

|         |                                                                                                                                         |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | 和 田 まなぶ 学                                                                                                                               |
| 学位の種類   | 博 士 (医 学)                                                                                                                               |
| 学位記番号   | 医 博 第 2704 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 内 科 系 専 攻                                                                                                                     |
| 学位論文題目  | Frequent Loss of <i>RUNX3</i> Gene Expression in Human Bile Duct and Pancreatic Cancer Cell Line<br>(胆道癌、膵癌細胞株における <i>RUNX3</i> の発現の検討) |
| 論文調査委員  | (主 査)<br>教 授 湊 長 博 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 千 葉 勉                                                                                                |

### 論 文 内 容 の 要 旨

(目的) lp36に位置する *RUNX3* は、Runtドメインを有する *RUNX* ファミリーに属し、Smad2/3と結合することにより TGF- $\beta$  シグナル伝達調節に深く関与する遺伝子と考えられている。さらに、*RUNX3* ノックアウトマウスの解析を行うと胃上皮粘膜の肥厚が観察され、その原因として胃上皮細胞の増殖亢進と TGF- $\beta$  刺激によるアポトーシスの抑制が見られること、胃癌における *RUNX3* の発現低下が見られること、および *RUNX3* に mutation のある胃癌細胞をヌードマウスに皮下接種すると腫瘍形成の増加を認めることなどにより *RUNX3* は癌抑制遺伝子であると考えられている。この lp36 領域は胃癌、胆道癌、膵癌などの消化器癌をはじめ、様々な癌細胞において高頻度に欠失が認められることは既に報告されている。一方、胆道癌、膵癌において TGF- $\beta$  /Smad 経路の障害はその腫瘍化に重要な役割を持つと考えられている。そこで本研究申請者らは胆道癌、膵癌における *RUNX3* の関与について検討した。

(方法と結果) ヒト胆道癌細胞株10株、膵癌細胞株12株を用いて検討した。ノザンプロット法、RT-PCR法により *RUNX3* の発現を調べた所、胆道癌細胞株10株中7株 (70%)、膵癌細胞株12株中9株 (75%) に *RUNX3* の発現低下を認めた。Methylation specific PCR 法によりプロモーター領域のメチル化を確認すると、*RUNX3* の発現の無い癌細胞株 (16株) の全てに *RUNX3* のプロモーター領域のメチル化を認めた。さらにメチル化阻害剤である 5'-AZA で処理することにより発現の無かった癌細胞株全てに *RUNX3* の発現を認めるようになった。また、FISH法により *RUNX3* が位置する lp36 領域の欠失の有無を調べたところ、*RUNX3* の発現の無かった16細胞株のうち15細胞株に hemizygous deletion の存在を確認した。また、胆道癌細胞株10株中3株 (30%)、膵癌細胞株12株中7株 (58%) に *Smad4* の発現低下を認めたが、TGF- $\beta$  type II receptor の発現低下は22株中1株のみであり、かつ mutation も認めなかった。

(結語) 胆道癌、膵癌細胞株では高頻度に *RUNX3* の発現が低下していることを証明した。またその原因がプロモーター領域のメチル化と *RUNX3* 領域の hemizygous deletion によることが確認された。TGF- $\beta$  type II receptor や *Smad4* の以上以外の因子として、*RUNX3* の発現低下が TGF- $\beta$  type II receptor の障害を来すことにより、胆道癌、膵癌の腫瘍化に重要な役割を果たしていると考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

lp36に位置する *RUNX3* は、Runtドメインを有する *RUNX* ファミリーに属し、Smad2/3と結合することにより TGF- $\beta$  シグナル伝達調節に深く関与する遺伝子と考えられている。そこで本研究で申請者らは、TGF- $\beta$  シグナルに高率に異常が存在する膵胆道癌における *RUNX3* の異常について検討した。実験にはヒト胆道癌細胞株10株、膵癌細胞株12株を用いられた。*RUNX3* の発現をノザンプロット解析と RT-PCR 法にて調べたところ、胆道癌細胞株10株中7株 (70%)、膵癌細胞株12株中9株 (75%) に発現低下を認めた。また、*RUNX3* のプロモーター領域のメチル化を Methylation specific PCR にて検討したところ、*RUNX3* の発現の無い癌細胞株16株の全てに *RUNX3* のプロモーター領域のメチル化を認めた。さらに

メチル化阻害剤で処理することにより発現の無かった癌細胞株全てに *RUNX3* の発現が回復した。また、FISH 法により *RUNX3* の発現の無かった16細胞株のうち15細胞株に *RUNX3* 領域の欠失の存在を確認した。これらより、*RUNX3* の発現の低下の原因がプロモーター領域のメチル化と *RUNX3* 領域の欠失によることが確認された。また、胆道癌細胞株3株 (30%)、膵癌細胞株7株 (58%) に *Smad4* の発現低下を認めたが、*TGF- $\beta$  type II receptor* の発現低下は22株中1株のみであった。以上より *RUNX3* の発現低下が胆道癌、膵癌の腫瘍化に重要な役割を果たしていると推察された。以上の研究は胆道癌、膵癌の腫瘍化の解明に貢献し、胆道癌、膵癌の診断、及び治療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16年1月19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。