

Title	Transformation and Morphological Changes of Murine L Cells by Transfection with a Mutated Form of $\beta$ -Catenin
Author(s)	長澤, 豊
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42565">https://hdl.handle.net/11094/42565</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	なが 長 津 澤 ゆたか 豊
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16067 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 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Transformation and Morphological Changes of Murine L Cells by Transfection with a Mutated Form of $\beta$ -Catenin (変異型 $\beta$ -カテニン導入によるL細胞の悪性転化)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次  (副査) 教授 門田 守人 教授 戸田 達史

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

$\beta$ -カテニンはカドヘリンを介した細胞接着の構成成分であるのみならず、wnt/wingless シグナル伝達系においても重要な役割を果たしている。 $\beta$ -カテニンは細胞内では APC、axin、conductin と結合し、GSK3 $\beta$ により exon 3 のセリン/スレオニン残基をリン酸化されることにより分解されている。従って APC または  $\beta$ -カテニンの GSK3 $\beta$  のリン酸化部位に変異があると、 $\beta$ -カテニンは分解されず細胞内に蓄積され、Tcf/Lef と結合し核に移行して標的遺伝子を恒常的に転写活性化していると考えられている。本邦大腸癌においては、 $\beta$ -カテニンの変異は点変異ではなく、全て GSK3 $\beta$  のリン酸化部位を含む exon 3 の部分もしくは全体の欠失と報告されている。

本研究の目的は exon 3 を欠失した  $\beta$ -カテニンをマウス線維芽細胞である L 細胞に導入し、 $\beta$ -カテニン蓄積の細胞癌化に対する役割を明らかにすることである。

#### 【方法】

野生型の  $\beta$ -カテニンと exon 3 を欠失した変異型の  $\beta$ -カテニンの全コード領域をベクター pUHD10-3 (Tet-off Gene Expression System) に組み込み、リポフェクション法により L 細胞に導入、野生型  $\beta$ -カテニン発現クローン (L-N cells) と変異型  $\beta$ -カテニン発現クローン (L-MT cells) を樹立した。これらの細胞について細胞形態、細胞増殖様式の変化を検討した。

#### 【成績】

RT-PCR では L-N、L-MT cells 共に  $\beta$ -カテニンの強い発現がみられ、Dox 添加によりその発現は抑えられた。また L 細胞においても弱い発現がみられた。Western blot 法では L-MT cells において  $\beta$ -カテニンの蓄積がみられ、Dox 添加によりこの蓄積は抑えられた。L、L-N cells ではわずかな発現がみられたのみであった。 $\beta$ -カテニンモノクローナル抗体を用いた免疫染色では L-MT cells において細胞質及び核への  $\beta$ -カテニンの強い蓄積がみられたが、L、L-N cells では染色されなかった。また線維芽細胞様の L 細胞に比べ、L-MT cells では四角く角張ったような細胞形態の変化がみられ、cell-cell contact の増強もみられた。L-MT cells と L 細胞では増殖速度には特に差はみられなかった。しかし L 細胞が単層に発育し約 5 日目にコンフルエント後、増殖停止、約 8 日目ではほとんど死滅するのに対して、L-MT cells では約 5 日目のコンフルエント時にすでに重層化しており約 8 日目でも更に厚く積み重なって増殖し続ける発育様式の変化がみられた。さらに L-MT cells に Dox 添加し  $\beta$ -カテニン

発現を抑えたところ、コンフルエント時の細胞数の減少と約10日目以降の著明な細胞数の減少が観察された。次に血清要求性の変化をみるため、2% FCS 入り medium で培養し、細胞増殖を検討した。2% FCS 条件下で L-MT cells は10% FCS 条件には及ばないものの、L細胞に比べ高い増殖速度を示した。また Dox 添加により2% FCS 条件下での L-MT cells の増殖速度はL細胞と同程度となった。

#### 【総括】

exon 3 の欠失した変異型  $\beta$ -カテニンの L細胞への強制発現により、mRNA レベルでは野生型  $\beta$ -カテニンより発現が低かったものの、細胞質と核への変異型  $\beta$ -カテニンのタンパクレベルでの蓄積がおこることが明らかとなった。このことから変異型  $\beta$ -カテニンは分解が妨げられることにより、細胞内に蓄積すると考えられる。また変異型  $\beta$ -カテニンの蓄積により、L細胞は細胞形態が変化し、細胞の増殖率は影響されなかったものの、細胞の血清要求性の低下や、細胞が重層化する増殖様式の変化が起こることが明らかとなった。これらの現象は癌細胞の特性を表しており、変異型  $\beta$ -カテニンはL細胞に癌細胞の形質を誘導することが示された。以上より大腸癌でみられる変異型  $\beta$ -カテニンは発癌に重要な役割を担っていると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究はマウス線維芽様細胞L細胞を用いて、変異型  $\beta$ -カテニンの細胞悪性化に対する役割を検討したものである。大腸癌臨床例で実際にみられた変異 (GSK 3  $\beta$  のリン酸化部位を含む exon 3 の欠失) を有する  $\beta$ -カテニンを発現調節型のベクターに組み込みL細胞に導入し、変異型  $\beta$ -カテニンが恒常的に発現している細胞株 (L-MT) を作成した。ウェスタンブロット、免疫染色にてL-MT では変異型  $\beta$ -カテニンの細胞質、核への蓄積がみられた。またL-MT では  $\beta$ -カテニン/TCF の転写活性の亢進がみられた。更に、発育様式ではL-MT では細胞はコンフルエント後も重層して増殖し、低血清条件下においても増殖能を保つ変化がみられた。これらの変化は癌細胞の特性の一端を表しており、本論文は変異型  $\beta$ -カテニンの発癌に対する意義を考える上で示唆に富む研究であり、学位に値すると考える。