



TGF α , c-MYC, mutated CTNNB1 and their combinations act distinctly on the Hep3B tumors in nude mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-07-30 キーワード: 作成者: 則武, 秀尚 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2716

博士(医学) 則武 秀尚

論文題目

TGF α , *c-MYC*, *mutated CTNNB1* and their combinations act distinctly on the Hep3B tumors in nude mice. (*TGF α* , *c-MYC*, 変異型 *CTNNB1* 遺伝子およびこれらの組み合わせはヌードマウスにおける Hep3B 腫瘍形成に明確に作用する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

肝細胞癌(HCC)の原因遺伝子は未解明である。HCC 患者において *TP53*、ベータカテニン (*CTNNB1*) の変異が報告されている。動物実験モデルでは *TGF α* と *c-Myc* の遺伝子組換えマウスに HCC 様腫瘍が発生し、変異型 *CTNNB1* 遺伝子を持つ遺伝子組換えマウスでは化学発癌がより早期に起こることが報告されている。そこで我々は *TGF α* 、*c-MYC*、変異型 *CTNNB1* が肝腫瘍形成に与える影響について検討した。

[材料ならびに方法]

TGF α 、*c-MYC*、変異型 *CTNNB1* の相補的 DNA (cDNA) を CSII-EF-MCS-IRES2-Venus プラスミド DNA に挿入し、それぞれ CS-EF-TGF α 、CS-EF-MYC、CS-EF-CTNNB1(4A) DNA を作成した。変異型 *CTNNB1* は ³³Ser、³⁷Ser、⁴¹Thr、⁴⁵Ser を 4 つのアラニン残基に変異させ作成した (*CTNNB1*(4A))。レンチウイルスは CSII-EF-MCS-IRES2-Venus、pCAG-HIVgp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev プラスミド DNA を 293T 細胞に導入することで作成した。

Hep3B 細胞にウイルスを感染させ、48 時間培養後にフローサイトメータで感染細胞のみを回収、再び培養した。この細胞をヌードマウスの側腹部皮下に注射した。腫瘍径を毎週計測し、8 週間には腫瘍を摘出し重量を測定した。HE 染色と各種抗体(プレアルブミン、CYP3A4、ベータカテニン、sFRP1、アルファフェトプロテイン、コネキシン 32、CK-19、TP53、LIX1L、CD44v、SALL4、E カドヘリン、CDX2、Hep、Met、DPP4、serpin)で免疫組織学的染色を行った。アポトーシス細胞は形態的および Annexin V 染色によって評価した。なお本研究を実施するにあたり、浜松医科大学動物実験委員会の承認を得た。

[結果]

最初に HepG2、Hep3B、Huh6.5、Huh7.5 の肝癌株細胞をヌードマウスの皮下に移植し、8 週後に腫瘍を摘出した。Hep3B 細胞由来の腫瘍が最も高分化な HCC の病理所見に類似していたので、Hep3B 細胞を選択した。Hep3B 細胞における *TGF α* 、*c-MYC*、*CTNNB1* の mRNA 発現は正常肝細胞に比べていずれも亢進していた。

遺伝子導入された Hep3B 細胞をフローサイトメータで回収後に培養したが *c-MYC*、*c-MYC*+*TGF α* 、*c-MYC*+*CTNNB1*(4A) を導入した細胞はアポトーシスで消失した。

対照との比較において、腫瘍数は *TGF α* を導入すると増加、*CTNNB1*(4A) および *TGF α* +*CTNNB1*(4A)+*MYC* を導入すると減少する傾向がみられた。腫瘍成長速度は *TGF α* +*CTNNB1*(4A) を導入すると促進、*TGF α* を導入すると同等、*CTNNB1*(4A) および *TGF α* +*CTNNB1*(4A)+*MYC* を導入すると遅延した。

腫瘍径および腫瘍重量では、*TGF α +CTNNB1(4A)* を導入するとその他のいずれの群よりも大きくて重かった。

病理所見は多彩であるものの、いずれも異型を認め 3-4% の細胞では細胞分裂像を認めた。*TGF α* 導入腫瘍では核の大きさは様々であり、一部に非常に大型の細胞内に大型の核を持つ細胞がみられた。*CTNNB1(4A)* 導入腫瘍は細胞配列が乱れ細胞間接着が疎となっていたが、*TGF α* を追加導入するとこれらの所見が無くなった。*TGF α +CTNNB1(4A)* 導入腫瘍では *TGF α* を単独導入した腫瘍と類似した組織所見となったが、有糸分裂像はより多くみられた。*TGF α +CTNNB1(4A)+MYC* を導入した腫瘍では腺管様構造が認められた。

ベータカテニン染色では *CTNNB1(4A)* 単独導入した腫瘍のみで核が染色され、その他は細胞膜が染色された。3 種類の遺伝子が導入された腫瘍にみられる胆管様構造では、CK19 および LIX1L 陽性、Hep 陰性であった。その他には各群で相違はなかった。

[考察]

ベータカテニンの免疫組織学的染色において *CTNNB1(4A)* 導入腫瘍細胞では細胞増殖所見である核の染色がみられたが、*CTNNB1(4A)+TGF α* 導入腫瘍では核でなく主に細胞膜が染色された。同様の所見は *c-Myc* および *c-Myc/TGF α* のトランスジェニックマウスで報告されており、変異型 β カテニンの核への移行が *TGF α* により阻害されている。

Hep3B 細胞において既に亢進している *c-MYC* を更に過剰発現させると細胞死を促進すると考えられる。しかし *TGF α +CTNNB1(4A)+MYC* を導入した場合には細胞増殖が起こることから、*TGF α +CTNNB1(4A)* による生存刺激は *MYC* による細胞死刺激より強いと思われる。また *TGF α* 、*c-MYC*、 β カテニンの組み合わせは肝細胞を胆管細胞へと変化されるのかも知れない。

[結語]

TGF α 、変異型 *CTNNB1*、*c-MYC* 遺伝子は組み合わせで肝細胞癌の性質や運命を変えることが明らかになった。