



Ganes Preferentially Expressed in Embryo Stomach are Predominantly Expressed in Gastric Cancer

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田中, 正光 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/970

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 117号	学位授与年月日	平成 4年 3月26日
氏 名	田 中 正 光		
論文題目	Genes Preferentially Expressed in Embryo Stomach are predominantly Expressed in Gastric Cancer (胎児胃で高発現している遺伝子は、胃癌においても高率に発現がみられる)		

医学博士 田 中 正 光

論文題目

Genes Preferentially Expressed in Embryo Stomach are Predominantly Expressed in Gastric Cancer

(胎児胃で高発現している遺伝子は、胃癌においても高率に発現がみられる)

論文の内容の要旨

胎児期に発現が高く成熟すると低下し、癌化に伴い再び高発現してくる遺伝子があり、例えば α -feto-protein(AFP)は胎児肝組織と肝癌や胚細胞腫等で高発現しており、carcinoembryonic antigen(CEA)は胎児腸管と大腸癌で発現が高い。胃癌ではAFPが産生されるものがあり予後不良であるが、その他ではCEAやCA19-9のマーカー陽性の胃癌が報告されているにすぎない。癌-胎児で制御される遺伝子の検索は成体の癌細胞への選択的治療にも通じると思われる。我々は従来の方法に polymerase chain reaction (PCR)を加えた cDNA subtraction 法を用いてこのような発現変化を示す遺伝子を世界的にも高頻度である胃癌で検索した。

〔方法〕 妊娠16日の Fischer 344ラット胎児およびその母体ラットから胃のみを摘出しmRNAを抽出した。各々のmRNA 5 μ gから二本鎖DNAを合成し胎児由来のcDNAはアダプターに接続後、PCRで増幅し tester DNA として用いた。一方成熟ラット由来のcDNAは λ zapIIにクローニングし、プラスミドDNAとして調整し competitor DNA とした。tester DNA と competitor DNA を混ぜバッファー中で hybridization させた後ハイドロキシアパタイト クロマトグラフィーで一本鎖DNAを回収した。その後、再びPCRでtester DNAを増幅させ subtracted probe として調整し、また一部はその後 λ gt 10にクローニングして subtracted library を作製した。この subtracted library を subtracted probe 及び competitor DNA probe で differential screening を繰り返す事により、ラット胎児胃で高発現するcDNAを単離した。これらの単離したクローンにつき、ヒト或いはラットの胃癌における発現をノーザンブロットで検討し、癌部で高発現しているクローンはシーケンスを行った。

〔結果〕 subtracted library 2×10^4 クローンをスクリーニングし、ラット胎児胃で成熟ラット胃に比べ数倍以上高発現している8種類のcDNAクローンを単離した。8つのcDNAを発現量から2群に分け、H(high abundant)-1, 2, 3, 4, 5と、L(low abundant)-1, 2, 3とした。ヒト胃癌手術材料3例から抽出したtotalRNAに対するノーザンブロットを行った結果、非癌部に対し癌部で数倍以上の高い発現がクローンH-1, 2では全例に、クローンH-3, 4で2/3例にみられた。またクローンL-1, 2もラット胃腺癌由来の移植腫瘍株で正常ラット胃に比べ高発現が見られたが、L-1, 2はhigh stringencyのサザンブロットではヒトで保存されていなかった。癌で高発現していた6クローンをシーケンスした結果H-1, 2, 3, 4は既知の遺伝子であり、各々プロフィリン、プロ α 1(1)コラーゲン、核小体蛋白B23.2、ペプチド鎖延長因子1 α であった。L-1, 2は既知の遺伝子とホモロジーが無かった。クローンL-1, 2につきラット胎児の発生過程の胃で発現量の変動をノーザンブロットで調べると、共に妊娠18日までは高発現を示すが以後減少し、出生時には成熟ラットと同じく、ごく少量の発現しか認められなかった。

〔考察〕 癌細胞ではしばしば胎児発生段階で発現する遺伝子が再び発現してくるといわれるが、実際にラット胎児胃で成熟ラット胃に比べ高発現している遺伝子を単離したところ、8クローン中6クローンという高率でヒトあるいはラットの胃癌でも高発現している事がわかった。プロフィリンとペプチド鎖延長因子1 α は癌で高発現しているという報告はこれまでに無く、特にプロフィリンは細胞膜から細胞骨格へ至るシグナル伝達に関与していると考えられているので、その発現上昇の意義は今後の解析が必要と思われる。プロ α 1(1)コラーゲンや核小体蛋白B23.2は胃癌や成長の盛んな細胞で高発現しているという報告があり、我々の結果と一致した。新しい遺伝子L-1, L-2はラットの胃の発生過程で発現がよく制御されており、本実験方法の有効性が確認された。

論文審査の結果の要旨

本論文はラットの胎生期の胃に特異的に発現している遺伝子を同定し、それらの胃癌での発現を検討しようとしたものである。申請者らは胎仔胃で発現レベルの高い5種の発現産物(H-1~5)と発現レベルの低い3種の発現産物を検出し、H群(H-1~4)のcDNAはヒトDNAとハイブリダイズし、胃癌部位で正常胃粘膜部位に比べ数倍高く発現していることを見出した。これらH-1, 2, 3, 4は部分塩基配列解析の結果それぞれ既知の、細胞増殖に関係のあるタイパク質に相当するものであることが分かった。しかし、L-1, 2に対しては相当するタンパク質が見出されなかった。また、L-1, 2はいくつかのラット癌由来異種移植腫瘍に高度に発現していることが確かめられた。L-1, 2は胎生期の胃に強く発現するが、脳をはじめとする器官にも発現し、その発現分布はL-1とL-2で異なっている。おもしろいことに、L-1とL-2は脳では成獣でも強い発現が認められる。

[方法]

動物はフィッシャー344ラットを用い、妊娠母体とその胎生16日の胎仔の胃(全層)から総RNAとポリ(A)⁺RNAを調製している。母体ラットのポリ(A)⁺RNAを調製するには、全胃から抽出した総RNAと腺胃のそれを等量ずつ混和したものを出発試料とした。ウィスター株ラットの胎生14, 16, 18, 22日の胎仔、新生仔、生後5週のものから全胃総RNAを調製し実験に用いている。

AmershamのcDNA合成系を用いてcDNAを合成し、Stratageneの系を用いてラムダファージに組み込み、cDNAライブラリーとした。胎生16日ラット全胃のcDNAライブラリーをPCR増幅したものをtester DNA(検索対象DNA)とした。成獣の胃から調製したDNAを制限酵素処理後PCR増幅したものをCompetitor DNA(競合DNA)とした。両DNAをハイブリダイズさせたのち、単鎖DNAをヒドロキシアパタイトカラムを用いて単離した。それをPCR増幅し、subtracted probeとして用いた。それをλgt10ベクターにクローン化してsubtracted libraryとした。

[結果]

胎生16日目の胃は組織学的に未分化な粘膜層をもっている。胎生22日目には前胃と腺胃の分化がみられる。

subtracted probe、competitor probeを用いてsubtracted libraryを検索し53個の胎仔特異的と思われるクローンを単離。さらに、それらのクローンの中でハイブリダイゼーションを行うことにより10個の独立したクローンが単離された。しかし、これら10個のうち2個は胎仔胃RNAと成獣胃RNAの両方にハイブリダイズすることが分かり、除外された。その結果、最終的に8個のクローンが残った。

これら8個のクローンは発現レベルの相対的に高いH群(H-1, 2, 3, 4, 5)と発現レベルの相対的に低いL群(L-1, 2, 3)の2群に分類された。最多量に存在するH-2は胎仔胃cDNAライブラリー(subtraction以前)の0.2%を占め最小量のL-3は0.005%を占めるにすぎない。標識プローブを用いてそれらの胎仔胃および成獣胃における発現をNorthernプロット法で検索した結果cDNA内の存在量に平行した発現レベルが観察された。

Southernプロット法を用い、H群のクローンはヒトDNAとhigh stringencyの条件でハイブリダイズすることが分かった。L群はハイブリダイズしなかった。ヒト胃癌におけるH群の発現レベルを検索するのにNorthernプロット法が利用された。H群(H-1~4)で検出されるRNA群のレベルは胃の正常粘膜と比べ胃癌部では数倍の高さを示した。H-2は胃癌組織由来のポリ(A)⁺RNAの中で5.5kbと4.2kbのバンドとハイブリダイズした。

ウィスター株ラット胃癌由来の異種移植腫瘍のいくつか(S4, S5, BV-9)について検索したところ、L-1とL-2は正常ラット胃に比べ非常に高い発現レベルを示した。L-1は、S4, S5の3.6kbのRNAと、L-2はBV-9の8.0kbのRNAと主にハイブリダイズした。

H群(H-1~4)とL群(L-1, 2)について部分的塩基配列解析(300-750bp)が行われた結果、H-1, 2, 3, 4はそれぞれプロフィリン、プロα1(I)コラーゲン、核小体タンパク質B23.2、伸長因子1α

サブユニット (EF 1 α) にそれぞれ相当するらしいことが分かった。しかし、L-1, 2 は相当する遺伝子がデータベース中に見出されなかった。

ウィスター株ラットについて L-1, 2 が動物の発育中の胃およびその他の器官でどのような発現を示すかを検索した。その結果 L-1 で検出される mRNA は胎生14~18日の胃に豊富に存在し22日目には減少に転じ新生児と成獣では非常に低くしか発現していないことが分かった。L-2 はさらに早く、胎生18日目ですでに低下し、22日目以後にはほとんど検出されない。

胃以外の器官では、L-1 は胎生12日目に体躯に発現しているが、脳には発現していない。ところが、胎生20日目では脳に最も高く発現し、次に胃に高く発現している。発現産物は心、肺にも認められたが皮膚では非常に低かった。成獣では L-1 は脳と精巣に強く発現し脳での発現レベルは胎仔脳のそれと同じである。L-1 は副腎にも検出された。L-2 は L-1 に較べ胎仔における発現の分布がより広く、脳を初めとし多くの器官に発現している。L-2 は成獣の脳でも高度に発現している。

[考察]

プロフィリンはシグナル伝達に関与すると思われるが、癌との関与は今まで報告がなかった。プロ α 1(1) コラーゲンと B 23. 3 は癌で高度に発現していることが以前から知られていた。B 23. 3 はリボソーム形成因子と考えられている核小体タンパク質である。EF-1 が胃癌で高発現しているのは今回初めて知られたことである。

本論文は胃癌のみならず他の癌においても、そこで選択的に発現している遺伝子を同定する方法として応用できる具体例として興味があり、その中心は PCR 法を使用した subtraction library の利用にある。同 library の作製法については今後さらに簡便な方法が開発される可能性が高いが、全体として意欲的であり同様な意図をもった研究法のモデルとして評価される。また、申請者らが見出した未同定の二つの遺伝子 L-1, 2 が何であるかにも興味をもたれる。

以上の発表に引き続き、以下の諸点について試問が行われた。

1. Competitor DNA の調製について
2. Reannealing にかけた時間
3. 胎仔胃特異 cDNA を選択するさいのハイブリダイゼーションの方法
4. ヒドロキシアパタイト処理の方法
5. Northern プロットに用いた RNA 量
6. 手術試料における RNA の分解の可能性
7. ラット同志なのになぜ異種移植か
8. S4, S5 はどういう腫瘍か
9. L-1, 2 の同定の可能性
10. 胎生16日目を選んだ意味
11. この研究の臨床的意味

これらの質疑に対する申請者の解答はおおむね適切であった。以上から本論文は博士 (医学) の学位論文としてふさわしいものであることを全員が一致して判断した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 道 也

副査 教授 馬 場 正 三

副査 助教授 小 出 幸 夫

副査 教授 村 上 彰

副査 助教授 梶 村 春 彦