

Title	肝芽腫における $\beta$ -カテニン標的遺伝子matrix metalloproteinase-7(MMP-7、matrilysin)の転写亢進に関する検討
Author(s)	宇田津, 有子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42553">https://hdl.handle.net/11094/42553</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	宇田津有子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16103 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	肝芽腫における $\beta$ -カテニン標的遺伝子 <i>matrix metalloproteinase-7</i> ( <i>MMP-7, matrilysin</i> ) の転写亢進に関する検討
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 正  (副査) 教授 野村 大成 教授 岡田伸太郎

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

最近、腫瘍発生において Wnt シグナル伝達経路の  $\beta$ -カテニンの関与が注目されている。 $\beta$ -カテニンは、Wnt シグナル経路の最終段階において転写因子 T cell factor (Tcf)/lymphocyte enhancer factor (Lef) の coactivator として機能するが、adenomatous polyposis coli (APC) の異常や  $\beta$ -カテニン自身の異常により、その分解が阻害され、細胞内に過剰に蓄積すると、恒常的な転写活性化を惹起し、癌関連遺伝子等の転写を亢進させることにより腫瘍の発生・増殖に関係すると推測されている。

肝芽腫は胎児性腫瘍の性格を示す腫瘍であるが、小児期にみられる肝悪性腫瘍の主たるもので、以前から家族性大腸腺腫症患者における発生率の高いことが知られていた。また、最近には肝芽腫孤発例でも APC 遺伝子や  $\beta$ -カテニン遺伝子の変異が報告され、Wnt シグナル経路の異常との関連が示されてきた。本研究では、肝芽腫発生の成因の一端を明らかにするために、肝芽腫における  $\beta$ -カテニンの異常ならびにその標的遺伝子の一つとされる *Matrix metalloproteinase-7* (*MMP-7, matrilysin*) の発現について検討した。

#### 【方法ならびに成績】

生検または腫瘍摘出時に採取した肝芽腫組織16例を対象とした。病理組織学的分類では、epithelial type 11例、間葉成分を含む mixed type 5例であった。

##### 1. $\beta$ -カテニンの異常

遺伝子の異常：凍結標本より抽出した DNA を鋳型として、 $\beta$ -カテニン蛋白分解に必要なリン酸化を受ける部位のコード部分を増幅するプライマーセット (218bp)、ならびに同部分を含んだより広い範囲を増幅するプライマーセット (1115bp) を用いて PCR を行った。前者は SSCP 法に供し、点突然変異等の検出に、後者はアガロースゲル泳動で欠失変異の同定に用いた。結果として、リン酸化部位近辺の点突然変異 4 例、リン酸化部位を含む欠失 6 例を認め、16例中10例 (62.5%) に  $\beta$ -カテニン蛋白の蓄積につながると思われる遺伝子異常を検出した。

$\beta$ -カテニン蛋白の異常：パラフィン切片において抗  $\beta$ -カテニンモノクローナル抗体を用いた SAB 法による免疫染色を行った。非腫瘍部の正常肝細胞では、細胞膜周囲が弱く染色されるのみであったが、肝芽腫腫瘍細胞では、16例の全例 (100%) において核での強い染色を認めた。これら16例の肝芽腫においては  $\beta$ -カテニンの蓄積により惹起される転写活性化が起こっていることが示唆された。

## 2. MMP-7の発現

real-time RT-PCR: MMP-7に特異的なプライマーとTaqMan probeを作成した。凍結標本からtotal RNAを抽出後cDNAを作成し、既知の濃度の検体を段階希釈したものと未知の検体を同時測定することにより、mRNAを定量した。内部標準としてはGAPDHを用いた。比較対象として非腫瘍部肝臓組織11例での発現量を検討したが、すべて0.02以下であった。そこで0.02をカットオフ値とすると、肝芽腫16例中4例(25%)にMMP-7 mRNAの発現亢進(カットオフ値の2.38倍から7.64倍)を認めた。

免疫組織化学染色: パラフィン切片を用いて抗MMP-7モノクローナル抗体による染色を行った。非腫瘍部では肝細胞の細胞質が薄く染色されるのみであった。MMP-7 mRNA低発現症例の腫瘍細胞での染色はこれと同程度であったが、高発現症例の腫瘍細胞の細胞質には、より強い染色を認めた。また、間葉成分とされている類骨(osteoid)を含むmixed typeの症例においては、類骨内部の細胞の細胞質にも強い染色が観察された。

また、MMP-7 mRNA高発現症例の4例中3例(75%)はmixed typeであり、1例がepithelial typeであった。これに対し、低発現症例12例中ではmixed typeは2例(17%)のみで、他10例はepithelial typeであった(Fisherの直接確立計算法  $p=0.0632$ )。

### 【総括】

16例の肝芽腫において、 $\beta$ -カテニン遺伝子異常を10例(62.5%)、 $\beta$ -カテニン蛋白の蓄積を16例(100%)に認めた。 $\beta$ -カテニンについての異常が高率にみられたことから、 $\beta$ -カテニンを介するWntシグナル経路の異常が肝芽腫の成立に強く関連していることが示唆された。また、このシグナル経路の標的遺伝子のひとつとされるMMP-7の発現亢進が25%の肝芽腫症例に認められ、これらの例における腫瘍化に寄与している可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

肝芽腫は小児悪性固形腫瘍の代表的なものとして知られているが、本研究では、その発生因の一端を探るために、 $\beta$ -カテニンの異常および $\beta$ -カテニンの標的遺伝子の発現について検討し、Wntシグナル伝達経路がいかに関与しているかを明らかにすることを目的とした。その結果、肝芽腫の摘出標本においては $\beta$ -カテニン遺伝子異常を62.5%に、 $\beta$ -カテニン蛋白異常を100%に検出し、肝胚腫発生に $\beta$ -カテニンの異常が大きく関わっていることが示唆された。さらに、 $\beta$ -カテニンの標的遺伝子のひとつとされるマトリックスメタロプロテイナーゼ-7(MMP-7)の発現について検討し、肝芽腫の25%にmRNA、蛋白両レベル発現亢進を認めた。少なくともこれらの症例においては $\beta$ -カテニン異常がMMP-7の発現を誘導し、腫瘍発生に関与している可能性が示唆された。本研究はWntシグナル伝達経路における $\beta$ -カテニン異常が肝芽腫の発生に強く関与していることを示唆するものであり、その標的遺伝子の検索は肝芽腫の病態を明らかにするとともに治療への展望をもたらす可能性をも示すもので、学位の授与に値すると考えられる。