

氏 名	か とう たつ し 加 藤 達 史
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2568 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Isolation of a novel human gene, <i>MARKLI</i> , homologous to <i>MARK3</i> and its involvement in Hepatocellular Carcinogenesis に関する研究 (MARK3 のホモログである新規ヒト遺伝子 MAEKL1 の単離, およびその肝発癌への関与に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 野 田 亮 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

Wnt-signaling pathway 活性化と発癌への関与について, 大腸癌では APC, β -catenin 遺伝子変異のために核・細胞質へ蓄積した β -catenin と Tcf/LEF の複合体が, c-myc, cyclinD1 などの下流遺伝子の転写活性化が癌化に関与すると考えられている。しかしながら肝癌においては, β -catenin, AXIN1 遺伝子変異および高頻度な β -catenin の蓄積異常が認められ Wnt-signaling pathway が癌化に関与していることが強く示唆されるものの, その下流遺伝子の発現に関しては未解明な部分が多い。そこで AXIN1 及び APC の β -catenin 結合ドメインの遺伝子導入が Tcf/LEF 転写活性を低下させることを利用し (Nat.genet 2000, 24(3), 7245-250), 活性型変異を持つ β -catenin を発現している肝芽腫細胞株 HepG2 にアデノウイルスベクターによる APC, AXIN1 遺伝子導入を行い, LacZ 導入の場合との遺伝子発現変化を genome wide cDNA Microarray 法を用いて検討することで, Wnt-signaling pathway 下流遺伝子の同定を試みた。

Microarray スライド上の9216遺伝子のうち, LacZ 導入細胞に対する APC, AXIN1導入細胞での蛍光強度から得た発現比が0.5以下であり, さらに APC に対する AXIN1遺伝子導入効果のより高いものが21遺伝子認められた。さらに β -catenin が核へ蓄積している肝癌症例での発現解析を行うことにより Wnt signaling pathway 下流新規遺伝子候補を絞り込んだ。その中に9症例中8症例で非癌部に比べて癌部で発現亢進している EST が認められ, 下流新規遺伝子候補と考えられた。genome database からその領域の genome 配列を利用し, exon connection 法, 5'RACE 法を用いてその遺伝子全長を得た。その mRNA は2256塩基の open reading frame を含む3529塩基からなり, MARK3と56%の相同性を有する752アミノ酸からなる蛋白をコードしていたため, 新規ヒト遺伝子 MARKL1 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase-like 1) として登録した。この MARKL1 は serine/threonine kinase domain, ubiquitin-associated domain, kinase-associated domain を持ち, このドメイン部分の MARK3 との相同性はそれぞれ89%, 69%, 43%であった。また Northern blot 解析では, 各臓器に ubiquitous な発現を示したが, 特に精巣で強く発現していた。

次に機能解析のために発現プラスミドベクターへ組み込み, COS7 細胞, HEK293 細胞へ導入したところ, 細胞質への局在が確認された。また, MARKL1 の細胞増殖に与える影響を調べるため, MARKL1 の発現抑制効果が確認された anti-senseS-oligonucleotide を, MARKL1 の発現が比較的亢進している肝癌細胞株 SNU475 へ導入したところ, 増殖抑制効果が確認された。このことは MARKL1 が細胞増殖に必要である可能性を示唆している。これらの結果から, Wnt-signaling pathway 下流新規遺伝子候補 MARKL1 のさらなる機能解析が, 肝発癌のメカニズム解明に役立つ可能性があると考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では, genome wide cDNA Microarray 法を用いた Wnt signaling pathway 下流遺伝子の検索から, 新規肝癌関

連遺伝子 *MARKL1* (*MAP/microtubule affinity-regulating kinase-like 1*) が同定された。

β -catenin, AXIN1 遺伝子変異は, Wnt signaling pathway 下流遺伝子を介して肝癌の発癌に関与すると考えられることから, 申請者は AXTN1 と APC を肝癌細胞株 HepG2 へ遺伝子導入し Tcf/LEF 転写活性を低下させた場合と, LacZ を導入した場合の遺伝子発現を Microarray 法を用いて比較した。

抽出された下流遺伝子候補群に対して β -catenin 核蓄積症例を用いた検討の結果, 9 症例中 8 症例で癌部での発現亢進が確認された EST が肝癌関連遺伝子候補と考えられたため, まず遺伝子全長を決定した。この遺伝子は既知遺伝子 MARK3 と 56% の相同性を有する蛋白をコードしており, 新規遺伝子 *MARKL1* として登録した。

機能解析として *MARKL1* の発現抑制効果が確認された antisense S-oligonucleotide を肝癌細胞株 SNU475 へ導入したところ, 細胞増殖抑制効果を認めた。このことは *MARKL1* が肝癌の細胞増殖に関与する可能性を示唆するものと考えられた。

以上の研究は遺伝子同定における Microarray 法の有用性と, 肝発癌において *MARKL1* のもつ重要性の解明に貢献し, また肝発癌メカニズムの解明に寄与するところが多い。

したがって, 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 15 年 1 月 7 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。