

氏 名	郭 巍 輝
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2534 号
学位授与の日付	平 成 14 年 11 月 25 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 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Inhibition of growth of mouse gastric cancer cells by RUNX3, a novel tumor suppressor Wei-Hui Guo, Li-Qin Weng, Kosei Ito, Lin-Feng Chen, Hayao Nakanishi, Masae Tatematsu, and Yoshiaki Ito (新規がん抑制遺伝子 RUNX3 によるマウス胃がん細胞の増殖抑制) 郭巍輝, 翁立勤, 伊藤公成, 陳琳峰, 中西速夫, 立松正衛, 伊藤嘉明
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 武 藤 誠 教 授 下 遠 野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

胃がんは世界的にみてがん関連死亡原因の中で2番目に多い。胃がんの発生に關与する遺伝子の探索は精力的に行われており、E-cadherin, p53, TGF- β 受容体等に、変異や欠損が見つかったが、これらの変異は限られた臨床例でしか報告されていない。最近、申請者の所属する研究グループは、転写因子 RUNX3 が胃がんにおけるがん抑制遺伝子として機能することを報告した。

化学発癌剤、N-methyl-N-nitrosourea で形成されたマウス腺胃がんから4種の細胞株 (E16, E25, 93U, E1) が樹立され報告されている。申請者はこれらの細胞株における Runx3 の発現を調べた。その結果、そのうち3種で発現が消失、残りの1種でも強く抑制されていた。さらに、Runx3 の発現抑制がプロモーター領域のメチル化に起因するものかどうかを調べるため、メチル化特異的 PCR を行った。その結果、プロモーター領域が、E1, E6, E25 株の3種でメチル化特異的プライマーでの増幅が確認された。より直接的にメチル化を確認するため、この領域の塩基配列を決定してみると、CpG アイランドのメチル化と Runx3 との発現が E1 株では非常に、E16 株では部分的に、相関することが分かった。以上の結果を踏まえ、5'-azacytidine (5'-AC) (メチルトランスフェラーゼ阻害剤) 及び trichostatin A (TSA) (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤) で Runx3 の発現が回復するかどうか調べた。その結果、E1, E25 株では2種の薬剤の合わせて処理した群でのみ明らかな発現回復が観察された。E16 株でも同様の傾向は見られたが、回復した発現量は低かった。93U 株では TSA のみの処理でも発現が回復した。一方、5'-AC のみの処理では発現回復は見られなかった。従って、Runx3 の発現抑制メカニズムは E1, E16, E25 株では DNA のメチル化によるものであり、一方、93U 株ではヒストンの脱アセチル化に起因することが示唆された。

続いて、RUNX3 がマウス胃がん細胞の単層培養における増殖を抑制できるかを調べた。E1 から得られた3つの RUNX3 発現クローン (c1.1, c1.2, c1.3) を用いて増殖を調べると、最も高発現していた c1.1 で増殖が強く抑制され、発現量の少ない c1.2, c1.3 は抑制のレベルが低かった。実験に用いた4種のマウス胃がん細胞株はどれもヌードマウスに腫瘍を作らない。よって、軟寒天培養法によるマウスがん細胞の増殖を観察したが、外来 RUNX3 を発現している3クローンはコントロールの E1 細胞に比較してコロニーの大きさ、数、いずれも低下していた。また、最も高発現している c1.1 において最も顕著な抑制がみられた。

RUNX3 のがん抑制作用を更に明らかにするため、内在性の RUNX3 を発現していないヒト胃がん細胞株、MKN74 に、種々の C 末端を欠いた RUNX3 と胃がん患者から見つかった点突然変異である RUNX3(R122C) を安定に発現させいくつかのクローンを単離した。全長 RUNX3 を発現しているクローン及び、C 末端を欠損したもので転写活性化ドメインを持ったものは培養皿上の生着コロニー数が減少した。一方、RUNX3(R122C) や、転写活性化ドメインを欠いたクローンで

はコントロールとの差は見られなかった。次に RUNX3 の転写活性化ドメインが完全に欠失しているクローン (1-234) を用いてヌードマウスアッセイを行ったところ、RUNX3 全長を発現しているクローン, c1.1, c1.2 では腫瘍のサイズが抑制されたが、1-234 ではサイズの抑制が見られなかった。従って、RUNX3 は胃癌細胞において、転写活性化ドメインを用いて腫瘍形成の抑制を行うことが示唆された。

以上の結果により、RUNX3 はヒト及びマウス胃癌由来細胞の両方で増殖を抑制することが明かになった。従って、我々が以前報告した Runx3 ノックアウトマウスと合わせ、本研究で示したマウスの胃癌の系は、ヒト胃癌発症メカニズムの解析のためのマウスモデルとして有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者の所属する研究室は転写因子 RUNX3 が胃癌の抑制遺伝子である事を報告した。RUNX3 によるがん抑制活性の分子機構を解析するため、Runx3 による胃癌発生モデルマウスの作成を試みた。立松等が N-メチレン-N-ニトロサミン投与で誘導したマウス胃癌より樹立された 4 種の細胞株では Runx3 の発現が低下しており、これが DNA メチル化及びヒストンの脱アセチル化によるエピジェネティックな機構による Runx3 のサイレンシングである事が判明した。また近縁の遺伝子 Runx1, Runx2 の発現は低下しておらず、Runx3 が胃癌において特異的に不活化されることも明らかとなった。Runx3 を発現していないマウス細胞株に RUNX3 を発現させると単層培養における細胞の増殖が RUNX3 の発現量に依存して強く抑制された。また造腫瘍性を反映するといわれる軟寒天中での細胞増殖も外来性の RUNX3 により強く抑制された。これらの結果は RUNX3 がマウス胃癌由来細胞株の増殖を強く抑制することを示し、このマウスの胃癌がヒトの場合と酷似している事を示している。従ってこのマウスの実験系は RUNX3 による胃癌の発生に関するマウスモデルとして有用である事が示唆された。続いて RUNX3 の欠損変異株を用いて細胞増殖抑制機能を調べ、RUNX3 の転写活性化ドメインがこの活性のために必要である事が明らかになった。またヒトの胃癌で発見された点突然変異 RUNX3 (R122C) は細胞増殖抑制機能を失っていた。

以上の研究は RUNX3 による細胞増殖制御機構の解明に貢献し胃癌の発生機序の理解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14年10月28日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。