

Title	In vitro RNA interference against β -catenin inhibits the proliferation of pediatric hepatic tumors
Author(s)	Surasak, Sangkhathat
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47406
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	スラサク サンカタッス Surasak Sangkhathat
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20963 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	<i>In vitro</i> RNA interference against β -catenin inhibits the proliferation of pediatric hepatic tumors (β カテニンを標的とした RNA 干渉による小児肝癌増殖抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 福澤 正洋 (副査) 教授 大菌 恵一 教授 青笹 克之

論文内容の要旨

[目 的]

肝芽腫や成人型肝癌といった小児に発生する肝悪性腫瘍（以下小児肝癌）の治療成績は、近年の集学的治療の発達により向上したが、外科的切除が困難な症例においては、未だにその予後は不良である。最近、小児肝癌の発癌に Wnt シグナル系が関与していることが明らかとなってきた。特に Wnt シグナル系の中で主要な役割を果たしている遺伝子、 β カテニンの変異が小児肝癌において高率に存在することが報告されている。しかしながら、 β カテニン遺伝子変異が小児肝癌の発癌に関与する詳細なメカニズムは未だ明らかにされていない。そこで β カテニン変異を有する小児肝癌細胞株を用い、RNA 干渉による β カテニン遺伝子発現抑制を行った。

[方法ならびに成績]

小児肝癌から樹立された細胞株である HepG2 および HuH-6 を用いた。両細胞株とも β カテニン変異を有しており、通常は細胞膜にのみ発現する β カテニン蛋白が核内に高発現して集積を来している。なお、 β カテニン変異を有しない肝芽腫細胞株 HuH-7 を比較対象として用いた。

まず、両細胞株の β カテニン変異を確認するために、 β カテニン遺伝子エクソン 3 を含むプライマーを設計し、PCR およびシーケンスを行って塩基配列を検索した。この結果、HepG2 においては、コドン 25-140 に 348 塩基の in-frame deletion を認め、その結果 116 アミノ酸の欠失を来していた。HuH-6 においてはコドン 34 にミスセンス変異を認め、Gly34Val のアミノ酸置換が生じていた。HuH-7 は野生型 β カテニン配列を有していた。

次に β カテニンに特異的な siRNA をそれぞれの細胞株にトランスフェクションした。トランスフェクションには、HVJ-envelope 法を用い、トランスフェクション効率は、HepG2、HuH-6、HuH-7 でそれぞれ、60%、60%、40% であった。 β カテニンに特異的な siRNA を用いた siRNA 群、siRNA を加えずトランスフェクション試薬のみを加えた mock 群、無処理群の 3 群を作成して比較検討した。

β カテニン mRNA 発現を reverse-transcription real-time PCR (real time RT-PCR) にて測定したところ、siRNA 導入後 48 時間の時点で、HepG2、HuH-6、HuH-7 のいずれの細胞株においても siRNA 群において mRNA の有意

な発現低下を認めた。次にβカテニン蛋白の発現レベルを Western blotting 法にて検索したところ、すべての細胞株の siRNA 群において明らかな発現低下を認めた。さらにβカテニンの標的遺伝子である c-myc と cyclinD1 の mRNA 発現をこれらの細胞において測定したところ、βカテニン遺伝子変異をもつ細胞株である、HuH-6 と HepG2 にのみ発現低下が認められた。

HuH-6 においてβカテニン発現低下の経時的変化を観察すると、siRNA 導入後3日間発現低下が持続することが明らかとなった。mRNA 発現が最も低下するのは導入後2から3日目で、正常コントロールの40%にまで発現が低下していた。標的遺伝子である c-myc と cyclinD1 も同じパターンで発現低下を示した。

次に蛋白局在を検索するために、抗βカテニン抗体により蛍光免疫組織染色を行った。HepG2 および HuH-6 において、siRNA 導入前に核内に集積していたβカテニン蛋白が、siRNA 群において消失していることが観察された。特に HuH-6 においては、核内の蛍光が完全に消失し、細胞膜にのみ弱い蛍光を認めるのみとなった。HepG2 においては、いくつかの細胞で弱い核内の蛍光が残るものの、ほとんどの細胞において「核が抜けた」染色状態を示した。なお、HuH-7 においては、正常状態で見られる細胞膜のβカテニン蛋白が、siRNA 導入後はほとんど認められなくなっていた。

細胞増殖能を検索するために、WST-1 法を用い細胞活性を測定した。すべての細胞株の siRNA 群において、有意な生細胞数の減少が認められた。増殖抑制の程度は HuH-7 において最も軽度であった。WST-1 assay の結果は直接細胞数を計測した結果と一致しており、増殖抑制は、HepG2 および HuH-6 においては約4日間持続し、HuH-7 においては2日間以内であった。

[総 括]

本実験においては、siRNA 導入により、mRNA レベルのβカテニン遺伝子発現を有意に抑制することができた。同時に、βカテニン蛋白の核内集積が消失し、細胞全体の蛋白量も減少した。これにより、βカテニン変異を有する細胞株において、腫瘍細胞の増殖が有意に抑制された。以上より、βカテニン変異を有する小児肝癌に対する in vitro での増殖抑制モデルが確立され、新規分子標的治療の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、肝芽腫や成人型肝癌といった小児肝癌において高頻度に認められるβカテニン遺伝子変異に注目し、肝芽腫および小児肝細胞癌由来でβカテニン変異をもつ細胞株、HuH-6 および HepG2 を用いて RNA 干渉によるβカテニン発現抑制実験を行ったものである。HuH-6 および HepG2 いずれの細胞株においても、βカテニンに特異的な siRNA 導入によりβカテニン発現が80から90%に低下した。また両細胞株において、βカテニン蛋白の核への異常集積が消失し、同時にβカテニン/Wnt シグナル系の標的遺伝子である c-myc および cyclinD1 の発現も抑制されることが明かとなった。さらに両細胞株において増殖能が一時的に抑制されることも判明した。

これらのデータから、小児肝癌の腫瘍性獲得に、βカテニン変異、ひいては同遺伝子が主要な役割を果たしている Wnt シグナル系の異常が密接に関与していることが明かとなった。また、RNA 干渉を用いた特異的なβカテニン発現抑制による小児肝癌の分子標的治療の可能性が示された。

以上により、本研究は学位の授与に値すると考える。