



Title	小児悪性固形腫瘍における β -Catenin異常に関する検討
Author(s)	黒田, 征加
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42603
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	くろ だ せい か 黒 田 征 加
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 8 6 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 2 月 13 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	小児悪性固形腫瘍における β -Catenin 異常に関する検討
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 田 正 (副査) 教 授 野 口 眞 三 郎 教 授 岡 田 伸 太 郎

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

β -catenin は細胞接着因子である E-cadherin の裏打ちタンパクとして発見され、cadherin の細胞接着性の制御に関わるが、他方、Wnt/Wingless シグナル伝達系の一員としても重要な特徴を有することが知られている。 β -catenin の細胞内含量は、APC (adenomatous polyposis coli) タンパク、ならびに axin と結合し、GSK-3b (glycogen synthase kinase-3b) によるリン酸化を受けることで調節されている。APC 遺伝子、あるいは β -catenin 自体に異常があると、細胞質内の β -catenin が分解されず蓄積し、これが核内へ移行し、転写因子である T cell factor (Tcf) /Lymphocyte enhancer factor (Lef) と結びつく。このことが、c-myc、cyclin D1といった下流の標的遺伝子の恒常的活性化につながり、腫瘍発生、癌化に関連することが推測されている。

近年、結腸癌、肝癌、前立腺癌などにおいて β -catenin 遺伝子変異が報告され、腫瘍との関わりが示唆されているが、小児悪性固形腫瘍に対する関与はまだ明らかにされていない。そこで、小児悪性固形腫瘍における β -catenin の遺伝子変異を検索し、また、免疫組織学的手法を用いて、蛋白発現の検討を行った。

[方法]

生検あるいは腫瘍摘出時に組織を採取した神経芽腫24例、Wilms 腫瘍16例、肝芽腫13例、横紋筋肉腫 8 例、計 61例を対象とした。

1 : β -catenin 遺伝子の異常

凍結保存 (-70℃) 標本より DNA を抽出後これを鋳型として、 β -catenin 遺伝子の exon3を増幅する (218bp) primer set (BCAT1/BCAT2)、ならびに exon2から exon4に納まる領域を増幅する (1115bp) primer set (BCAT3/BCAT4) を用いて PCR 反応を行った。前者は SSCP 法に供し、点突然変異等の遺伝子異常の検出に用い、後者はアガロースゲルにて泳動することにより exon3領域を含むより大きな欠失変異の同定に用いた。さらに欠失を示唆した標本については、BCAT3/BCAT4を Primer とし RT-PCR を行うことにより、cDNA レベル (467bp) でも欠失の存在を確認した。

2 : β -catenin 蛋白発現の異常

β -catenin 蛋白発現の検索は免疫組織学的手法を用いて行った。各腫瘍組織のバラフィン包埋標本より 3 μ m の切片を薄切し、抗 β -catenin マウスモノクローナル抗体 (Transduction Laboratories) を用いた SAB 法による免

疫染色を行った。腫瘍部ならびに非腫瘍部での染色様式を比較した。結腸癌など、他種の腫瘍では、核での強い染色が観察されており、腫瘍部に見られる核や細胞質での染色を、蛋白レベルでの発現異常として検討した。

[成績]

I) β -catenin 遺伝子異常について

神経芽腫、横紋筋肉腫では検索した全例において β -catenin 遺伝子異常を認めなかった。Wilms 腫瘍においては、4/16例 (25%) に遺伝子異常を認めた。4 例とも exon3 codon45 における変異であり、3 例が点突然変異、1 例が欠失であった。肝芽腫では10/13例 (77%) に遺伝子異常がみられ、6 例が欠失、4 例が点突然変異であった。いずれの異常も GSK3b によるリン酸化部位 (codon31~45) における変異あるいは欠失であった。

II) β -catenin 蛋白の発現について

肝の非腫瘍部の正常肝細胞では、細胞膜に弱く染色されるのみで、細胞質、核には染色がみられなかった。腎、副腎においても同様の染色様式であった。一方、神経芽腫では全例において核への集積を認めなかったが、Wilms 腫瘍では、 β -catenin 遺伝子異常を示した 4 例をふくむ 6 例 (38%) において核への集積を認めた。肝芽腫では、検索した全例 (100%) において核への集積を認めた。横紋筋肉腫では、2 例 (25%) に核への集積を認めた。

検査を行った61例のうち21例 (34%) に β -catenin 蛋白の核への集積を認めたが、このうち14例 (67%) では遺伝子異常を認め、残る 7 例 (33%) では遺伝子異常を認めなかった。

[総括]

小児悪性固形腫瘍の手術時摘出標本を用いて、 β -catenin に関する遺伝子の異常、ならびに免疫組織学上での蛋白の発現異常についての検討を行い、以下の結果を得た。

1. 神経芽腫では β -catenin 遺伝子、蛋白レベルとも異常を認めず、 β -catenin 異常との関与は否定的と考えられた。
2. Wilms 腫瘍、肝芽腫、横紋筋肉腫において、 β -catenin 蛋白の発現異常を示す症例があり、関与が示唆された。
3. 特に肝芽腫では高率な遺伝子異常とともに、全例において β -catenin 蛋白の異常発現が観察され、 β -catenin の集積が腫瘍の発生に深く関与していることが示唆された。
4. β -catenin 蛋白の発現異常が見られた症例のうち35% において β -catenin 遺伝子異常を認めず、 β -catenin の異常発現を誘導する他の病態が、腫瘍化に関わっている可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

β -catenin は接着因子である E-cadherin の裏打ち蛋白として発見され腫瘍においては浸潤、転移に際し重要であると考えられてきた。一方、生体の初期発生、形態形成に関わる Wnt/Wingless transduction pathway の一員であることが判明し、多種の癌においてその異常が指摘されるようになった。

小児悪性固形腫瘍における β -catenin のかわりについては断片的な検討はいくつかみられるが、まとまったものはまだみられていない。本研究では、61例の小児悪性固形腫瘍手術時摘出標本を用いて、 β -catenin 異常の関わりに対し、遺伝子、蛋白発現の両面から検討した。

その結果、神経芽腫では β -catenin 遺伝子、蛋白レベルとも異常を認めず、Wilms腫瘍、肝芽腫、横紋筋肉腫において β -catenin 蛋白の発現異常を示す症例がみられた。特に、肝芽腫では高率な遺伝子異常と共に全例において β -catenin 蛋白の異常発現が観察され、 β -catenin の集積が腫瘍発生に深く関与していることが示唆された。これらの異常は、転移の有無、悪性度との相関はなく、腫瘍によって遺伝子異常発現の病態に差があることが判明した。

一方、発現異常が見られた症例のうち35%において β -catenin 遺伝子異常を認めず、 β -catenin の発現を誘導する他の病態が腫瘍化に関わっている可能性が考えられた。

本研究は、未だ明らかにされていない小児悪性固形腫瘍発生の成因、病態、治療の今後における解明に大きな示唆を与えるもので、学位の授与に値するものと考えられる。