

## 論文の内容の要旨

論文題目 小児肝腫瘍（特に肝芽腫）における $\beta$ カテニン異常の解析

指導教官 橋都 浩平 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 高安 肇

肝芽腫は小児における代表的な肝悪性腫瘍である。散発例が多いが、低出生体重児や Beckwith-Wiedemann 症候群、家族性大腸腺腫症の家系に比較的高率に発生をみる。以上のような疫学的特徴に基づいた解析より 11 番染色体の異常、APC 遺伝子の変異例などが報告されたが、いずれも決定的なものではなかった。また、その頻度の低さから分子生物学的解析が、他の小児悪性固形腫瘍に比べ立ち遅れていた。

最近、APC 遺伝子を含む Wnt シグナル伝達系の異常、特に $\beta$ カテニン遺伝子の変異が、成人腫瘍を含め種々の新生物で報告されている。APC 遺伝子、 $\beta$ カテニン遺伝子のいずれかが変異していれば、 $\beta$ カテニン蛋白の分解が抑制され、蓄積した $\beta$ カテニン蛋白は核へ移行し、特定の遺伝子の転写を活性化することが報告されている。肝芽腫においては半数以上の症例において $\beta$ カテニン遺伝子の変異が存在することが 1999 年に報告され、従来より指摘されていた家族性大腸腺腫症家系における高率な発生と関連し、肝芽腫発生における Wnt シグナルの重要性を指摘する事実として注目された。この報告の本邦肝芽腫症例における再現性、そしてその意義の解析が期待された。

日本小児肝癌スタディーグループに登録され、集積された肝芽腫 68 例を対象に $\beta$ カテニン遺伝子の変異とその頻度を解析し、68 例中 44 例（65%）に遺伝子変異を認めた。44 例中 9 例が点突然変異、35 例が欠失変異であった。いずれの変異も $\beta$ カテニン遺伝子のエクソン 3 および、エクソン 3 を含む領域に

生じており、 $\beta$ カテニン蛋白の分解（リン酸化修飾によるユビキチン系での分解）が阻害され、蛋白蓄積を生じることが報告されている変異であった。特に欠失変異を認めた症例が多く認められたが、すべて読み枠のずれない、転写活性化能を持つ C 末端まで含めた蛋白の生じる変異であった。従って、認めた変異により、野生型と同長もしくは短くなった分解を免れ、かつ転写活性化能を保持したタイプの $\beta$ カテニン蛋白が生じるものと考えられた。

蛋白蓄積を確認するために、抗 $\beta$ カテニン抗体を用いた免疫染色を 15 例に行った。15 例中 13 例に $\beta$ カテニンの核への蓄積を認め、そのうち 9 例が遺伝子変異症例であった。同一腫瘍の中でも分化度のことになった組織亜型が混在することが肝芽腫の特徴でもあるが、特に低分化を示す組織亜型に優位に $\beta$ カテニン蛋白の核蓄積を認めた。

核に蓄積した $\beta$ カテニン蛋白は、転写因子 LEF/TCF と協調して約 30 の遺伝子（下流ターゲット遺伝子）の転写調節に関わることが知られている。中でも *siamois* や *ceberus*、*nodal related 3* などの転写調節に関わり、Wnt シグナルが個体発生に重要な役割を演じていることを裏付ける証拠として注目されている。最近では、*cyclin D1* や *fibronectin*、*c-myc* の転写活性を上昇させることによって腫瘍細胞の分化、増殖、転移に関わっていることも報告されている。

そこで、肝芽腫および肝芽腫患者の正常肝より抽出した RNA を用いて、 $\beta$ カテニンの異常が *cyclin D1* や *fibronectin*、*c-myc* の転写調節に関わっているか否かを real-time RT-PCR 法を用いて検定し、*cyclin D1* と *fibronectin* の転写レベルが肝腺腫 $\beta$ カテニン変異群で有意に上昇していることを認めた。さらに、抗 *cyclin D1* 抗体による免疫染色を行い、 $\beta$ カテニン蛋白が核に蓄積している 13 例中 10 例で、*cyclin D1* も陽性に染色された。一方、 $\beta$ カテニン蛋白の蓄積を認めない 2 例では、*cyclin D1* の蓄積も認めなかった。

興味深いことに、家族性大腸ポリポージスの家系の一例で $\beta$ カテニン遺伝子に変異を認めないにも関わらず、高分化型の組織亜型に $\beta$ カテニン蛋白の蓄積を認めた。残念ながら変異検索に十分な核酸の抽出が不可能であったので APC 遺伝子の変異の有無は不明である。APC が $\beta$ カテニンを核の外へ輸送するシャトルの役割を担っているという最近の報告に合致する現象と考えている。

以上より、 $\beta$ カテニン遺伝子の変異と、同蛋白の核への蓄積が、Wnt シグナル下流ターゲット遺伝子の転写調節を介して肝芽腫の発生に関わっていることが示唆される一方で、遺伝子変異と蛋白の核蓄積との間に「解離」が存在する

ことも分かった。特に組織亜型と $\beta$ カテニン蛋白の間には、ほぼ一定の傾向があり、遺伝子の変異に関わらず低分化型組織亜型には蓄積を認め、高分化型組織亜型では蓄積を認めない症例が多くみられた。

また、肝腫瘍発生メカニズムにおける $\beta$ カテニンを含む Wnt シグナル伝達系の異常の位置づけを詳細にするため、良性を含む他の肝腫瘍における $\beta$ カテニン異常について興味を持たれた。

当院小児外科で手術治療を受けた 13 歳女性の肝腺腫症例について同様の解析を行ったところ、 $\beta$ カテニン遺伝子の欠失変異と蛋白の核への蓄積を認めた。思春期に発生する肝腫瘍は、しばしば病理組織学的に鑑別診断が困難である。この症例も鑑別診断に難渋したが、最終的には臨床像の他に、病理組織学的に周辺組織への浸潤を認めない、腫瘍内に門脈域を含まない、核異型像をほとんど認めない等の形態学的特徴により、肝腺腫と診断した。さらに細胞増殖の指標となる MIB1 染色が陰性であり、 $\beta$ カテニンのターゲットとして肝芽腫で発現のみられた cyclin D1 染色も陰性であった。他の過去の肝腺腫一例においても $\beta$ カテニン染色にて同蛋白の核への蓄積を認めた。この症例については抽出した核酸で十分な欠失変異の検索が出来なかった。MIB1 や cyclin D1 染色は、同様に陰性であった。

以上より、肝腺腫において高頻度の $\beta$ カテニン遺伝子の変異（特に欠失変異）が明らかになる一方で、 $\beta$ カテニン遺伝子の変異、蛋白の蓄積が、肝腫瘍発生のどの段階に関わっているのか、また $\beta$ カテニンの異常が直接、腫瘍の悪性化に関わっているか、という疑問が生じた。

肝腺腫や肝腺腫における $\beta$ カテニン異常は明らかとなったが、その意義を解明するためには、さらに症例を積み重ね、臨床データと $\beta$ カテニン異常の関係の解析、肝芽腫組織亜型ごとの $\beta$ カテニン異常の解析を行う必要がある。また、遺伝子チップなど網羅的発現解析を用いて、Wnt シグナル系関連遺伝子を中心とした各遺伝子の発現変化を解析することによって、肝芽腫発生のメカニズムをより明らかにすることが可能と考えられる。