

## [論文の内容の要旨]

論文題目：**Functional evidence for the presence of tumor suppressor gene on chromosome 10p15 in human prostate cancers**

和 訳：ヒト前立腺癌における第 10 染色体短腕上(10p15)の癌抑制遺伝子の探索

指導教官：北村唯一教授

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

外科学専攻

氏名： 福原 浩

要旨：ヒト前立腺癌における新規がん抑制遺伝子の単離、同定を研究課題とした。染色体微小核移入法にて染色体断片を前立腺培養細胞に導入し、約 1.2 cM の領域に PPC-1 細胞の悪性形質を抑制する遺伝子が存在することを示した。

目的：ヒトのがんは、がん遺伝子、がん抑制遺伝子、DNA 複製酵素遺伝子などの複数の遺伝子異常を伴う多段階の変化を経て発生、進展することが知られている。ある種のがんにおいてはそれらの分子機構が明らかにされているが、前立腺を含め多くのがんについては未だ十分な解明に至っておらず、新規のがん関連遺伝子の関与も考えられている。遺伝性がんにおいては、その家系の DNA の構造解析によって候補遺伝子を単離し、さらに遺伝子変異を示すことによって責任遺伝子を同定することが可能であるが、ほとんどのヒトのがんは原発性であり、このような連鎖解析を用いることは不可能である。それ故、多数のがん組織の染色体を解析しヘテロ接合性の消失 (LOH) が高頻度に認められる領域を候補領域としてこの領域に存在する遺伝子(がん抑制遺伝子)を単離、同定しようという試みが多くの研究者によってなされてきており、結果多くの候補領域が報告されている。ヒト前立腺においては染色体上 8p, 10p, 10q, 11p, 16q, 17q, 18q などに高頻度に LOH が報告されている。また、これまで 17q に p53 遺伝子が、10q に PTEN 遺伝子が、11p に Kai-1 遺伝子が報告されている。しかしながらがんにおける染色体異常は非常に複雑であり LOH 検索だけでは限局しうる候補領域は数 Mb まででそれ以上の詳細な解析は困難である。

そこで、微小核移入法にてヒトの正常染色体断片をがん培養細胞に導入し、正常な遺伝子が悪性形質を抑制しうるかどうかを確かめることが、がん抑制遺伝子を同定する方法になりうると考えられた。前立腺癌では、7q, 8q, 10q, 11q, 17q, 19q にラットかヒトの前立腺癌培養細胞の転移能あるいは腫瘍原性を抑制する活性があることが報告されている。この

うち、第 10 染色体長腕に関しては、q23 領域から神経膠腫の癌抑制遺伝子 PTEN 遺伝子が単離され、前立腺癌培養細胞においても、この遺伝子の異常が報告されている。そこで、村上らは第 10 染色体短腕に注目し、第 10 染色体短腕断片を前立腺癌培養 PPC-1 に微小核移入法を用いて導入することにより、PPC-1 細胞の腫瘍原性、ならびに軟寒天培地中コロニー形成能が抑制されることを見だし、約 17cM の領域に癌抑制遺伝子の存在が示唆されることを報告している。我々はこの領域をさらに限局化するため、ヒト齧歯類雑種細胞の単一導入断片 (Single Transferable Fragments, STF) を前立腺癌培養細胞 PPC-1 に微小核移入法を用いて導入することにより、腫瘍原性の検討を行った。

## 実験方法および結果：

### (1) ヒト第 10 染色体の前立腺がん培養細胞 PPC-1 への導入

ヒト前立腺癌原発巣由来の PPC-1 細胞はヌードマウスに皮下注射すると、強い腫瘍原性を示す。また、この細胞は第 10 染色体の片方のアレルが完全に欠損しており、もう一方のアレルも第 1 および第 3 染色体に転座し、重複して存在していることが報告されている。さらに、多型マーカーを調べた LOH 解析により、ヘミ接合体であることも確認されている。以前に村上らが微小核移入法により PPC-1 細胞の腫瘍原性を抑制する活性がマーカー D10S1172 および D10S506 間の約 17cM に限局できたことを報告している。さらに領域を狭めるため、村上らが作製した第 10 染色体短腕の単一導入断片を保持するヒト齧歯類雑種細胞を利用した。D10S1172 と D10S506 間の領域をカバーする 5 種類のヒト齧歯類雑種細胞 C10D5, C10E1, C10D6, C10C4, C10C7 ともう 1 種類の C10B7 細胞を、微小核移入法により PPC-1 細胞に導入するドナーとして用いた。

そこで、上記の 6 種類の単一導入断片を微小核移入法により導入し、ネオマイシン G418 にて選択したところ、それぞれ 3～8 種類のハイブリッド細胞が得られた。また、第 10 染色体が導入されているかは FISH により確認した。例えば、P10D4-3 細胞はヒトハムスター雑種細胞 C10D4 由来のハイブリッド細胞であるが、D10S1779 マーカーをプローベとして FISH を施行したところ、元から存在する 2 コピーに加えて、外から導入されたと思われる、もう 1 コピーが認められた。

### (2) ハイブリッド細胞の腫瘍原性の判定

PPC-1 由来のハイブリッド細胞の悪性形質を腫瘍原性にて解析した。親株の PPC-1 細胞と同様に、ハイブリッド細胞を 1 箇所 5 万細胞ずつ、オスのヌードマウス (BALB/c nu/nu mice) の皮下に注射を行った。PPC-1 細胞では、7 週間以内に 15/16 注射部位に腫瘍が形成され、腫瘍はその後成長し続けた。ハイブリッド細胞 P10C7-4, P10B7-1 は 8 注射部位中 6 箇所に腫瘍が形成され、成長速度も PPC-1 細胞と同様であった。一方、ハイブリッド細胞 P10E1-2, P10D6-4, P10D4-3, P10D5-4 は 12 週目に判定したところ、それぞれ 1/8, 2/8, 2/12, 1/12 部位にしか腫瘍が認められなかった。これら 4 細胞の腫瘍は PPC-1 や前記 2 細

胞よりも成長速度もゆるやかであった。

### (3) ハイブリッド細胞に保持されている染色体断片の構造解析

がん抑制遺伝子があると推察される領域を決定するため、それぞれのハイブリッド細胞に保持されている染色体断片の領域を、多型マーカー (Sequence-Tagged Site, STS) を用いて解析した。第 10 染色体上の多型マーカーを用いて、導入された外因性の第 10 染色体と PPC-1 細胞由来の内因性の第 10 染色体とを区別することによって解析を進めた。一連の微小核移入法で用いられたヒトマウス雑種細胞の第 10 染色体断片はすべてヒトハムスター雑種細胞 HA(10)A 由来のマーカーであり、導入された染色体の遺伝子型は HA(10)A のものと同一であった。D10S1779 と D10S1720 の 2 種類のマーカーを含む DNA 断片を PCR にて増幅させると、PPC-1 由来のものと HA(10)A 由来のものとで長さに相違が認められた。D10S1779 の解析では、HA(10)A 由来の DNA 断片が 4 種類のハイブリッド細胞 P10E1-2, P10D6-4, P10D4-3, P10D5-4 で認められ、これはマーカー D10S1779 を含む領域が導入され保持されていることを示している。一方、マーカー D10S1720 の解析では、HA(10)A 由来の断片はハイブリッド細胞 P10E1-2 と P10D6-4 でのみ保持されていた。P10D5-4 細胞以外のハイブリッド細胞では、連続した単一の断片だけが保持されていた。腫瘍原性を抑制した 3 種類のハイブリッド細胞 P10E1-2, P10D6-4, P10D4-3 はマーカー D10S1172 および D10S1720 間で区切られる染色体部位を保持しており、2 箇所以上の連続していない染色体断片を有する抑制細胞 P10D5-4 でも同部位を保持していた。

### (4) 単一部分断片に基づいた、がん抑制遺伝子のさらなる限局化

マーカー D10S226 の解析では、PPC-1 細胞と HA(10)A の多型の長さに差を認めなかったが、P10D4-3 細胞の外因性の第 10 染色体はヒトハムスター雑種細胞 C10D4 由来なので、C10D4 細胞の PCR 解析にて P10D4-3 細胞はマーカー D10S226 を保持していないことが明らかとなった。同様の PCR 解析にて、C10D4 細胞はマーカー D10S1172 および D10S1779 を保持しているが、D10S226 および D10S1720 は保持していないことが明らかとなった。このように 4 種類の抑制ハイブリッド細胞に保持されている領域は D10S1172 および D10S226 で区切られる領域に限局された。NCBI の Radiation Hybrid 99 GB4 および Stanford G3 Radiation Hybrid Panel に基づいたゲノムの地図情報では D10S1172 および D10S226 で区切られる領域は 4.6cR であった。このゲノム地図情報では 1cR が 270 kb の長さに相当するため、前立腺がん抑制遺伝子は第 10 染色体短腕(10p15.1)上の約 1.2 Mb の領域内に位置することが示唆された。

考察：第 10 染色体短腕の導入によりヒト前立腺がん培養細胞の腫瘍原性を抑制することは、1996 年のサンチェスらおよび同年の村上らの独立した 2 研究によって明らかにされており、これは第 10 染色体短腕上にがん抑制遺伝子が存在することの直接の証拠とな

りうると考えられる。その遺伝子が存在すると考えられる位置は、それぞれ第 10 染色体の 10pter-q11、10p13-15 であった。しかし、この比較的大きな染色体領域上の多くの候補遺伝子からがん抑制遺伝子を同定するのは依然として困難である。しかし、ハイブリッド細胞内に、連続していない染色体断片が多く保持されていると、遺伝子の同定はさらに困難であると考えられる。我々が利用した単一導入断片 (STF) は精緻に構築されており、P10D5-4 細胞を除いては単一の連続した断片が PPC-1 細胞に導入されていた。さらに、STS マーカーの有無をヒト齧歯類ハイブリッド細胞の単一導入断片 (STF) の情報に基づいて決定したところ、D10S226 と D10S1720 の間の約 1.3 Mb を候補領域から除外することが可能となった。

PPC-1 細胞の悪性形質はヌードマウスの腫瘍原性にて判断した。腫瘍の形成は 4 種類のハイブリッド細胞 (P10E1-2, P10D6-4, P10D4-3, P10D5-4) では完全には抑制されなかったが、腫瘍の発生頻度は低下し、潜伏期は延長し、腫瘍の大きさは PPC-1 細胞や他の 2 種類の細胞と比較しても縮小していたため、抑制の効果は重要であると考えられた。一方、生体外での形態や成長速度は 4 種類の抑制細胞で差は認められず、これは以前の村上らの知見と一致した。

機能的相補実験によって我々は腫瘍抑制活性を示す部位を第 10 染色体短腕 (10p15.1) に限局した。LOH 解析で 10p15 前立腺癌でしばしば欠損していることが多くの研究者によって明らかにされており、抑制遺伝子が実際の臨床検体でも真に関与していることが示唆された。また、第 10 染色体短腕の LOH は臨床的に限局した癌よりも進行した前立腺癌でよく報告されている。この知見は第 10 染色体短腕上の抑制遺伝子が前立腺癌の進展に関与する可能性を示唆している。

第 10 染色体短腕の LOH はヒト神経膠腫や神経膠腫培養細胞でも認められており、LOH 解析にて共通して欠損した領域の第 10 染色体断片を神経膠腫培養細胞に導入して悪性形質が抑制されたという報告も見られる。また、悪性黒色腫でも臨床検体の LOH 解析と第 10 染色体断片を導入した機能的相補実験を組み合わせ、がん抑制遺伝子の座を決定している報告も見られる。神経膠腫や悪性黒色腫の抑制遺伝子の候補領域は一部今回の我々の領域と重なっており、同一の遺伝子がこれらの腫瘍の原因遺伝子である可能性もあると考えられる。

この染色体領域の塩基配列を決定することに加えて、酵母人工染色体 (YAC) を含めたさらなる機能的相補実験を進めることによって、今後がん抑制遺伝子の同定につながると考えられる。