

氏名(本籍)	倉持雅己(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2724号
学位授与年月日	平成13年7月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	<i>TSLC1</i> is a tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer (新規非小細胞肺癌抑制遺伝子 <i>TSLC1</i> の同定)
主査	筑波大学教授 医学博士 野口 雅之
副査	筑波大学教授 医学博士 関 沢 清久
副査	筑波大学教授 医学博士 三 輪 正直
副査	筑波大学教授 医学博士 金 子 道夫

論文の内容の要旨

(背景)

ヒトの癌は、癌遺伝子、癌抑制遺伝子、DNA複製酵素遺伝子など複数の遺伝子異常を伴う多段階の変化を経て発生、進展することが知られている。ヒトの癌抑制遺伝子としては、これまでに約10種の遺伝子が単離、同定されているが、なお多くの癌で染色体上の特定領域の欠失が多数の部位で見いだされていることから、個々の癌の複雑な病態の原因となる多数の未知癌抑制遺伝子、癌関連遺伝子の存在が示唆される。我々は、酵母人工染色体(YAC)にクローン化された1メガ塩基対程度の巨大DNA断片を癌細胞に導入、発現させる技術に基づいて、癌形質の抑制の有無を指標として、癌抑制遺伝子の単離を試みており、第11染色体長腕q23上の約700キロ塩基対の領域に、肺癌培養細胞A549の腫瘍原性を抑制する活性が存在することを明らかにした。そこでこの領域の癌抑制遺伝子 *TSLC1* (tumor suppressor in lung cancer 1) と命名し、その存在部位を限局化し、遺伝子を単離、同定し、肺癌の癌化機構の解明を目指すことを研究目的とした。

(対象と方法)

(1) *TSLC1* の単離と塩基配列の決定

NCBIのデータベースから検索した染色体11q23上に存在するEST67クローンのうち、腫瘍抑制活性を持つYAC y939b12に含まれるものをPCR法にて検索し、その全長cDNAを5'-RACE、RT-PCR法を用いて単離した。サイクルシーケンス法を用いてこの全長cDNAの塩基配列を決定した。

(2) 癌培養細胞およびプラスミドベクター

ヒト肺組織由来のmRNAを鋳型としRT-PCR法により *TSLC1* 全翻訳領域およびN末端側のシグナルペプチドを欠いた領域を増幅し発現ベクター pcDNA3.1Hygro (+) に組み込み、それぞれ pc*TSLC1*、pc Δ *TSLC1* とした。12例の非小細胞肺癌培養細胞 (A549, ABC-1, Calu-3, NCI-H441, NCI-H522, RERF-LC-MS, RERF-LC-OK, VMRC-LCD, PC-14, SK-LU-1, NCI-H596, A431)、2例の膵癌細胞 (PANC-1, Capan-1) を解析対象とし、COS-7細胞を *TSLC1* 蛋白の発現、局在検索に用いた。

(3) *TSLC1* 蛋白の細胞内局在の検索

pc*TSLC1*、pc Δ *TSLC1* に対応し、かつC末端にGFPを結合させた発現ベクター p*TSLC1*-gfp、p Δ *TSLC1*-gfp を

作成し COS-7 細胞内で発現させ蛍光顕微鏡下にそれぞれの遺伝子産物の局在を観察した。

(4) ノザンプロット法

ヒト正常組織および肺癌細胞の mRNA を用い、RI ラベルした TSLC1 cDNA 断片をプローベとして TSLC1 発現の有無を検索し、また、シグナル強度を測定し相対的な発現量を比較した。

(5) 腫瘍抑制活性の検討

pcTSLC1, pc Δ TSLC1 およびベクターのみを A549 細胞に導入し安定発現株を単離し、それぞれをヌードマウス皮下に接種し、腫瘍形成、増殖を観察した。

(6) 遺伝子変異の検索

非小細胞肺癌、膵癌、肝細胞癌の切除標本より癌部、非癌部の DNA を抽出し TSLC1 のすべてのエクソン (10 個) について PCR-SSCP 法を用いて変異の検索をした。

(7) LDH 解析

TSLC1 近傍の 4 つの STS マーカーを用いて上記癌培養細胞、切除標本由来の DNA を鋳型とし PCR 増幅の後、ウレアゲル泳動にて分離した。

(8) プロモーターのメチル化検索

上記癌培養細胞、切除標本由来の DNA を対象とし、構造解析によって予想されたプロモーター領域中の TATA BOX 近傍の 6 つの CpG 部位のメチル化の有無を bisulfite sequence 法を用いて検索した。

(9) 脱メチル化剤による TSLC1 発現回復の検討

TSLC1 のプロモーターがメチル化されており、発現も欠如している PANC-1 細胞に 5-aza-2'-deoxycytidine を作用させノザンプロット法にて TSLC1 発現の変化を検討した。

(結果)

YACy939b12 およびその断片化 YAC により限局下しえた腫瘍抑制活性領域に存在する ESTSHGC31226 を基に全長 cDNA TSLC1 を単離した。TSLC1 は膜蛋白でありその発現は非小細胞肺癌細胞 12 例中 A549 を含む 6 例で欠如あるいは著名に低下していた。TSLC1 発現はそのプロモーターのメチル化の有無と非常に強く相関していた。A549 に TSLC1 発現を回復させると、ヌードマウス皮下における腫瘍増殖が著明に迎えられた。切除標本および癌細胞 161 例中 2 例に TSLC1 の不活性化変異が認められた。11q23 領域の LDH を示す切除標本 18 例中 15 例にプロモーターのメチル化が認められた。PANC-1 では脱メチル化剤処理によって TSLC1 発現が回復した。

(考察)

癌は“遺伝子の疾患”ではあるが、家族性の知られている例はわずかであり、ほとんどは“sporadic”である。このため原因遺伝子の検索に連鎖解析を用いることは特殊な場合を除いて不可能である。また、癌における染色体異常は非常に複雑であるため LDH 解析などの構造解析だけで責任領域を詰めることもしばしば困難である。本研究では構造解析に加え、染色体および YAC, BAC, PAC といった人工染色体を癌細胞に導入する技術による機能的相補実験により責任領域を限局化する方法を用いることによって遺伝子の同定が可能となった。また、TSLC1 の不活性化はプロモーターのメチル化が主な要因と考えられ、DNA の変異は低頻度であったがこの点においても構造解析だけでなく機能的に腫瘍を抑えるという証拠を持ち得たことは研究遂行にあたって有用であった。肺癌は癌に起因する死亡の 1 位の疾患でありその 8 割が非小細胞癌である。手術不能な進行癌でもその増殖を阻止できれば非常に有用であると考えられ、ヌードマウスを用いた実験系ではあるが本研究によってその可能性が示された。今後 TSLC1 あるいはその関連分子が肺癌だけでなく多くの癌をコントロールするターゲットと成りうると思われる。

(結論)

機能的相補法を用いた構造解析によって新規の非小細胞肺癌抑制遺伝子 TSLC1 を同定した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

(批評)

本研究は染色体およびYAC, BAC, PACといった人工染色体を癌細胞に導入する技術による機能的相補実験により責任領域を限局化することによって肺癌の培養細胞株A549から新規がん関連遺伝子であるTSLC1を同定した重要な研究である。ヒトのがん関連遺伝子検索の方法として人工染色体を用いた本法は極めてユニークな方法論である。さらに本研究により同定された癌抑制遺伝子TSLC1を実際のヒト癌細胞株や手術標本で解析するとそのDNA変異は低頻度であったが、逆にプロモーター領域のメチル化が高頻度で検出されTSLC1の機能異常の主要因はDNAの修飾にあると考えられる結果を得た。肺癌は癌に起因する死亡の第1位の疾患である。TSLC1を利用して悪性度の高い癌を早期に診断したり、手術不能な進行癌でもその増殖を阻止できれば癌診断治療にとって非常に有用であり、今後TSLC1遺伝子は癌遺伝子診断治療の重要なターゲットとなる可能性を秘めていると思われる。なお、この研究要旨はNature Geneticsに掲載された。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。