

岡田和也(長崎県)昭和38年6月2日生

授与年月日 平成8年3月31日

主論文 Isolation of human *nm23* genomes and analysis of loss of heterozygosity in primary colorectal carcinomas using a specific genomic probe

ヒト *nm23* ゲノム DNA の単離と特異的プローブを用いた大腸癌症例の LOH 解析

岡田和也, 浦野 健, 五井孝憲, 馬場秀夫, 山口明夫, 古川鋼一, 珠玖 洋

Cancer Research 54, 3979-3982, 1994

長崎大学医学部腫瘍医学教室

(主任代理: 竹本泰一郎教授)

#### 論文内容の要旨

##### 緒言

*nm23* 遺伝子は、転移能の異なるマウスメラノーマ細胞株を用いて単離され癌転移抑制遺伝子と考えられている。本遺伝子にはヒトにおいて *nm23-H1* および *H2* 遺伝子の2つのアイソタイプが存在し互いに高い相同性があることが知られている。各々のアイソタイプは核酸合成に必須な nucleoside diphosphate (NDP) kinase 活性を持っていることが確認され、生命の維持に欠かすことのできない遺伝子であることが指摘されている。また、その遺伝子産物は細胞の分化や増殖、形態形成、細胞内情報伝達や転写調節などに関わっており、その機能が多岐にわたっていることが明らかにされてきた。臨床症例における検討では、乳癌を含むいくつかのヒト癌症例において *nm23* の発現と癌転移の間に負の相関関係があることが報告されているが、癌細胞の転移能獲得に *nm23* の発現低下がどのように関与しているのかそのメカニズムについては不明のままである。

本研究では、多彩な生物学的機能を有する *nm23* 遺伝子の癌転移における分子機構を解析するために、ヒトの *nm23* ゲノム DNA を単離しその構造を明らかにするとともに遺伝子発現と遺伝子欠失との関連について検討を加えた。

#### 材料および方法

ゲノム DNA のクローン化：ヒト胎盤高分子ゲノム DNA を部分切断し、ファージベクター EMBL3 およびコスミドベクター pWEX にライゲーションさせたライブラリーを用いてスクリーニングを行った。*nm23-H1* cDNA をプローブとして  $1 \times 10^6$  個のプラークから *nm23-H1* を含むファージクローン ( $\lambda 6$ ,  $\lambda 7$ ) を得た。また、コスミドライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションを行い *nm23-H1* と *H2* の両方の遺伝子を含むクローン ( $\rho$ ) を得た。

*nm23* ゲノム DNA の構造解析：得られたクローンをプラスミドベクター pBSK にサブクローニングし、エクソン-イントロン構造ならびに制限酵素部位を決定した。エクソン-イントロン連結部位はジデオキシ法によるシーケンスを行い塩基配列を決定した。

Loss of heterozygosity (LOH) の検出：同一患者の大腸癌組織および正常組織よりゲノム DNA を抽出し制限酵素 *Bgl*II で切断した後、*nm23-H1* 遺伝子のイントロン IV が特異的プローブとなることを用いて Southern blots により検出した。

大腸癌症例における *nm23-H1* の発現：腫瘍および正常組織より RNA を調製後、*nm23-H1* cDNA をプローブとして Northern blots により検出した。

#### 結果

##### 1. ヒト *nm23-H1* および *H2* ゲノム DNA のクローニング

ヒト胎盤ファージライブラリーからヒト *nm23-H1* cDNA をプローブとして独立した 2 個の陽性クローン ( $\lambda 6$ ,  $\lambda 7$ ) を得た。得られたクローンは全長が約 14kb で、Nm23-H1 蛋白をコードする全ての領域を含んでいた。次に、*nm23-H1* ゲノム DNA のイントロン IV をプローブとしてコスミドライブラリーをスクリーニングし、全長が約 25kb で一部  $\lambda 6$  および  $\lambda 7$  と重複したクローン ( $\rho 1$ ) を単離した。 $\rho 1$  クローンには Nm23-H1 蛋白に加え *H2* 蛋白をコードとする DNA 領域が含まれていた。

##### 2. ヒト *nm23-H1* および *H2* ゲノム DNA の遺伝子構造

単離したゲノム DNA をサブクローニングし、制限酵素によるマッピングを行った。ヒト *nm23-H1* および *H2* 遺伝子はそれぞれ 5 つのエクソンと 4 つのイントロンにより構成され、互いに 4kb の距離を置いてタンデムに配列していた。

##### 3. エクソン-イントロン連結部の塩基配列

*nm23-H1* および *H2* ゲノム DNA のエクソン-イントロン連結部のシーケンスを行い、スプライシング部位に認められる共通配列と一致することを確認した。また、2 つのアイソタイプにおいてエクソン-イントロン連結部におけるスプライシング部位は同一であった。

##### 4. ヒト大腸癌症例における *nm23* 遺伝子の LOH

いくつかのヒト細胞株よりゲノム DNA を抽出し *nm23* 遺伝子に対する特異的プローブを用いて Southern blots を行ったところ、*Bgl*II 酵素切断により 7.6kb と 2.3kb の多型性バンドが検出された。ヒト大腸癌症例 42 例について LOH を検討したところ、正常組織において 2 本のバンドが認められた患者 29 例中 3 例に LOH を認めた。また、LOH が認められた 3 例はいずれも LOH が存在しない他の症例に比べ腫瘍組織におけるその発現量が低下していた。

#### 考察ならびに結語

癌細胞における *nm23* 遺伝子発現量の変化 (減少) の主な原因として LOH および転写調節の 2 つの可能性が考えられる。しかしながら、ヒトのゲノムの中には真の *nm23* 遺伝子のほかにプロセスされた偽遺伝子の存在が示唆されており、これまで Southern blots による LOH の詳細な解析は困難であった。本研究では、ヒト *nm23* ゲノム DNA から特異的プローブを見出し大腸癌症例の LOH について解析した。LOH は約 10% に認められたが、いずれの症例も mRNA レベルは低下しており遺伝子欠失が発現低下に及ぼす影響が示唆された。

単離したゲノム遺伝子のプロモーター領域の研究から、*nm23* 遺伝子は LOH などの遺伝子変化とともに多くの転写因子による発現調節機構によりその発現量を変化させていることが明らかとなった。すなわち、2 つのアイソタイプ *nm23-H1* および *H2* はさまざまな転写因子により独立に転写調節を受けていることが明らかにされた。また、多彩な機能を持つ *nm23* が組織の種類により異なる転写調節を受けている可能性が示唆された。今後は、癌転移過程における *nm23* の役割を検討する上で、*nm23* を中心とした転写ネットワークや分子間相互作用などをより詳細に解明することが重要であると思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

岡田和也は昭和 63 年 3 月長崎大学医学部を卒業、研修医 (2 年間) および病院勤務 (2 年間) の後、平成 4 年 4 月長崎大学大学院医学研究科に入学、所定の単位を取得し、現在に至っている。

学位提出論文は *Cancer Research* (1994) に掲載が受理された "Isolation of human *nm23* genomes and

analysis of loss of heterozygosity in primary colorectal carcinoma using a specific genomic probe”である。

本研究は、癌転移抑制機能をもつと考えられるヒト *nm23* 遺伝子の *H1* および *H2* アイソタイプを単離し、次いでゲノム構造の解析結果から *nm23-H1* 特異的プローブを作製し、それを用いて大腸癌組織におけるヘテロ接合性の喪失 (LOH)、および *nm23-H1* の発現との関係を調べたものである。

(1)既に単離されていた *nm23*-cDNA をプローブとしてヒトゲノム DNA フェージおよびコスミドライブラリーをスクリーニングし、前者から *H1* を含むクローン、および後者から *H1* と *H2* 遺伝子を含むクローンを単離した。次にこれのプラスミドサブクローニングを行った。

(2)クローンインサートについて制限酵素地図を作製し、次いで塩基配列決定によりエクソン・イントロン配列を同定した結果、*nm23-H1* と *H2* はゲノム上では 4 kb の距離をおいて縦列し、各々 5 個のエクソンと 4 個のイントロンで構成されていることを明らかにした。

(3)ザザン解析の結果、イントロン 4 の塩基配列が *nm23-H1* 特異的な *Bgl*III 多型プローブとなることが判明したので、これを用いて 42 例の大腸癌組織における LOH を検索した。多型情報を得た 29 例中 3 例 (10.3%) に LOH を検出した。次いで、腫瘍組織における LOH の有無と *nm23-H1* の発現の関係をノザン解析でみた結果、LOH 症例では発現量が減少していた。

本研究は、ヒト *nm23* 遺伝子のゲノム構造を始めて明らかにしたこと、*nm23-H1* 特異的プローブを利用した解析で LOH 確実例を検出したこと、LOH と *nm23-H1* の発現に逆相関をみいだしたことが特筆すべき新知見である。その後岡田和也は本研究をさらに発展させ、*nm23-H1* と *nm23-H2* が各々独立に転写調節を受けていることを明らかにした。これらの一連の研究は、癌転移の細胞生物学的機序解明に大きく寄与するものであり、学位に値する研究であると判断した。

審査担当者 主査 教授 新川 詔夫  
副査 教授 中根 一穂  
副査 教授 兼松 隆之