

氏名(本籍)	せき ね しげ き 関 根 茂 樹 (東京都)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 1961 号		
学位授与年月日	平成 15 年 10 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Target disruption of the mutant $\beta$ -catenin gene in colon cancer cell line HCT116: preservation of its malignant phenotype. (大腸癌細胞株 HCT116 における相同組換えを用いた変異 $\beta$ -catenin 遺伝子の機能解析)		
主 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	加 藤 光 保
副 査	筑波大学助教授	医学博士	松 村 明
副 査	筑波大学助教授	医学博士	島 居 徹

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

$\beta$ -catenin の安定化をきたす遺伝子変異は様々な腫瘍において認められる。これらの遺伝子変異は GSK-3  $\beta$  によるリン酸化を介した  $\beta$ -catenin の分解を阻害することで、その異常蓄積をきたす。その結果 TCF/LEF1 依存性転写活性が異常に亢進し、細胞増殖を誘導する下流遺伝子などの発現を上昇させることで腫瘍形成に寄与していると考えられている。

大腸癌では、その大半が APC 遺伝子の欠失、 $\beta$ -catenin 遺伝子変異などの  $\beta$ -catenin の安定化をきたす遺伝子変異を有していることが知られている。これらの遺伝子変異は大腸癌発生の最も初期にあたる腺腫の発生において重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、変異  $\beta$ -catenin 遺伝子の過剰発現系によらない機能解析を行う事を目標とし、ジーンターゲティングの技術を用いて、 $\beta$ -catenin 遺伝子の正常・変異アレルいずれか一方を破壊した細胞株をそれぞれ作成し、大腸癌細胞株における変異  $\beta$ -catenin 遺伝子の機能解析を行なった。

### (対象と方法)

$\beta$ -catenin 遺伝子の変異アレル、正常アレル各々一つずつを有する大腸癌細胞株 HCT116 を対象として相同組換えにより一方のアレルのみの破壊を行った。ターゲティングベクターとして  $\beta$ -catenin 遺伝子の exon2 にピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプロモーターレスベクターを用いた。ピューロマイシンによる薬剤選択の後、PCR・サザンブロットによって相同組換えを起こした株を選択した。得られた変異アレル、正常アレルのいずれか一方のみを有する株を用いて、 $\beta$ -catenin の発現、TCF/LEF1 依存性転写活性への影響を解析した。また、培養条件下およびマウス皮下移植による増殖能、アガロースゲル中での足場非依存性増殖能など腫瘍の悪性度にかかわる表現型について解析を行った。

## (結果)

ターゲティングベクターの導入後、ピューロマイシンによる選択を行い、336株の薬剤耐性クローンを得た。得られた耐性クローンに対して、PCR、サザンブロットによるスクリーニングを行った結果、変異アレール破壊株を5株、正常アレール破壊株を7株と、ほぼ同数ずつを得ることができた。

変異アレール破壊株では、親株と比較して $\beta$ -cateninの発現低下とTCF/LEF1依存性転写活性の低下を認めたのに対して、正常アレール破壊株については $\beta$ -cateninの発現・TCF/LEF1依存性転写活性に変化を認めず、遺伝子変異による $\beta$ -catenin安定化への影響が確認できた。形態学的には、通常の培養条件下においてはいずれの株も大きな変化は認められなかったが、低血清培養条件下においては親株と正常アレール破壊株が球状となって増殖するのに対し、変異アレール破壊株は平面的な増殖形態を示し、基質接着能の変化が示唆された。一方、*in vitro*での増殖、足場非依存性増殖能に関してはいずれの株においても差は認められず、ヌードマウス皮下移植における*in vivo*での増殖能は、変異アレール破壊株で親株に対して増加を認めた。

## (考察)

今回の実験の結果から $\beta$ -catenin遺伝子変異は大腸癌細胞株HCT116において $\beta$ -cateninの安定化とTCF/LEF1依存性の転写の亢進とともに、基質接着能を含めた細胞の形質の一部に影響を与えていることが示された。しかし、変異アレール破壊株において*in vitro*における細胞増殖能、足場非依存性増殖能の抑制が認められなかったこと、*in vitro*においては変異アレール破壊株の方がより増殖能が高かったことから腫瘍としての悪性度には寄与していないと考えられた。

これまで $\beta$ -catenin発現抑制による大腸癌細胞株の増殖抑制効果が報告されており、その遺伝子変異の頻度の高さからも治療標的としての可能性が示唆されている。しかし、これらの報告はAPCの過剰発現、あるいは $\beta$ -cateninに対するアンチセンスの導入などを用いたものであり、遺伝子変異による $\beta$ -cateninの安定化の程度を越えた過剰な発現抑制の結果である可能性を否定できない。本研究の結果からは、少なくとも一部の大腸癌においては遺伝子変異による $\beta$ -cateninの安定化はその悪性度に寄与していないものと考えられる。

大腸癌発生の最も初期にあたる腺腫発生において、APC遺伝子の欠失や $\beta$ -catenin遺伝子の変異などの $\beta$ -cateninの安定化を来す様な遺伝子異常の重要性は、マウスを用いた解析、ヒト大腸腫瘍における解析からほぼ確立したものと考えられる。しかし、さらに多数の遺伝子異常の蓄積により悪性腫瘍としての形質を獲得した大腸癌においては、必ずしもその悪性形質に重要な働きをしていない可能性が考えられる。

## (結論)

少なくとも一部の大腸癌においては遺伝子変異による $\beta$ -cateninの安定化はその悪性形質に影響していないと考えられる。大腸癌発癌におけるgatekeeper遺伝子であるAPC遺伝子、 $\beta$ -catenin遺伝子変異の多段階発癌における意味づけ、その治療標的としての可能性についてはさらなる慎重な検討が必要である。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は大腸癌細胞株において $\beta$ -catenin遺伝子変異の機能をジーンターゲティングの技術を用いて解析したものである。この手法を用いることで過剰発現系によらない方法での $\beta$ -catenin遺伝子変異の機能解析を可能としたものである。これまでの報告と異なり、少なくとも一部の大腸癌においては $\beta$ -cateninの安定化は発癌初期過程における役割とは異なり、後期におけるその悪性化に寄与していない可能性を示している。本研究は大腸癌多段階発癌における $\beta$ -catenin遺伝子変異の役割についての新たな一面を明らか

にしたものであり、大腸癌の治療標的としての  $\beta$  - catenin 遺伝子を用いた臨床応用における問題提起をするものとしても評価される。

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。