片を作製した。Western blotting で cdk2, cdc2 の検出に用いた抗体は免疫染色には適さないため、組織切片の染色には cdk2, cdc2 の両者を認識する 5F6 (MBL 社) 抗体を用いた。抗 pRB 抗体としては PMG3 - 245 を反応させ ABC 法で免疫染色した。cdk2/cdc2 は正常線管底部の少数の上皮細胞及び、リンパ濾胞胚中心のリンパ球等増殖細胞の核と細胞質に検出された。癌組織でも cdk2/cdc2 は癌細胞の核と細胞質に検出され、50 例中 17 例 (34%) で癌細胞の 50% 以上が、22 例 (44%) で 10 - 50% の癌細胞が cdk2/cdc2 を発現していた。一方、pRB は核に発現がみられ、その陽性細胞の分布は cdk2/cdc2 陽性細胞に一致していた。大腸癌症例の臨床病理学的パラメーターと cdk2/cdc2 陽性率との関係を見ると、組織型では高分化/中分化線癌で発現が高く、低分化線癌や印環細胞癌では低率であった。しかし腫瘍径、深達度、リンパ節移転、肝転移の有無、ステージなどのパラメーターとの有意な関係はみられなかった。

#### 【総括】

本研究では、大腸癌組織で pRB とともに cdk2, cdc2 の発現が正常組織にくらべて亢進していること、さらに連続切片を用いた免疫組織学的検討で、pRB を過剰発現する細胞と cdk2/cdc2 を発現する細胞が一致することが示された。このことは、大腸癌で過剰発現する pRB が、同じく過剰発現する cdk2/cdc2 によって磷酸化をうける可能性を示唆する。Western blotting では癌組織の pRB は 110kD 以上の分子量を有する高磷酸化型の割合が正常組織よりも高いことがわかり、大腸癌組織で過剰発現している pRB の細胞増殖抑制機能は正常組織でのそれよりも弱まっているものと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究では、Rb 遺伝子の loss や deletion が稀とされる大腸癌を対象に、RB 蛋白の機能調節に関わる細胞周期関連蛋白の異常発現について検討した。すなわち、RB 蛋白を磷酸化により不活性化するとされる細胞周期促進因子である cdk2/cdc2 の発現を解析するとともに、癌細胞で発現する RB 蛋白の機能を調べることを目的としたものである。その結果、RB 蛋白は検索した 50 例全例で癌組織での発現がみられた。また大腸癌の約 8 割で cdk2/cdc2 の過剰発現がみられ、連続切片を用いた免疫組織学的検討では、cdk2/cdc2 を過剰発現する細胞と RB 蛋白を発現する細胞が一致することが明らかとなった。さらに Western blotting では癌組織では 110kD 以上の分子量を有する高磷酸化型 RB 蛋白の割合が正常組織よりも増加しており、大腸癌組織で発現する RB 蛋白の細胞周期制御機能が失われている可能性が示唆された。本研究は、RB 蛋白の機能調節に働く細胞因子の異常と癌との関わりを解明する上で重要な示唆を与えており、大腸癌のみならず広く一般の腫瘍における細胞周期制御機構異常と発癌との関係を解明する上でも大いに寄与するものであり、学位に値するものと考えられる。