

論文の内容の要旨

論文題目 候補癌抑制遺伝子 *WWOX* の発現解析

氏名 渡辺 亮

要旨

<背景及び目的> 癌は日本における第一位である。癌の発症・進展のメカニズムには遺伝子レベルの変化を伴い、特に癌を抑制する遺伝子の探索や発現・機能解析を行うことは重要である。本研究の目的は、*WWOX* についてタンパク質レベルでの発現解析を行うことであった。*WWOX* は、乳癌、卵巣癌、食道癌および肺癌において、癌の進展に伴い、欠失の見られる遺伝子である。*WWOX* の欠失した細胞株に *WWOX* を導入することで細胞死を誘導することや、癌のモデルマウスに *WWOX* を導入することで癌部が縮小することなどから *WWOX* は癌を抑制する機能をもった遺伝子、すなわち癌抑制遺伝子の候補とされている。*WWOX* に見られる欠失はタンパク質をコードしないイントロン領域で起こることで、転写産物のスプライシングの異常がひき起こされる。しかしながら、癌抑制遺伝子に特有な欠失と一塩基変異が極めて稀であることや、欠失が見られる症例でも異常な転写産物と同時に野生型の転写産物が存在することから、*WWOX* が癌の進展に関与するメカニズムの解明が進められている。

本研究では、*WWOX* の癌抑制遺伝子の機能を理解する上で、*WWOX* が翻訳された産物であるタンパク質の発現をみるのが重要である、と考え、*WWOX* を特異的に認識するモノクローナル抗体を樹立した上で、癌における *WWOX* のタンパク質の発現解析を行った。

<結果と考察> 本研究に用いた 49 種類の細胞株について逆転写 PCR および塩基配列の決定を行った結果、7 種類の細胞株でスプライシングの異常な転写産物を検出した。胃癌由来細胞株 OCUM-2MD3 および肝癌由来細胞株 HLE においてこれまでに報告されていないエキソン 7-8 が欠失するスプライシングの異常を見いだした。

これらの細胞株に対し、樹立した抗 *WWOX* モノクローナル抗体を用いてウェスタン・ブロットティングを行った。90 クローンのモノクローナル抗体を樹立し、エピトープ・マッピングを行った。そして、*WWOX* の正常型及び異常型の両方を認識する抗体を研究に用いた。その結果、野生型のタンパク質のみが検出され、異常な転写産物を発現する細胞株においても異常な転写産物に由来するタンパク質は検出されなかった。また、定量的 PCR の結果は、*WWOX* の転写産物の発現量はタンパク質の発現量と相関することを示すものであった ($R=0.675$)。この結果は、*WWOX* の異常が癌の進展をひき起こすメカニズムは、これまで「異常な *WWOX* のタンパク質が正常なタンパク質の機能を阻害する」、すなわち異常な *WWOX* がドミナント・ネ

ガティブに作用すると考えられてきたが、異常な転写産物に由来するタンパク質の有無とは別のメカニズムで癌の進展に関与することを示唆するものであった。

また、WWOX の細胞内局在解析を行った結果、ヒト繊維芽細胞では通常の培養条件下で WWOX がミトコンドリアに局在すること、細胞の集密時には局在が核へ移行することが明らかとなった。また、乳癌由来細胞株 MCF-7 では WWOX の局在は主に核にあり、ミトコンドリアにも一部局在している結果が得られた。このように、WWOX の局在は、核とミトコンドリアの一方または両方で機能を発揮している可能性が示唆され、WWOX の局在が重要であることを明らかにした。これまでに、2つのグループが細胞内局在解析を試みている。一つのグループは、抗 WWOX ポリクローナル抗体での解析によってミトコンドリアに局在することを示し、もう一つのグループはタグのついた強制発現部の解析でゴルジ体に局在することを示すなど議論が続いている。局在解析の結果で統一した見解が得られていない原因として、特異性の低いポリクローナル抗体の使用や内在性ではなく強制発現物の測定によることが考えられ、本研究で行ったモノクローナル抗体による解析はこれらの問題を解決しており、信頼性が高い。

さらに、臨床検体における免疫組織化学を行った結果、胃癌では 10 例中 16) 例、乳癌では 5 例中 5 例、卵巣癌では 6 例中 4 例において WWOX の発現が認められた。正常組織では、精巢のライディッヒ細胞、乳腺導管、腎臓尿細管での WWOX の発現が認められた。乳腺導管を除く検体では、WWOX が細胞質にあることが明らかになったが、乳腺導管では一部核に局在しているものも見いだした。この結果は、本研究での培養細胞における細胞内局在解析と同様に、*in vivo* においても WWOX は局在の変化を伴いながら機能していることを示したものである。

<結論> このように、本研究では、癌において遺伝子レベルで解析されてきた候補癌抑制遺伝子 WWOX について、タンパク質レベルでの解析をはじめて行った。その結果、(1) WWOX における新規の異常なスプライシングを見いだした、(2) 異常な転写産物を発現する細胞株においても異常型のタンパク質は検出されなかった、(3) 培養細胞における細胞内局在解析の結果、WWOX はミトコンドリアと核に局在をしている、(4) 免疫組織化学の結果、*in vivo* でも WWOX が核に局在している症例を見いだした、など遺伝子レベルでは解明できなかった結果を得ることができ、WWOX の機能を明らかにする上で、重要な知見であると思われる。