

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 高安 肇

本研究は、小児における代表的な肝悪性腫瘍である肝芽腫の発生に関する分子生物学的研究である。肝芽腫 68 症例を対象に β カテニン遺伝子の変異、同遺伝子産物の腫瘍細胞での発現と局在、そして β カテニンにより転写調節を受けるターゲット遺伝子の発現の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1 : β カテニン遺伝子の変異を 65% (68 例中 44 例) に認めた。44 例中点突然変異症例が 9 例、欠失変異症例が 35 例と欠失変異症例が極めて多かった。いずれも β カテニン蛋白のリン酸化を受けるアミノ酸残基およびその周辺に生じた点突然変異ないしは欠失変異であった。従来報告により、これらの変異により β カテニンのリン酸化分化が阻害され、 β カテニンの細胞内蓄積につながるとされている。欠失変異はすべて in-frame に生じており、したがって転写活性化能を有する C 末端側までを含んだ蛋白が産生される変異であった。以上より、分解を免れ、なおかつ転写活性化能を持つ正常と同長、もしくは短い β カテニン蛋白が産生される遺伝子変異を肝芽腫症例において高頻度に認めた。

なお、肝芽腫症例において認めた β カテニン遺伝子変異は、肝芽腫以外の腫瘍(大腸癌、成人型肝細胞癌、甲状腺癌など)においても報告された変異と同様のものであり、各腫瘍発生においてなんらかの役割を果たしている可能性が示唆された。

2 : β カテニン抗体を用いた免疫染色では、15 例中 13 例に β 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異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 β カテニン蛋白の核蓄積を認めた。

3 : 核に蓄積した β 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。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、 β 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* の発現レベルが肝腺腫 β 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、 β 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、 β 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。

4：肝良性腫瘍である肝腺腫 2 例においても β カテニンの腫瘍細胞の核への蓄積を認めた。また、2 例のうち遺伝子変異解析が可能であった 1 例で β カテニン遺伝子変異を認めた。しかし、細胞増殖の指標となる MIB1、肝芽腫症例にて β カテニンのターゲットと考えられた *cyclin D1* の免疫染色は、陰性であった。この点については、今後の検討課題と考えられた。

以上、本論文は肝芽腫における高頻度の β カテニンの異常を示し、さらに、 β カテニン異常によるターゲット遺伝子の活性化という腫瘍発生（増殖）のメカニズムの一端を示した。また、肝腺腫においても同様の異常を認めたと報告している。本研究は、小児における肝腫瘍発生、分化および増殖、進展の分子生物学的メカニズムの解析に貢献したと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。