

Title	Isolation of a candidate tumor suppressor gene on chromosome 8p21.3-p22 that is homologous to an extracellular domain of the PDGF receptor beta gene
Author(s)	藤原, 義之
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41165">https://hdl.handle.net/11094/41165</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</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	藤 原 義 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 6 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 2 月 12 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	Isolation of a candidate tumor suppressor gene on chromosome 8p21.3-p22 that is homologous to an extracellular domain of the PDGF receptor beta gene. (ベータ型 PDGF 受容体の細胞外ドメインとホモロジーを有する第 8 染色体 p21.3-p22上に存在する候補癌抑制遺伝子の単離)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 青 笹 克 之 教 授 野 口 眞 三 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

(目的) ヒト第8染色体短腕上には、肝癌、肺癌、及び大腸癌等で高頻度に欠失が認められる領域があり、そこには、これらの複数の癌に関与する癌抑制遺伝子の存在が推測されている。本研究は、この特定された領域より新規の候補癌抑制遺伝子を単離することを目的とした。

(方法ならびに成績)

(a) 共通欠失領域の限局化 これら3種の癌の共通欠失領域を第8染色体 p21.3-p22上の600塩基対 (kb) の領域内に限局化した。すなわち、ヒト8番染色体のみを含んだヒトマウス雑種細胞よりコスミドクローンを多数単離し、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) にて染色体上の位置を決定した。これらのマーカーの中から個体によって制限酵素切断断片の長さに多型を示す DNA 断片を RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) マーカーとして単離し、LOH (Loss of Heterozygosity) 解析を行った。同時に、目的の領域周辺に FISH 法にてマップされた12個のコスミドクローンをを用い、パルスフィールドゲル電気泳動法にて物理的地図を作成し、共通欠失領域が600 kb の中にあることを同定した。

(b) 遺伝子の検索 共通欠失領域 (600 kb) 内に存在する遺伝子を単離するため、この領域をカバーする2個の人工酵母染色体 (YAC) クローンを単離した。この2個の DNA よりコスミドライブラリーを作成し、ヒト DNA を有するクローンを74個を単離し、Southern hybridization 法により、コスミドコンティグマップを構築した。このコンティグマップをもとに共通欠失領域をカバーする34個のコスミドクローンをを選び、エクソン-アンプリフィケーション法によりエクソンとなりうる塩基配列を検索した。この結果、54個のエクソンとなりうる DNA 断片を得た。これらの DNA 断片をプローブにして、胎児肺または胎児脳由来 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。これにより、この領域内に存在する6種の異なった cDNA クローンが得られた。

(c) 候補癌抑制遺伝子の単離 6種の各々をプローブとしたとき腫瘍組織特異的遺伝子再構成が検出されるかどうかを検討した。すなわち、肝細胞癌、肺癌、及び大腸癌計295症例の癌組織及び正常組織由来 DNA の制限酵素 (EcoRI + HindIII, PvuII または PstI) 断片に対して、これらの cDNA クローンの DNA をプローブとした Southern blot 解析

をおこない、癌細胞に生じている欠失、重複、増幅、転座などの大きな構造的遺伝子異常、いわゆる遺伝子再構成の検出を行った。その結果、ひとつの cDNA プローブにより、肺癌の 1 症例において遺伝子再構成が認められた。このクローンは、その由来のコスミドクローンのコンティグマップ上の位置より、600 kb の共通欠失領域内にあることが確認された。この cDNA クローンは胎児肺 cDNA ライブラリーより単離され、全長 1502 bp で 1125 bp のコーティング領域を含んでいた。Northern-blot 解析では、約 1.6 kb の単一バンドを認め、特に、骨格筋、卵巣、大腸、小腸等で高発現を認め、肺、肝臓でも微量ながら発現が認められた。この遺伝子は 375 アミノ酸よりなる分泌型の蛋白をコードし、ホモロジー検索により、PDGF receptor $\beta$  や fms-like tyrosine kinase (*flt*) の細胞外領域と各々 27%、25% のホモロジーを認めた。これら 3 つの蛋白において、すべてのシステイン残基は温存されていた。

(d) 体細胞変異の検出 肝細胞癌、肺癌、大腸癌組織 (108 例) の DNA を用いて、この遺伝子の変異解析を行った。この遺伝子は 7 個のエクソンより構成されており、各々のエクソンについて、Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 解析を行った。その結果、大腸癌 1 例と肝細胞癌 1 例においてアミノ酸置換を伴う点突然変異が、肝細胞癌 1 例において 2 塩基の欠失変異を認めた。

(総括) 肝細胞癌等の癌において高頻度に LOH が認められる第 8 染色体短腕 p21.3-p22 の領域より候補癌抑制遺伝子を単離した。この遺伝子は、肺癌の 1 例で Southern blot レベルで遺伝子再構成を認め、sequence 解析にて、大腸癌の 1 例、肝細胞癌の 1 例にアミノ酸置換を、肝細胞癌の 1 例に 2 塩基の欠失によるフレームシフト変異を認めた。この遺伝子がコードする蛋白は、成長因子の受容体の細胞外領域と相同性があり、細胞増殖に関与する遺伝子産物であることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

肝細胞癌、肺癌、及び大腸癌等において高頻度に LOH が認められる第 8 染色体短腕 p21.3-p22 の領域より候補癌抑制遺伝子を単離した。この遺伝子は、肺癌の 1 例で Southern blot レベルで遺伝子再構成を認め、sequence 解析にて、大腸癌の 1 例、肝細胞癌の 1 例にアミノ酸置換を、肝細胞癌の 1 例に 2 塩基の欠失によるフレームシフト変異を認めた。この遺伝子がコードする蛋白は、成長因子の受容体の細胞外領域と相同性があり、細胞増殖に関与する遺伝子産物であることが示唆された。この仕事は、種々の癌発生及び進展の分子機構を明らかにする上で重要であり、学位を受けるに値するものである。