



Title	Loss of c-abl facilitates anchorage-independent growth of p53-and RB-deficient primary mouse embryonic fibroblasts
Author(s)	鈴木, 淳
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47488
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	すず 鈴 木 じゅん 淳
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20905 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 医学系研究科情報伝達医学専攻
学 位 論 文 名	Loss of <i>c-abl</i> facilitates anchorage-independent growth of p53- and RB- deficient primary mouse embryonic fibroblasts (<i>c-abl</i> の欠損は p53 と RB が欠損した初代細胞の足場非依存性増殖を促進する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 裏出 良博 (副査) 教 授 岡田 雅人 教 授 目加田英輔

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

c-abl 遺伝子はエイベルソン白血病ウイルスが保持する *v-abl* 癌遺伝子の原癌遺伝子であり、チロシンリン酸化酵素をコードしている。通常、*c-Abl* の酵素活性は厳密に制御されており、酵素活性が恒常的に活性化した *v-Abl*、もしくは *c-Abl* の変異体においては細胞の癌化を促進することが知られている。一方で、正常な *c-Abl* が細胞の癌化にどのように関わるかは知られていない。そこで本論文においては、*c-Abl* の癌化における役割を初代培養細胞系において解析した。

[方法]

1. 初代細胞の不活化

初代細胞の不活化にはウイルス由来の癌遺伝子 SV40T 抗原を用いた。まず、*c-abl* ヘテロマウスを交配し、E16 の胎児から繊維芽細胞 (MEFs) を調製した。3 回程継代した後、ウイルス産生細胞を用いて産生された SV40T 抗原をコードするレトロウイルスを感染させた。薬剤選択の後、目的遺伝子が発現されていることを確認し、Colony Formation Assay に適用した。

2. 細胞の癌化

細胞の癌化は、軟寒天培地中での細胞の増殖能を Colony Formation Assay により解析を行った。不活化された細胞を 5 万個、0.4% Noble Agar 中に浮遊させ 18 日間培養した後、形成されたコロニー数を測定した。

[成績]

c-abl ヘテロマウスマウスをかけ合わせ調製した胎児繊維芽細胞 (MEFs) を、SV40T 抗原 (T) の発現により不活化した結果、*c-abl* (+/+) MEFs ではなく *c-abl* (−/−) MEFs が足場非依存性増殖能を獲得することが分かった。SV40T 遺伝子は、Large T 抗原 (LT) と Small T 抗原 (ST) をオルタナティブ・スプライシングにより発現するが、ST を発現せず LT のみを発現する遺伝子により不活化した結果、*c-abl* (−/−) MEFs の足場非依存性増殖には ST は必要な

いことが分かった。LT は癌抑制遺伝子産物である p53 と RB に結合し不活性化することが知られているが、それぞれに結合できない変異体を *c-abl* (−/−)MEFs に発現させたところ、両変異体共に足場非依存性増殖を促進しなかった。以上の結果から、*c-abl* (−/−)MEFs は p53 と RB が協調的に不活性化されると足場非依存性増殖を獲得するという仮説を立て解析を進めた。まず、*c-abl*・*p53* 両遺伝子ヘテロマウスを掛け合わせ *c-abl* (−/−)*p53* (−/−)MEFs を調製した。この細胞は不死化しているが足場非依存性増殖能を獲得しなかった。しかしながら、この *c-abl*(−/−)*p53* (−/−)MEFs に RB を特異的に不活性化するウイルス由来の癌遺伝子 HPV16E7 を発現させると足場非依存性増殖能を獲得した。

[総括]

1. *c-abl* 欠損細胞は、SV40T により不死化されると足場非依存性増殖能を獲得する。
2. *c-abl* 欠損細胞は、SV40LT により不死化されると ST の発現無しで足場非依存性増殖能を獲得する。
3. *c-abl* 欠損細胞は、RB と p53 が不活性化されると足場非依存性増殖能を獲得する。

以上の結果は、1) 今まで知られていた c-Abl の機能獲得だけではなく、機能喪失も足場非依存性増殖を促進すること、2) マウス初代培養細胞が *c-abl*、p53、RB といった遺伝子の複合的な不活性化により足場非依存性増殖を獲得する可能性を示したことに意義があると考ええる。

論文審査の結果の要旨

c-Abl はチロシンリン酸化酵素であり、変異型タンパク質として、酵素が恒常的に活性化することで細胞を癌化することがこれまでに知られている。本論文において申請者は、正常な c-Abl の細胞癌化における機能を調べることを目的として、マウス初代培養細胞を用いて解析を行った。その結果、*c-abl* の機能喪失が p53 と RB の不活性化と協調して細胞レベルの癌化の指標である足場非依存性増殖を促進することを見出した。以上の結果は、1) 原癌遺伝子 *c-abl* が癌抑制遺伝子として機能する可能性を示し、2) マウス初代培養細胞が、*c-abl*、p53、RB といった遺伝子の複合的な不活性化により足場非依存性増殖能を獲得する可能性を示している。本研究は、細胞癌化における新しいモデルを提唱していることに意義があり、学位論文に値すると考える。