

氏名	あおきこうじ 青木耕史
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医博第2691号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in $Apc^{+/Δ716} Cdx2^{+/-}$ compound mutant mice (<i>Apc Cdx2</i> 複合変異マウスにおけるmTOR情報伝達経路を介した染色体異常による大腸ポリープ形成)
論文調査委員	(主査) 教授 鍋島陽一 教授 千葉勉 教授 武田俊一 教授 武藤誠

論文内容の要旨

Cdx2 遺伝子変異は $Apc^{\Delta716}$ 欠損マウス (*Apc* マウス) の大腸ポリープ形成を促進する。

Cdx2 は、腸管上皮細胞の恒常性の維持に必要な重要な役割を担う転写因子であり、多くの大腸癌において発現の減少が報告されているため、癌抑制遺伝子の候補として注目されている。その役割を解明するために、家族性大腸腺腫症のモデルである *Apc* マウスに *Cdx2* 遺伝子変異を導入し、*Apc/Cdx2* マウスを作出した。*Apc* マウスに比較して *Apc/Cdx2* マウスは6倍数の大腸ポリープを形成したことから、*Cdx2* 遺伝子変異が *Apc* マウスの大腸ポリープ形成を促進することが遺伝学的に明らかとなった。

Cdx2 遺伝子変異は、染色体分配異常 (CIN) を誘導することにより *Apc* 遺伝子の LOH を促進する。

Apc/Cdx2 マウスにおけるポリープ形成の機序を解析するために、ポリープ上皮細胞より採取した DNA で、*Apc* 遺伝子型を調べたところ、すべてのポリープにおいて正常 *Apc* 遺伝子の欠損 (LOH) を確認した。この結果により正常 *Apc* 遺伝子の LOH 頻度が上昇していることが予想されたため、その機序として *Apc/Cdx2* マウスにおいて CIN が生じているという仮説を立ててそれを検証した CIN は分裂後期の異常染色体像によって評価できることが報告されていることから、染色体分配異常頻度 (ABI) を調べたところ、*Apc* マウスに比べ *Apc/Cdx2* マウスでは ABI が10倍に上昇していた。この結果により、*Apc/Cdx2* マウスでは、CIN による正常 *Apc* 遺伝子の LOH 頻度が上昇したため著しくポリープ形成が促進されたと結論づけられる。

ヒト大腸癌細胞において *Cdx2* 発現抑制は、CyclinE/Cdk2 の活性化を介して細胞周期の G1/S 移行を促進する。

Cdx2 遺伝子変異による CIN 誘導の分子機構を解明するために培養細胞を用いて解析を行った。ヒト大腸癌細胞 DLD-1 の *Cdx2* 遺伝子発現をアンチセンス法により抑制した細胞を作成した。この *Cdx2* 発現抑制細胞では対照に比べ、ABI が10倍上昇していることを見出した。細胞周期分布解析より、*Cdx2* 発現抑制細胞では対照に比べ、G1 期の集団が減少しており、*Cdx2* 発現減少が G1/S 移行を促進することを見出した。さらに CDK 抑制因子である p27 の発現減少、CyclinE/Cdk2 複合体の活性上昇を見出し、CDX2 発現減少が CyclinE/Cdk2 の活性化を介して G1/S 移行を促進することが示唆された。G1 期に重要な P13 キナーゼ経路を調べたところ、P13 キナーゼや Akt には変化がなかったがその下流因子として重要な mTOR の活性化が観察された。そこで、mTOR 阻害剤で *Cdx2* 発現抑制細胞を処理すると G1/S 移行が抑制されること、さらに ABI が低下することを見出した。この結果から、CDX2 発現抑制は mTOR の活性化を介して G1/S 移行促進及び CIN を誘導していることが明らかとなった。

Cdx2 遺伝子変異は、生体においても細胞生存を促進する。

培養細胞の解析から、*Cdx2* が mTOR のを介して細胞の生死に関与していることが示された。そこで、細胞増殖と細胞死の頻度を *Cdx2* 欠損マウス大腸上皮細胞で決定したところ、野生型マウスに比べ約2倍の増殖細胞の増加と、約50%の細胞死の抑制が観察された。即ち、*Cdx2* 遺伝子変異が細胞生存を促進することが遺伝学的に立証できた。

以上の結果は、大腸癌におけるCDX2発現減少に起因したmTOR依存性の染色体分配異常という新たな機序を示しており、mTOR阻害剤の新たな治療効果の可能性を見出したと言える。

論文審査の結果の要旨

本研究において申請者は、腸管上皮細胞の恒常性の維持に重要な*Cdx2*遺伝子が、大腸癌抑制因子として働くこと及び染色体安定性に関与することを遺伝学的に立証するとともに、培養細胞を用いた解析によりその詳細な機構を解明した。

まず、家族性大腸線腫症のモデルである*Apc*マウスに*Cdx2*遺伝子を導入し、*Apc/Cdx2*マウスを作出した。その結果、*Apc*マウスに比べ*Apc/Cdx2*マウスは6倍の大腸ポリープ数を形成した。同時に、その機序として染色体分配異常頻度(ABI)を調べたところ、*Apc*マウスに比べ*Apc/Cdx2*マウスでは10倍に上昇していた。これらの結果により、*Apc/Cdx2*マウスでは、染色体不安定性により正常*Apc*遺伝子座のLOH頻度が上昇して、著しくポリープ形成が促進したと結論づけた。また、大腸癌培養細胞を用いた解析により、染色体不安定性の誘導機序として、mTOR情報伝達経路の活性化及び細胞周期G1/S移行の促進が原因となっていることを見出した。また、細胞周期の異常がp27やcyclinEといった細胞周期制御因子の発現量または活性化の異常によることを見出した。

以上の研究は、大腸癌における新たな病態機序解明に貢献したものであり、また、mTOR阻害剤による染色体不安定性の抑制という新たな癌治療戦略を見出した点においても極めて重要と考えられる。

従って、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成16年1月9日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。