The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Isolation of a Novel Gene on 8p21.3-22 Whose Expression is Reduced Significantly in Human Colorectal Cancers With Liver Metastasis
Author(s)	大山, 司
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43160
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

【42】

氏　　名	大山　司（おおやま　つかさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16466　号
学位授与年月日	平成13年7月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Isolation of a Novel Gene on 8p21.3-22 Whose Expression is Reduced Significantly in Human Colorectal Cancers With Liver Metastasis （肝転移を有するヒト大腸癌でその発現が低下し、染色体8p21.3-p22にマップされる新規遺伝子の同定）
論文審査委員	（主査） 教授　松田　暉 （副査） 教授　門田　守人　　教授　戸田　達史

論文内容の要旨

【目的】

消化器癌治療においては種々の進歩が見られるものの、進行癌に対しては、未だ有効な治療法は開発されていない。その基盤には、癌の生物学的特性である転移能を決定あるいは反映する基礎的データが不足していることも関与していると考えられる。癌が所有する種々の形質発現のうち、特に転移能の獲得には数多くの段階を要し、その過程において数多くの遺伝子が関与していると考えられる。現在までにいくつかの遺伝子が同定されているが、転移のメカニズムの解明には、さらなる遺伝子の同定が必要である。本研究は、大腸癌の肝転移に関与すると考えられる新たな候補遺伝子を同定することを目的とし、同一親株由来で転移能の異なる3種のマウス大腸癌細胞株の遺伝子発現をdifferential display法により比較し、上記細胞株間で発現に差のある遺伝子のヒトにおけるカウンターパートを同定し、これがヒト大腸癌の転移と関わりがあるか否かの検討を行った。

【材料・方法】

1．細胞株およびdifferential display

マウスの大腸癌細胞株NL4、NL17、NL22は同一の親株由来で、マウスに移植されたとき異なる転移能を示す。NL4は、転移能を示さず、NL17は、血管内に移植されたとき、転移能を示すが、皮下移植では転移しない。NL22は、血管内、皮下のいずれに移植された場合でも、転移能を示すことが知られている。上記の3細胞株よりmRNAを抽出し、cDNAを作成し、40種の5'-arbitrary primerと4種の3'-anchored primerを用いて、differential displayを施行した。

2．マウスcDNAライブラリー・スクリーニングとヒト・カウンターパートの同定

Differential displayにてバンドの濃度に差のある遺伝子断片をプローブとして、上記3細胞株より抽出したmRNAに対してノザン・ブロットを行い、発現に差のあるいくつかの遺伝子断片を得た。コンピュータによる相同性検索にて、これらの遺伝子のうち、いくつかのヒトにおけるカウンター・パートの配列を、コンピューターを用いて相同性検索した。

3．転移を有するヒト大腸癌における発現

ヒト大腸癌の手術検体より、mRNAを抽出し、cDNAを作成し、リアルタイム定量RT-PCRにて、上記のヒトにおけるカウンター・パートの発現を、大腸癌において検討した。

4．ヒトにおけるカウンター・パートの遺伝子配列の決定

転移を有するヒト大腸癌において発現が異なる遺伝子配列を決定するために、ヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

5．遺伝子変異の検出

ヒト大腸癌の手術検体より、ゲノム DNA を抽出し、PCR-SSCP 法を用いて、上記スクリーニングにより配列を決定した遺伝子の構造領域における遺伝子変異を検討した。

【結果】

単離された遺伝子は4.4kb と1.7kb の 2 種類の転写産物をもち、これらは非コード領域のスプライシングの違いによるものであった。この遺伝子の発現をリアルタイム定量 RT-PCR にて検討したところ、同時性肝転移をもつ大腸癌症例において約69%（11/16例）で原発ならびに転移巣で、非癌部に比し明らかな発現低下を認めた。一方、手術時に肉眼的遠隔転移のない大腸癌症例でも46%（6/13例）で原発巣での発現低下を認めた。また、コンピュータによる相同性検索にて、この遺伝子は、大腸癌、肝細胞癌、非小細胞肺癌で良く知られている染色体 8p21.3-p22上の共通欠失領域にマップされた。そこで、PCR-SSCP にて遺伝子変異を検索したところ、大腸癌51例中 1 例、肝細胞癌30例中 1 例、非小細胞肺癌30例中 1 例の計 3 例で変異を認めた。この遺伝子はコンピューター解析上、4 か所の膜貫通領域を有すると考えられた。なお、既知の遺伝子やモチーフ配列との相同性はなく、現時点ではその機能の予測は困難である。

【総括】

1．同一親株より派生し、マウスにおける転移能に差のある 3 種のマウス大腸癌細胞株において、differential display を施行することにより、転移能を有する細胞株で発現が低下する遺伝子断片を得た。
2．上記遺伝子のヒトにおけるカウンターパートを同定した。このヒト遺伝子は肝転移を有するヒト大腸癌の多くでその発現が低下し、またコード領域に遺伝子変異を有する症例も存在した。さらに、既知遺伝子との相同性はなく、染色体 8p21.3-p22にマップされた。
3．この遺伝子の機能解析は今後の課題であるが、今回得られた結果より、本遺伝子は、転移能の獲得を含む癌の進展に対し抑制的に機能する可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

転移を有する消化器進行癌に対する有効な治療法は未だ確立されていない。新たな治療法を開発するためには、癌細胞の生物学的特性をさらに追求し、解析することが必要である。特に、癌の転移能の獲得には数多くの段階を要し、その過程において数多くの遺伝子が関与していると考えられる。現在までにいくつかの遺伝子が同定されているが、転移のメカニズムの解明には更なる遺伝子の同定が必要である。

本研究は、大腸癌の肝転移に関与する新たな候補遺伝子を同定することを目的とした。

その結果、同一親株由来で、転移能の異なる 3 種類のマウス大腸癌細胞株において、発現に差のある新規遺伝子を differential display にて検出し、さらに、ヒトにおけるカウンター・パートを同定した。この遺伝子の手術検体における異常を検索したところ、同時性肝転移を有する大腸癌症例において、原発巣および転移巣での発現が非癌部より低下している症例を高率に認めた。また、コンピューターによる相同性検索の結果、大腸癌、肝細胞癌、非小細胞肺癌における共通欠失領域である 8p21.3-p22にマップされていることが判明し、遺伝子変異を有する症例も得られた。

以上の結果は、この新規遺伝子が転移能の獲得を含む癌の進展に対し抑制的に機能する可能性を示すものであり、癌細胞の生物学的特性の解明に寄与する可能性を有し、学位に値するものと考えられる。