

Title	Correlation of Beta-Catenin and Cyclin D1 Expression in Colon Cancers
Author(s)	宇都宮, 健弘
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44492
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/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	宇都宮 健 弘
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 17202 号
学位授与年月日	平成 14 年 5 月 15 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	Correlation of Beta-Catenin and Cyclin D1 Expression in Colon Cancers (大腸癌における β -カテニンとサイクリン D1 の相関性について)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 野島 博 教授 野口眞三郎

論文内容の要旨

(目的) 上皮系細胞において β -カテニン蛋白の多くは細胞膜裏打ち蛋白として存在し、細胞間接着分子 E-カドヘリンを細胞骨格に連結し強固な細胞間接着を形成するという役割を果たしている。一方、その一部は細胞質プールとして存在し、転写因子 TCF/LEF と結合しその転写活性を促進するという全く異なる働きを有している。近年、 β -カテニン自身や β -カテニンの発現を制御する APC や Axin の遺伝子変異が、大腸癌、肝癌、子宮癌など様々な腫瘍で見つかっており、 β -カテニンは癌化シグナルの中心をなすことが明らかになった。これらの遺伝子変異は β -カテニンの細胞質プールを増加するが、 β -カテニンは他にも増殖因子 Wnt、リン酸化酵素 GSK3beta など種々の制御をうけており、癌における β -カテニンの関与を示すには直接 β -カテニンの細胞質プールを評価することが必要である。一方、 β -カテニン/TCF の標的分子は c-myc、サイクリン D1、fibronectin、metalloprotease など癌の増殖、浸潤転移など様々な遺伝子が報告されているが、 β -カテニンが発癌の初期に関係するという点で特に細胞周期調節分子サイクリン D1 の関与が重要であると想定される。そこで今回、大腸癌症例を用いて β -カテニンの細胞質プールを評価し、癌遺伝子サイクリン D1 との関係性を明らかにしようと試みた。

(方法) 各種癌細胞株及び癌組織を界面活性剤を含まない低張液で膨化させた後ホモジナイズ、遠心分離し可溶性分画、不溶性分画に分けた。抗 E-カドヘリン抗体 (Takara Shuzo 社)、抗 β -カテニン抗体 (Transduction 社)、抗ヒトサイクリン D1 抗体 (Santa Cruz 社) を用いてウェスタンブロットを行い、その局在及び発現量を定量化した。また、1998 年 8 月から 2000 年 1 月の間に当科にて切除した大腸癌 70 例を対象とし、 β -カテニン、サイクリン D1 の免疫組織染色を行った。 β -カテニンは細胞質、核における発現に注目し癌細胞の 50%以上が染色された場合を過剰発現 (+)、それ以下を減弱発現 (-) とした。サイクリン D1 は癌細胞の核の 10%以上が染色されたものを過剰発現 (+)、それ以下を (-) とした。

(結果) 可溶性分画は細胞質ゾルを主体とし LDH 活性の 80%以上は可溶性分画に含まれた。一方、E-カドヘリン、 α -カテニン蛋白などの膜蛋白は全て不溶性分画に存在した。 β -カテニンは可溶性、不溶性両方の分画に存在するが、大腸癌細胞 SW480 (APC に遺伝子変異あり)、HCT116 (β -カテニンに遺伝子変異あり) では約 40%の β -カテニンは可溶性分画に存在するのに対し、これらの異常のない MDCK、TE2 では僅か約 10%の β -カテニンが可溶性分画に存在した。正常大腸粘膜組織において β -カテニンの約 80%は不溶性分画に存在した。正常粘膜、大腸癌で不溶性分画の β -カテニン量に差を認めなかった (425 ± 124 v.s. 388 ± 150 arbitrary unit, $p=0.63$)。しかし、可溶性分画

の β -カテニンは大腸癌では正常粘膜より有意に高い値を示した (84 ± 34 v.s. 128 ± 33 arbitrary unit、 $P < 0.01$)。一方、サイクリン D1 蛋白も正常粘膜より大腸癌で高発現を示した (273 ± 150 a.u. v.s. 683 ± 374 a.u. $p < 0.0001$)。これらの蛋白発現量の相関を一次回帰で検討すると、サイクリン D1 と可溶性分画の β -カテニンとの間には有意な正の相関性がみられた ($r^2 = 0.3221$ 、 $P = 0.0016$)。しかし、E-カドヘリン、不溶性分画 β -カテニンとサイクリン D1 の発現の間には有意な相関は存在しなかった。

免疫組織染色において β -カテニンおよびサイクリン D1 の過剰発現 (+) 例は各々 35 例 (50%)、30 例 (43%) であった。サイクリン D1 (+) は β -カテニン (+) 症例では 74% (26/35) と高頻度であるが、 β -カテニン (-) 症例では僅かに 11% (4/35) であり、両者の間には強い正の相関が認められた ($p < 0.001$)。免疫組織染色とウェスタンブロットの発現はほぼ一致しており、 β -カテニン、サイクリン D1 とともに免疫染色で過剰発現を示した症例はウェスタンブロットでも高値を示した ($p < 0.0001$)。臨床病理学的因子とサイクリン D1、 β -カテニンそれぞれの発現の間に有意な関連はなかった。但し、 β -カテニン (-) かつサイクリン D1 (-) の症例はそれ以外の症例と比べて癌深達度が浅かった ($p < 0.05$)。

(総括) 蛋白分画することにより β -カテニンの細胞質プールを定量化することが可能であった。 β -カテニンの細胞質プールはヒト大腸癌において増加し、しかもサイクリン D1 の発現量と相関していた。これは *in vitro* で示された β -カテニンによるサイクリン D1 の転写促進が、実際のヒトの癌化過程において起きている可能性を示唆するものである。 β -カテニンは細胞接着の異常を細胞増殖の異常に結びつける **key molecule** である。今後は癌化のどの段階でこのような変化が生じているか癌の悪性度にどのような影響を与えるかなどの検討が期待される。

論文審査の結果の要旨

β -catenin は E-cadherin を細胞骨格に連結し細胞間接着を形成する一方、細胞質に存在し、転写因子 TCF と結合して転写活性を促進する。 β -catenin 自身や β -catenin の発現を制御する種々の遺伝子の変異などによる細胞質 β -catenin 増加が癌化に関与することが細胞レベルで報告されている。また、 β -catenin/TCF の標的分子として細胞周期調節分子 cyclin D1 の関与が指摘されている。本研究では、切除した大腸癌組織を用いて β -catenin、cyclin D1 の免疫組織染色と、大腸癌組織の可溶性分画、不溶性分画のウェスタンブロット法を行い、細胞質 β -catenin と cyclin D1 との関係明らかにしようと試みた。その結果、細胞質 β -catenin と cyclin D1 の発現は相関すること、大腸癌の可溶性分画 β -catenin 量は正常粘膜のそれよりも多く、cyclin D1 量は可溶性分画 β -catenin 量と相関することが明らかとなった。また、細胞質 β -catenin と cyclin D1 の発現がともに過剰型 (+) であったものは、ともに減弱型 (-) であったものに比べ、臨床病理学的に悪性度が高い傾向にあった。以上、本研究は、細胞質 β -catenin、cyclin D1 の免疫染色と、可溶性分画 β -catenin の定量化を行うことで *in vitro* で示された β -catenin による cyclin D1 の転写促進が、実際のヒトの癌化過程において起きている可能性を示唆したものと評価でき、博士 (医学) の学位に値するものと認める。