



Title	Structure, Expression and Chromosome Mapping of MLZE, a Novel Gene Which Is Preferentially Expressed in Metastatic Melanoma Cells
Author(s)	渡部, 健二
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42614
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	わた べ けん じ 渡 部 健 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 4 2 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	Structure, Expression and Chromosome Mapping of <i>MLZE</i> , a Novel Gene Which Is Preferentially Expressed in Metastatic Melanoma Cells (転移性悪性黒色腫細胞において選択的に発現される新規遺伝子 <i>MLZE</i> の構造、染色体上の座位そして発現様式)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 野 島 博 (副査) 教 授 松 澤 佑 次 教 授 吉 川 邦 彦

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

悪性黒色腫は、水平方向に進展するのみで皮下にほとんど浸潤しなければ (RGP) 外科切除でほとんど治癒するが、皮下への浸潤が始まると (VGP) 遠隔転移巣を形成し個体を死に至らしめるようになる。このことから、悪性黒色腫は RGP から VGP に進展 (progression) する過程で浸潤転移能を獲得すると考えられているが、その過程における遺伝子発現の変化は十分に理解されていない。本研究では、マウス悪性黒色腫より単離した新規遺伝子 *MLZE* のヒトホモログの悪性黒色腫標本における発現を免疫染色で調べ、この遺伝子の発現と RGP から VGP への progression との関係を検討した。

【方法ならびに成績】

ヒト悪性黒色腫の progression モデルとしてマウス悪性黒色腫細胞株 B16-F10 と B16-BL 6 を選んだ。B16-BL 6 は B16-F10 を膀胱壁浸潤させるセレクションにより得られた細胞株で、B16-F10 が持たない自然転移能を獲得している。これらの細胞の転写産物を差分化ライブラリーで比較し、B16-BL 6 で多く発現されている遺伝子として 8 種類の遺伝子を同定した。この中の 1 つであるマウス新規遺伝子 *MLZE* のマウス細胞株における発現をノザンプロットで調べたところ、正常メラノサイト由来の細胞株では発現が見られず、マウス悪性黒色腫由来の細胞株では転移能の亢進とともに発現の上昇が見られた。

この遺伝子のヒトホモログをヒト HeLa cDNA ライブラリーより単離した。塩基配列を決定したところ、ロイシンジッパーと核移行シグナルを有する 508 アミノ酸をコードすると推定された。GFP 融合蛋白の細胞内局在を蛍光顕微鏡で調べたところ、細胞質における分布が見られた。核移行シグナル自体には核移行活性が見られたため、この蛋白は細胞の条件によって核内に移行する可能性が示唆された。*MLZE* 遺伝子の発現をヒト多臓器ノザンプロットで調べたところ、気管と脾臓のみで微量の発現が見られた。ゲノム遺伝子の断片をプローブとした FISH により *MLZE* 遺伝子のヒト染色体座位を調べ、第 8 染色体長腕 24.1-2 に同定した。この領域は悪性黒色腫や卵巣癌、脳腫瘍、乳癌、肺癌で増幅されていることが報告されている。

MLZE がコードする蛋白質 (Mlze) の細胞内におけるはたらきは不詳であるが、発現様式と染色体座位の結果からこの遺伝子が悪性黒色腫の progression に関与していると考え、Mlze に対するポリクローナル抗体を作成し、手術摘出標本を用いた免疫染色を行った。悪性黒色腫 26 例について免疫染色を行ったところ、8 例 (31%) で陽性であっ

た。一方、正常皮膚のメラノサイト、およびメラノサイトの良性腫瘍である真皮母斑は染色されなかった。悪性黒色腫の症例を浸潤度に基づいてRGP群とVGP群に分けて発現率を調べると、RGP群では15例中2例(13%)で陽性、VGP群では11例中6例(55%)で陽性であり、陽性率はVGP群で高かった。一方、比較対照として悪性黒色腫のprogressionとともに発現が上昇すると報告されているc-Mycの抗体を用いた免疫染色を連続切片で行ったところ、RGP群では15例中3例(20%)、VGP群では11例中4例(36%)で陽性であった。陽性率はVGP群の方が高かったが、その差は統計学的に有意でなかった。その他に、腫瘍内部での発現分布を調べてみると、c-Myc陽性7例中6例で腫瘍全体の一様な染色が見られ、1例については腫瘍先進部における染色の低下が見られた。一方、Mlze陽性8例中6例で腫瘍全体の一様な染色が見られ、2例については腫瘍先進部における染色の増強が見られた。

【総括】

マウス悪性黒色腫B16-BL6からB16-F10を差分化したライブラリーよりマウス*MLZE*遺伝子を単離した。そのヒトホモログの悪性黒色腫標本における発現を免疫染色で調べたところ、RGP群は2/15例、VGP群は6/11例陽性で、有意にVGP群で陽性率が高かった。一部の症例においては腫瘍浸潤部での発現が腫瘍表層部と比較して増強していた。

悪性黒色腫はClark level IIとlevel IIIの間で予後が悪化する。Mlzeの発現はこのlevelを境界として有意に陽性例が増えたことから、*MLZE*遺伝子発現上昇が悪性黒色腫のRGPからVGPへのprogressionを惹起する遺伝子変化の一つである可能性が示唆された。さらに、悪性黒色腫の浸潤部における良好な染色性は、HMB45抗体などの既存の抗体が持たない特徴であり、浸潤度の正確な診断に有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

悪性黒色腫は、RGPからVGPへ移行する過程で浸潤転移の形質を獲得することが知られているが、これに伴う遺伝子変化は十分に理解されていない。本研究では、この過程における遺伝子変化を調べるために、異なる浸潤転移能を持つマウス悪性黒色腫細胞株B16-F10とB16-BL6に注目し、サブトラクション技術を用いて高浸潤転移性細胞株BL6で発現が高い新規遺伝子*MLZE*を単離した。*MLZE*遺伝子はRGP群の患者よりもVGP群の患者で高率に発現されていたことから、*MLZE*遺伝子の発現上昇が浸潤転移を惹起する遺伝子変化の一つである可能性が示唆された。*MLZE*遺伝子の座位が示された第8染色体長腕24.1-2は、悪性黒色のみならず卵巣癌、脳腫瘍、乳癌、肺癌においても染色体増幅が報告されている領域であり、*MLZE*遺伝子の浸潤転移への関与は卵巣癌、脳腫瘍、乳癌、肺癌においても想定された。さらに悪性黒色腫の免疫染色は、腫瘍先進部を良好に染色する傾向が見られたことから、悪性黒色腫の正確な診断の補助として役立つものと期待された。以上より、本研究は浸潤転移の研究における今後の発展性が期待され、学位の授与に値すると考えられる。