



Title	Isolation of Transformation Suppressor Genes by cDNA Subtraction : Lumican Suppresses Transformation Induced by v-src and v-K-ras
Author(s)	吉岡, 直寿
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41774
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	吉岡直寿
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第15007号
学位授与年月日	平成11年12月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科 病理系専攻
学位論文名	Isolation of Transformation Suppressor Genes by cDNA Subtraction: Lumican Suppresses Transformation Induced by v-src and v-K-ras (cDNA サブトラクション法によるトランスフォーメーション抑制遺伝子の単離: Lumican による v-src や v-K-ras のトランスフォーメーションの抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 野島 博 (副査) 教授 上田 重晴 教授 島田 和典

論文内容の要旨

(目的)

正常形質を保ちながら不死化した株化細胞は、癌遺伝子の導入によって容易にトランスフォームするが、成体の正常細胞に近いと考えられるヒトやラットの初代培養細胞は、癌遺伝子の導入による細胞のトランスフォーメーションに対して抵抗性を持つ。この性質の違いは、初代培養細胞に発現しているトランスフォーメーション抑制遺伝子によるものであることが細胞融合実験から示されている。初代培養細胞で発現している抑制遺伝子の同定は、成体での癌発生機構解明のために重要であるが、従来、分子レベルでの理解は乏しい。本研究では、初代培養細胞で特異的に発現している遺伝子を単離し、トランスフォーメーションの抑制に関わっている分子の同定を試みた。

(方法ならびに成績)

初代培養細胞に発現しているトランスフォーメーション抑制遺伝子を単離するため、ラット胎児初代培養細胞(REF)と株化細胞(F2408)を用いて、我々の研究室で高度に改良したcDNAサブトラクション法により、REFでは発現しているがF2408では発現量が低下している遺伝子をSubtracted cDNAライブラリー(1.6×10^4 cfu)中に濃縮した。このライブラリーから、実際に発現量に差が認められる遺伝子を30種類単離し TRIF (Transcript Reduced in F2408)と命名した。これらの中にトランスフォーメーションを抑制するものが含まれているかどうか確かめるため、初代培養細胞と株化細胞との間で特に発現量に差が認められたTRIF1(neuronatin)、TRIF2(HB-GAM)、TRIF3(lumican)についてactivated H-rasによるフォーカス形成実験を行った。その結果、TRIF3(lumican)とactivated H-rasを導入したF2408細胞では、activated H-rasによるフォーカス形成が抑制されることが分かった。TRIF1(neuronatin)とTRIF2(HB-GAM)では、そのような抑制効果は認められなかった。次に、lumicanによるトランスフォーメーションの抑制機構について詳細に検討するため、lumicanをstableに発現するF2408クローンを単離した。これらの細胞に、MRSV(v-src)やKiMSV(v-K-ras)を感染させ、軟寒天培地中でのコロニー形成、ヌードマウスでの造腫瘍性について実験した。その結果、lumican発現細胞では、v-srcやv-K-rasによるコロニー形成や造腫瘍性が抑制された。更に、ヒト癌の発生におけるlumicanの関わりについて検討するため、ラットやヒト正常組

織及びヒト癌細胞株における lumican の mRNA の発現についてノーザンプロット法により解析した。その結果、ほとんどのラットやヒトの正常組織では、lumican の発現が認められるが、多くの種類のヒト癌細胞株では lumican の発現が著減していた。

(総括)

初代培養細胞に発現しているトランスフォーメーション抑制遺伝子を単離するため、cDNA サブトラクション法により候補遺伝子を Subtracted cDNA ライブライリー (1.6×10^4 cfu) 中に濃縮した。この中から単離した遺伝子のうち、lumican が *v-src* や *v-K-ras* によるトランスフォーメーションを抑制することが分かった。このことから、lumican は初代培養細胞に発現しているトランスフォーメーション抑制遺伝子のうちの一つであると考えられる。更に、lumican は多くのヒト癌細胞株で発現量が著減していたことから、ヒト癌の発生に lumican の発現量の低下が関与している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

初代培養細胞にはトランスフォーメーションを抑制する遺伝子が発現していることは以前から知られていたことがあるが、この遺伝子が、何であるのかはほとんど解明されていなかった。

本論文では、初代培養細胞と株化細胞とでは癌遺伝子の導入によるトランスフォーメーションの感受性が異なることに着目し、cDNA サブトラクション法を用いて初代培養細胞に発現しているトランスフォーメーション抑制遺伝子の包括的な単離と機能解析を行ったものである。その結果、トランスフォーメーション抑制遺伝子を Subtracted cDNA ライブライリーに濃縮し、30種類の TRIF (transcript reduced in F2408) 遺伝子を単離し、その中の一つである TRIF3 (lumican) が *v-K-ras* や *v-src* によるトランスフォーメーションを抑制することから、初代培養細胞に発現しているトランスフォーメーション抑制遺伝子であることが示された。また、lumican は多くのヒト癌細胞株で発現量が低下していたことや、ヒト癌細胞の癌化形質を抑制することから、ヒト癌の発生との関連も示唆された。以上のことから、本研究はトランスフォーメーション抑制遺伝子を単離する有効な方法であり、ヒト癌の発生を解明する上でも重要な研究であることから、学位の授与に値するものと認める。