



Mxil is a potential cellular target of carcinogens and frequently mutated in experimental rat tumors and tumor cell lines

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 東煜 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1120">http://hdl.handle.net/10271/1120</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 267号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏 名	王 東 煜		
論文題目	<p>Mx11 is a potential cellular target of carcinogens and frequently mutated in experimental rat tumors and tumor cell lines                      (ラットの実験腫瘍並びに腫瘍細胞株における高頻度の Mx11 変異)</p>		

博士(医学) 王 東 煜

## 論文題目

Mx1 is a potential cellular target of carcinogens and frequently mutated in experimental rat tumors and tumor cell lines

(ラットの実験腫瘍並びに腫瘍細胞株における高頻度のMx1変異)

## 論文内容の要旨

### 〔はじめに〕

食道癌は世界の各地域における頻度の差が著しい。中国の林県は世界でもっとも食道扁平上皮癌の発生が高頻度であり、これは、N-ニトロソ化合物によるものであるという疫学的証拠がある。本研究は食道癌に関係する遺伝子の単離を目的として、N-ニトロソ化合物でラットに作成した食道癌モデルを用い、ディファレンシャルディスプレイ (differential display) 法により、ラット腫瘍と正常部間で発現に差のあるcDNA断片を検出した。うち、Mx1遺伝子 (Max interactor 1) のラットホモログcDNA断片が同定された。Mx1蛋白はbHLH-LZ (basic helix-loop-helix, leucine zipper) 構造を持ち、Max蛋白 (Myc associate protein X) とheterodimerを形成する。Mx1/MaxはMyc/Maxと共通の塩基配列を認識し競合的にDNAに結合することで、Mycによる転写促進の阻害活性をもつ。また、Mx1はmSin3転写抑制蛋白と結合し、転写抑制遺伝子の一つとしても注目されている。今回の研究はラットMx1のcDNA全長を単離し、ラット腫瘍におけるMx1遺伝子変異を解析したものである。

### 〔材料ならびに方法〕

ウイスターラットに、N-ニトロソサルコシンエチルエステルの前駆体を投与することにより、食道乳頭腫 (REP) および、扁平上皮癌 (RET) を作成した。ラット食道粘膜正常部位 (REN)、REP、RETより、RNAを抽出しさらにcDNAを合成 (RT) した。Differential Displayの解析には、そのcDNAを鋳型にして、放射性標識したランダムプライマーやOligo-dTプライマーを用い、比較的特異度の低い条件下でPolymerase Chain Reaction (PCR) を行ない、40cmの長さのポリアクリルアミドゲルで、泳動した。腫瘍部と非腫瘍部で、発現量の異なるバンドを同定、単離し、塩基配列を決定した。この断片を再度RT-PCRクローニングし、ラットMx1 (rMx1) 全長を単離した。さらにこの情報をもとにプライマーを合成し、RT-PCRとSSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) 解析で、多数のラット腫瘍や細胞株におけるrMx1遺伝子の変化を検索した。

### 〔結果〕

ディファレンシャルディスプレイ (Differential Display) : 9個のcDNA断片がラット食道腫瘍と正常部間で発現に差があり、うち、6個は腫瘍 (REPとRET) のノザンプロットでも検出可能な発現量の差があった。4個は正常部に発現して、腫瘍で消失するもので、そのうち2個はラットのペータトロポミオシン (TPM2) の一部であった。さらにClqR (p) (Clq/MBL/SPA receptor) のラットホモログ、未知の配列がふくまれていた。腫瘍のほうで高発現していたのはMx1とCBFA (CARG-box binding factor) (いずれもラットでは未報告) のラットホモログであった。

ラットMx1の全長単離と発現分布 : RT-PCR法で、706塩基のcDNAを得た、全長228アミノ酸をコードする蛋白の基本構造はすでに報告されているヒトやマウスのMx1とそれぞれ97%、96%の相同性が

あった。ノーザンブロットでは2.5kbの転写産物がみられ、ラット食道腫瘍、胎仔腎、およびラット腎癌のみに高発現していた。

ラット Mxil の変異検索：ラット Mxil の全塩基配列の情報をもとにプライマーを合成し、RT-PCR-SSCP法で、ラットの実験腫瘍や腫瘍細胞株を検索したところ、SID (mSin3-interaction domain), HLH-LZ といった機能ドメインに24例のラット腫瘍から、食道腫瘍を含めて6例で8箇所の変異をみとめた。さらにコドン131のサイレント塩基置換が6例にみられた。

#### 〔結論ならびに考察〕

Differential Display は腫瘍で特異的に発現の減少や増加をきたしている遺伝子の同定にきわめて有用であった。われわれが実験食道癌の系で同定した遺伝子のうち、TPM2はヒト乳癌で発現低下が報告されていて、腫瘍の転移能との相関が想定されている。また、ClqR (p) はマクロファージの貪食能を高めることで腫瘍発生に関連すると考えられている。CBFAと相同性のある断片から新しいDNA結合遺伝子 pRM10も得ている。さらに Mxil については実際のラット腫瘍で多数の変異を発見し得た。Mxil の機能ドメインSIDとHLH-LZの変異があったので、転写抑制活性の阻害が示唆され、その機能を検索中である。これまで腫瘍抑制遺伝子としての役割が想定されながら、実際の腫瘍における変化の例のとぼしかったこの遺伝子の役割を明確にすることができた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者の出身地に近い中国の林県は食道癌の発生率が世界で最も高いことが知られている。疫学的調査によればその原因としてN-ニトロソ化合物の存在が示唆されている。申請者は実験的にN-ニトロソ化合物をラットに投与して食道癌のモデルを作成し、食道癌に関係する遺伝子の単離を試みた。そのためにディファレンシャルディスプレイ法 (differential display) によりラット腫瘍と正常粘膜の間に発現の差のあるcDNA断片を探索した。

その方法としてはウィスターラットにN-ニトロソサルコシンエチルエステルの前駆体を投与することにより、食道乳頭腫および扁平上皮ガンを作成した。その組織のRNAを抽出し、さらにcDNAを合成した。Differential display により腫瘍部と非腫瘍部で発現の異なるバンドを同定し、単離の後塩基配列を決定した。その結果 Mxil (Max interactor1) のラットホモログ cDNA 断片が同定された。Mxil タンパクはbHLH-LZ (basic helix-loop-helix-leucine zipper) 構造をもち、MAX タンパク (Myc associated factor X) とheterodimerを形成することで、Mycによる転写促進の阻害活性をもつ。申請者はRT-PCRとSSCP解析で多数のラット腫瘍や細胞株部におけるrMxil遺伝子の変化を調べた。

結果としてもっとも申請者が注目したのは Mxil の変異である。彼らは SID (mSin3-interaction domain)、HLH-LZといった機能ドメインで24例のラットから6例で8箇所の変異を認めた。

この結果Myc転写抑制活性の阻害が示唆され、それが発癌につながったと推察した。

この発表の後で次のような質問が申請者に問われた。

- 1) Maxは直後Mycと結合出来ないか。
- 2) Max-Max homodimerはrepressor activityをもつか。
- 3) Mxilのpolymorphismとmutationの差をどこで区別するのか。

- 4) 食道癌の扁平上皮ガンと乳頭腫では組織像が異なるのに何故Mx11の発現が異なるのか。
- 5) mutated Mx11の結合活性を調べたか。
- 6) SSCPのsensitivityはどうか。
- 7) differential displayのmeritとdemeritはどのようなものか。

以上の質問にたいしての申請者の解答はおおむね正しく、申請者の論文は博士（医学）の学位授与に相応しいと委員全員で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 高 田 明 和

副査 教授 小 出 幸 夫      副査 講師 西 野 暢 彦