

氏 名（本籍） さくら だ あきら
櫻 田 晃

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 3 2 1 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 12 年 9 月 13 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 平 成 3 年 3 月 20 日
弘 前 大 学 医 学 部 卒 業

学 位 論 文 題 目 アデノウイルスベクターを介した PTEN 遺伝子の
導入による子宮内膜癌細胞のアポトーシス誘導に
関する研究

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 近 藤 丘 教 授 金 丸 龍 之 介

教 授 岡 村 州 博

論文内容要旨

研究目的

PTEN 遺伝子は 1997 年に同定された新たな癌抑制遺伝子であるが、子宮内膜癌において高率に変異が報告されている。さらに、子宮内膜癌の前癌病変においても、PTEN 遺伝子の変異が報告されている。本研究の目的は、PTEN 遺伝子の変異をもつ子宮内膜癌細胞株に対してアデノウイルスベクターを介した正常 PTEN 遺伝子の導入を行うことにより、PTEN 遺伝子の変異が子宮内膜癌の発癌過程の初期変化として重要な役割を果たしているかどうかを検証することである。

研究結果

正常 PTEN 遺伝子の cDNA をライブラリースクリーニングによってクローニングし、CAG プロモーターにより制御されるように E1a, E1b, E3 欠損 5 型アデノウイルスベクターに組み込んだ。このベクターを感染させることで、PTEN 遺伝子を導入した HEC1A で PTEN 蛋白の発現が安定して得られることを確認した。対照として同様の構築をもち PTEN 遺伝子の代わりに lacZ 遺伝子を含むウイルスベクターを用いた。

PTEN の変異株 2 種を含む 4 種に対して、mock, AdCA-lacZ (MOI 30), AdCA-PTEN (MOI 30) で処理を行い、細胞数を経時的に計測したところ、感染から 72 時間の時点で、HEC1A, KLE では lacZ 導入群と PTEN 導入群では有意差が認められなかったが、PTEN 変異株である Ishikawa 3H12 において、mock 群に対して lacZ 遺伝子導入群が 80.1 (±3.0) %、PTEN 導入群が 20.1 (±2.6) %、同様に PTEN 変異株である RL95-2 において、mock 群に対して lacZ 遺伝子導入群が 88.9 (±6.3) %、PTEN 導入群が 28.9 (±3.6) %と、Ishikawa 3H12 と RL95-2 では PTEN 遺伝子導入群において有意な細胞数の低下が認められた ($P < 0.05$)。

Apoptosis の確認のために、遺伝子導入を行った Ishikawa 3H12 において核の DAPI 染色を施行したところ、PTEN 遺伝子導入群において核の断片化が認められた。また、TUNEL 法による apoptosis 細胞の計測結果は、HEC1A において mock, AdCA-lacZ (MOI 30), AdCA-PTEN (MOI 30) それぞれの処理群の陽性率が、2.0 (±1.4) %、1.3 (±0.9) %、3.2 (±0.4) % であり、同様に Ishikawa 3H12 において、6.7 (±2.2) %、7.6 (±2.1) %、38.3 (±2.1) %と、PTEN を導入した Ishikawa 3H12 細胞において有意に TUNEL 陽性細胞が増加していた ($P < 0.05$)。

感染処理を行ってからマウスの皮下に腫瘍細胞を注射した *ex vivo* の実験では、mock 群、AdCA-lacZ 群では、それぞれ 6/6、5/6 と腫瘍の生着・増殖が認められたが、AdCA-PTEN 群

では0/8と処理を行ったすべてのマウスで生着が認められなかった。

以上より、1) 子宮内膜癌で高率に認められる PTEN 遺伝子の変異は、子宮体癌の成立に関わる重要な遺伝子変化であると考えられた。2) しかし、PTEN 遺伝子の多様なシグナル伝達経路の解明が今後の課題である。

研究の意義・独創的な点

子宮内膜癌の臨床検体において高率に認められている PTEN 遺伝子の変異が、子宮内膜癌の発癌過程において重要な役割を担っていること機能的な面から証明したことが、本研究の意義かつ独創的な点である。

審査結果の要旨

PTEN 遺伝子は1997年に同定された新たな癌抑制遺伝子で、同定された当初から複数の癌の発生進展に関与する可能性が指摘されていた。筆者は、glioma, 肺癌, 乳癌, 腎癌, 膵臓癌, 卵巣癌の臨床検体を用いて本遺伝子の変異を検索し、glioma 以外には変異が認められないことを報告した。続いて、子宮内膜癌において変異を検索し55%と高率に変異が認められることを報告し、PTEN 遺伝子の変異には臓器特異性があることを示した。子宮内膜癌では、前癌病変においても PTEN 遺伝子の変異が報告されている。本研究の目的は、PTEN 遺伝子の変異が子宮内膜癌の発癌過程の初期変化として重要な役割を果たしているかどうかを検証することである。

本研究においては、正常 PTEN 遺伝子を発現するように構築した Ela, Elb, E3欠損 5 型アデノウィルスベクターを感染させることで PTEN 遺伝子を導入した。対照として同様の構築をもち PTEN 遺伝子の代わりに lacZ 遺伝子を含むウィルスベクターを用いた。PTEN 遺伝子の変異子宮内膜細胞癌株 2 種を含む 4 種に対して、mock, AdCA-lacZ (MOI 30), AdCA-PTEN (MOI 30) で処理を行い、細胞数を経時的に計測したところ、感染から72時間の時点で、PTEN 変異株である Ishikawa 3H12 において、mock 群に対して lacZ 遺伝子導入群が80.1 (±3.0) %, PTEN 導入群が20.1 (±2.6) %, 同様に PTEN 変異株である RL95-2 において、各群88.9 (±6.3) %, 28.9 (±3.6) %と、PTEN 遺伝子導入群において有意な細胞数の低下が認められた。Apoptosis の確認のために、遺伝子導入を行った Ishikawa 3H12 において核の DAPI 染色を施行したところ、PTEN 遺伝子導入群において核の断片化が認められた。また、TUNEL 法による apoptosis 細胞の計測結果は、PTEN 変異の認められなかった HEC1A において mock, AdCA-lacZ (MOI 30), AdCA-PTEN (MOI 30) それぞれの処理群の陽性率が、2.0 (±1.4) %, 1.3 (±0.9) %, 3.2 (±0.4) %であり、同様に Ishikawa 3H12 において、6.7 (±2.2) %, 7.6 (±2.1) %, 38.3 (±2.1) %と、PTEN を導入した Ishikawa 3H12 細胞において有意に TUNEL 陽性細胞が増加していた。さらに、感染処理を行ってからマウスの皮下に Ishikawa 3H12 を注射した *ex vivo* の実験では、mock 群, AdCA-lacZ 群では、それぞれ6/6, 5/6と腫瘍の生着・増殖が認められたが、AdCA-PTEN 群では0/8と処理を行ったすべてのマウスで生着が認められなかった。

本研究は、子宮内膜癌の臨床検体において高率に認められている PTEN 遺伝子の変異が、子宮内膜癌の発癌過程において重要な役割を担っていることを機能的な面から証明したもので、本論文は学位に値するものと判断する。