



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高橋, 孝夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/15011

氏名 (本籍) 高橋孝夫 (岐阜県)
 学位の種類 博士 (医学)
 学位授与番号 乙第 1266 号
 学位授与日付 平成 13 年 1 月 17 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当
 学位論文題目 Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers
 審査委員 (主査) 教授 佐治重豊
 (副査) 教授 藤原久義 教授 森 秀樹

論文内容の要旨

ヒト癌が遺伝子レベルにおいて不安定であることはよく知られている。この不安定性は大きく二つに分けることができ、塩基置換、欠失、挿入といったヌクレオチドレベルでみられるものと、染色体レベルでのもっと大きな変異で、肺癌、大腸癌をはじめとする固形癌でしばしばみられる染色体の数的異常、いわゆるaneuploidy、染色体レベルでの構造的異常であるtranslocationやLOHである。最近のmolecular biologyの進歩で、数々の遺伝子異常が解明されたが、染色体の数的異常のメカニズムは未だ十分には解明されていない。

ヒトの染色体は遺伝情報の正確な複製と正確な分配の過程を経て、安定に娘細胞へと受け継がれていくが、この染色体安定維持の機構に狂いが生じると染色体の異数化 (aneuploidy) や癌などの固体にとって重篤な悪影響が及ぶ。このような不都合な事態を未然に防ぐ目的で細胞にはゲノム編成の維持機構が存在し、細胞周期の進行には多くのチェックポイント機構が張りめぐらされている。その中で、M期チェックポイントは酵母からヒトまでよく保存された染色体分離の制御メカニズムで、複製された姉妹染色分体が紡錘体の両極から伸びてきた微小管と正しく結合するまでmetaphaseにとどめ、anaphaseへの進入を止め、染色体の不均衡な分配を抑える機構である。この紡錘体の形成異常を監視するM期チェックポイントの異常は、染色体の分配に狂いを生じさせ、染色体不安定性の原因となることが推察され、癌の発生あるいは進展に関与すると考えられる。

そこで、申請者らはまずヒト肺癌細胞株を用いてM期チェックポイント異常について検討を行った。その結果、肺癌において高頻度にM期チェックポイントの異常を示したことから、このチェックポイントに関与する遺伝子群の変異の有無を検討した。

【材料と方法】

1. M期チェックポイントの解析：9株の肺癌細胞株を微小管重合阻害剤であるノコダゾール存在下で約18時間培養し、flow cytometric analysisを行った。次いで6から36時間まで、6時間ごとにノコダゾール存在下で培養した細胞株をDAPIによる蛍光核染色を行い、mitotic index (生細胞に占めるM期細胞の割合) を測定した。

2. PT-PCR-SSCP法による遺伝子変異の解析：hsMAD2はopen reading frame (ORF) を3領域に分け、 $[^{32}\text{P}]$ dCTP存在下でRT-PCR-SSCP法を用いて解析した。5%グリセロールを含むアクリルアミドゲルとグリセロールを含まないアクリルアミドゲルを用い室温と4°Cの両方で電気泳動した。p55CDCはORFを9領域に分けてhsMAD2と同様、 $[^{32}\text{P}]$ dCTP存在下でRT-PCR-SSCPを施行した。シフトバンドをゲルより切り出し、再度PCRを行いシーケンスを行った。

3. サザンプロット、ノザンプロット解析：サザンプロットは5 μg のgDNAを、ノザンプロットは10 μg のtRNAを用いて施行した。

4. 染色体マッピング：hsMAD2とhsMAD2 Ψ の染色体マッピングはStanford G3とGenebridge4 radiation hybridを用いて行った。

【結果】

1. ヒト肺癌細胞株を用いたM期チェックポイント異常の検討：9株のヒト肺癌細胞株をノコダゾール存在下で培養後flow cytometric analysisすると、18時間後には全ての細胞株で細胞周期がDNA content, 4Nに集積した。DAPIによる蛍光染色では、NCI-H460はほとんどの細胞がM期で停止していたが、SK-LU-1やPC-1はほと

んどの細胞がM期では停止せず間期の形態を示し、細胞間に明らかな違いが観察された。6時間ごとにmitotic indexを測定すると、4つの細胞株で44.4%にノコダゾール処理によるM期停止の消失、あるいは顕著な低下を認め、高頻度にM期チェックポイントの異常を示すことが示唆された。

2. M期チェックポイント関連遺伝子群の異常について：上記の検討結果、肺癌細胞株において高頻度にM期チェックポイントの異常が検出されたので、肺癌細胞株21例、原発性肺癌25例を用いてM期チェックポイントに重要な働きをしているhsMAD2の遺伝子変異をRT-PCR-SSCP法で解析した。その結果、SK-LC-10、ACC-LC-97に共通するシフトバンドと、PC-1、QG90、SBC3にみられるシフトバンドが観察された。シークエンスの結果、前者はコドン143に存在するpolymorphismのため、後者は数塩基の置換、14塩基の挿入、数塩基の欠失を認め、frame shiftを起こすことからpseudogeneの存在が明らかとなった。このpseudogeneはRT-PCRで発現を認め、また、genomic DNAを用いたPCRでイントロンが欠失していたことからtranscribed and processed pseudogeneであることが判明し、radiation hybridマッピング法により14q21-q23に位置することを証明した。次に、APCを正に制御し、酵母ではdominant変異体の報告があるp55CDCについて、同様の検体を用いて検討したが体細胞突然変異は認めなかった。以上よりhsMAD2遺伝子とp55CDC遺伝子は、ともに体細胞突然変異を認めず、hsMAD2遺伝子はコドン143にCCAからCCGへのアミノ酸置換を伴わないpolymorphismを、また、p55CDC遺伝子はコドン144にTATからTACへのアミノ酸置換を伴わないpolymorphismのみを認めた。同検体を用いてhsMAD2遺伝子とp55CDC遺伝子のサザンブロット、ノザンブロット解析を施行したが、大きな変異や発現異常は認めなかった。

さらに他のM期チェックポイントに関連する遺伝子の変異を検索した。大腸癌で体細胞変異が報告されているBUB1でM期チェックポイント異常を認めた肺癌細胞株について変異検索を行ったが、今回の検討で体細胞変異は認められなかった。また、ゲノムの安定性に重要な役割を果たし、肺癌を含む多くの癌で異常が報告されているp53遺伝子の異常とM期チェックポイント異常には明らかな相関は認められなかった。

【考察と結語】

M期チェックポイントにはkinaseであるBUB1、BUB1をkinetochoreに結合させているBUB3、紡錘体と染色体の結合異常を感知し、p55CDCに伝達するMAD2、リン酸化をうけMAD2をkinetochoreにrecruitさせるMAD1、その他BUB2、BUB1R、MAD3、MPS1など多数の因子が関与していることが、出芽酵母の遺伝学的解析等から明らかにされている。さらに、紡錘体形成異常のsignalはAPC (anaphase-promoting complex) の活性化に必要なp55CDCを介してAPCの活性化を抑制することにより、metaphase-anaphase transitionを抑えていると考えられている。今回検索した申請者らの研究結果、高頻度に染色体異数性を示す肺癌において、約44%の細胞株でM期チェックポイントの異常が検出された。また、M期チェックポイント関連遺伝子である、hsMAD2、その下流遺伝子であるp55CDCにpolymorphismが検出された。さらに、hsMAD2 transcribed and processed pseudogeneの存在を明らかとし、染色体14q21-q23に位置することを証明した。今後、他の関連遺伝子についても同様に解析を進め、肺癌におけるM期チェックポイント異常の分子機序を明らかにしてゆく必要があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者 高橋孝夫らは肺癌においてはじめてM期チェックポイントの異常を高頻度に認めることを証明した。また、M期チェックポイント関連遺伝子である、hsMAD2、その下流遺伝子であるp55CDCには体細胞突然変異を認めなかったため、他の関連遺伝子について解析する必要性を示唆した。M期チェックポイントの異常は染色体の分配に狂いを生じさせ、染色体不安定性の原因となることが推察され、癌の発生あるいは進展に関与すると考えられている。以上の研究結果は、癌の発生あるいは進展を考えていく上でM期チェックポイントという新しい視点の重要性を裏づけ、M期チェックポイント異常の分子機構を明らかにすることで今後の癌研究の進歩に少なからず寄与するものと考えられる。

【主論文公表誌】

Identification of frequent impairment of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers

1999年 Oncogene 18 : 4295~4300