博士（医　学）　古　内　恵　司

学 位 論 文 題 名

酵母の色彩変化によるAPC遺伝子の変異検出法（APC Yeast Color Assay）の開発

学位論文内容の要旨

（背景・目的）

癌抑制遺伝子APCは家族性大腸ポリポーシスFAPの原因遺伝子として同定され，後に非遺伝性大腸癌を初めとする膵臓や胃そして食道等の腫瘍でもこの遺伝子変異が認められた。このことから，APCの遺伝子変異は様々な癌の発生や進展に関与すると考えられており，APC変異の診断を行うことはFAPの遺伝子診断だけでなく癌の多段階発癌過程の解析にも重要である．

APCの遺伝子産物は2843アミノ酸からなる巨大な分子であるため，従来の方法を用いて全長の診断を行うことは困難であった．例えば，RNase Protection法やSSCP法を用いると小さな領域に分割して診断するために多大な労力と時間が必要とされ，そのうえ手技の習熟やラジオアイソトープの使用も必要であった．さらにFAP患者の遺伝性APC変異をin vitroもしくは酵母内で検出するprotein truncation tes法では，検出感度が低いあるいは煩雑なレプリカ操作を必要とするなど正常組織が混入する癌組織でのAPCの遺伝子診断には不向きな技術であった．そこで，著者はこれらの問題点を解決したより実用的なAPC Yeast Color Assay法を考案し，有用性と実用性および問題点を検討した．

（方法・結果）

1. APC Yeast Color Assayの確立

APC cDNA8.5kbpの翻訳領域を末端が重複する5つの領域に分割してPCR増幅を行い，それぞれの増幅DNA断片を読み枠が一致するようにADE2遺伝子の前方に挿入した。この結果、APC-ADE2の融合蛋白を発現する5つのプラスミドが作製され、これらのプラスミドをそれぞれ酵母に導入するといずれもADE2（+）の表現型（白色コロニー）になった．一方，APC cDNA内部にフレームシフト変異を持つプラスミドを導入した酵母ではADE2(-)の表現型（赤色コロニー）になった．この結果，APC-ADE2発現ベクターを用いることにより，APC配列の読み枠が正常か異常かを正確に区別して酵母コロニーの色彩で表示できることが確認された．

2. APC Yeast Color Assayに於ける赤コロニー形成率と変異APCとの関係

HCT116（正常APC）とDLD1（変異APC）細胞株を一定比率に混合した細胞集団からDNAおよびRNA抽出して本アッセイを行うと、変異型APCを持つ細胞数の増加に伴いほぼ同一の直線関係で赤コロニーの形成率が増加することが示された．

3. 大腸癌細胞株を用いたAPC Yeast Color Assay

5種類のヒト大腸癌細胞株を用いて本アッセイを行ったところ，SW480とColo201そしてColo320DM細胞株では1つの領域で96%以上の赤コロニーが形成された．DLD1細胞株では2つの領域で100%と50%の赤コロニーが形成され，HT-29細胞株でも2つの領域で30%と70%の赤コロニーが形成された．これらいずれの領域からもクローナルなAPC変異が同定された．一方，野生型APC蛋白を発現するHCT116細胞株と正常粘膜上皮（M1）では0~9.9%の赤コロニーが形成されたので，10%以上の赤コロニーが形成された場合を変異有りとみなして解析を進めた．

4. FAP患者ポリープと大腸癌組織に於けるAPC遺伝子変異の検出

FAP患者由来の大腸正常粘膜上皮（M2,3）と2つのポリープ（P3-1,2）では，いずれも約50%（48.9%）の赤コロニーが形成され、塩基配列の決定から遺伝性のAPC変異が同定された．さらに79%の赤コロニーが形成されたP3-2には新たなAPCの体細胞変異が同定された。続いて，ヒト大腸癌組織18例からRNAとDNAを抽出してAPCの遺伝子診断を行ったところ，11例（61%）の腫瘍で赤コロニー形成率が10%を越え，8個の腫瘍に1個づつそして3個の腫瘍に2個づつ変異が同定された．これらのサンプルではDNA及びRNAいずれからも同一の変異が検出され，赤コロニーの形成率もほぼ同程度であった．本研究で同定された14個（ポリープの体細胞変異1個と大腸癌の13個）のAPC変異のうち10個の変異がAPC mutation databaseに登録されており，mutation cluster regionに6個の変異があり，ナンセンス変異5例全てがシトシンの塩基置換であった．また，APC遺伝子変異はTNM分類のステージII~IV（6/13例）よりもステージ0~I（5/5例）で高頻度に認められ，主に高分化型腺癌にAPC変異が認められた．このことから、本アッセイでは臨床材料中のAPC変異を検出することが示された。

（考察）

遺伝子変異の診断法としては，簡便で低コストなだけでなく客観性と再現性にすぐれた方法が望まれる．本法による変異の有無は、酵母コロニーの色彩で判定が可能でしかも塩基配列の決定も速やかに行えるので，上記の遺伝子変異診断法としての必要な条件をほとんど満たすと考えられる．臨床材料中の正常組織の混入は遺伝子診断の障害となるが，本アッセイでは17%以上の赤コロニーが形成された大腸癌組織全例に変異を検出できた．しかも、DNAとRNA両方から同一の変異が検出されたので，臨床材料中のAPC変異を効率的に検出していることが示された．従って，本アッセイ法は正常組織の混入する臨床材料に対しても有効な診断技術であることが示された．

APC cDNA全長を一回のPCRで増幅して診断を行うためには、少ない複製エラーで増幅できるDNAポリメラーゼが必要となる。現在この条件を満たす酵素はないため、本アッセイ系ではAPC cDNAを5つの領域に分割したが，変異APCの塩基配列を決定する上でむしろ狭い領域の解析ですむのでむしろ利点と考えられた．本法で問題となるのはミスセンス変異を検出できないことである．しかし，本アッセイ法でRNAを用いるとAPC変異の約95%（ナンセンス及びフレームシフト変異）の検出が可能で，しかも体細胞変異の94%が巨大なエクソン15に位置していることから，DNAのみを用いても約90%のAPC変異が検出可能である．従って，保存状態が悪い材料でも通常はDNAの抽出が可能なため，本アッセイ法では適応範囲は広くなる．さらに本法は読み枠の異常を検出する方法なので，APC遺伝子同様にナンセンス変異やフレームシフト変異の多い遺伝子の診断法と

しても応用できる．

本アッセイ法では，臨床材料を入手してから酵母赤色コロニーの判定までに3～4日で診断が行えるので，診断に必要な時間は大幅に短縮される．また，微量のポリープや腫瘍組織いずれに対しても診断できることが示されたので，今後内視鏡検査等の微量な生検や様々な癌組織のAPC変異の診断法として臨床応用が期待される．

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　守　内　哲　也

副　査　　教　授　　籐　堂　　省

副　査　　教　授　　田　中　一　馬

学位論文題名

酵母の色彩変化によるAPC遺伝子の変異検出法（APC Yeast Color Assay）の開発

癌抑制遺伝子*APC*の変異は、主に消化器癌の発生や進展に関与すると考えられている。しかし*APC*の遺伝子産物は2843アミノ酸からなる巨大な分子でこれをコードするcDNAは8.5 kbの長さを持っている。このため、従来の遺伝子診断法ではAPC cDNAを全長にわたって解析することは事実上困難であった。そこで、申請者は酵母を用いてこれらの問題点を解決する実用的なAPC Yeast Color Assay法を開発した。

APC cDNAを５つの領域に分割し、それぞれのAPC cDNA断片を酵母のアデニン代謝酵素であるADE2遺伝子に読み枠が合うように連結した。このようにして５つのAPC-ADE2融合蛋白の酵母発現ベクターを作製した。これら５つのベクターの中央の大部分を制限酵素で除去して線状化ベクターとし、大腸癌細胞株のRNAおよびDNAからPCR増幅したAPC DNA断片と共にADE2欠損酵母株に導入した。酵母内では相同組み換えによりDNA断片が線状化発現ベクターに組み込まれ、APC-ADE2融合蛋白が産生されて酵母コロニーは白となる。しかしAPC のDNAに読み枠の変異がある場合にはこの融合蛋白が産生されずADE2欠損となるため酵母コロニーは赤くなる。HCT116（正常*APC*）とDLD1（変異*APC*）細胞株を一定比率に混合してアッセイを行うと、DNA及びRNAのいずれを用いても変異型*APC*を持つ細胞数の増加に伴い赤コロニーの形成率も増加してほぼ同一の直線関係が示された。

ヒト大腸癌細胞株を用いてアッセイした結果、SW480、Colo201、DLD1、Colo320DM細胞株では96%以上の赤コロニーが形成された。DNA塩基配列を決定した結果、クローナルな*APC*変異が同定された。一方、野生型APCを発現するHCT116細胞株では0~6.4%、正常大腸粘膜上皮（M1）では2.0~9.9%の赤コロニーがbackgroundとして形成された。

FAP患者由来の大腸正常粘膜上皮（M2,3）と2つのポリープでは、いずれも約50%の赤

コロニーが形成されて遺伝性の*APC*変異が同定された。続いて、ヒト大腸癌組織18例からRNAとDNAを抽出して*APC*の遺伝子診断を行ったところ、11例（61%）の腫瘍で赤コロニー形成率が10%を越えた。解析の結果、8個の腫瘍に1個づつそして3個の腫瘍に2個づつ変異が同定された。これらのサンプルではDNA及びRNAいずれからも同一の変異が検出された。14個（ポリープの体細胞変異1個と大腸癌の13個）の*APC*変異のうち10個がdatabaseに登録されており、また6個の変異がmutation cluster regionに位置していた。また、ナンセンス変異5例全てがシトシンの塩基置換であった。また、*APC*遺伝子変異はTNM stage II~IV（6/13例）よりもstage 0~I（5/5例）で高頻度に認められ（$P<0.05$）、変異の大多数（7/10）は高分化型腺癌に認められた。

本法では、変異の有無は酵母コロニーの色彩だけで判定可能となりしかも塩基配列の決定も速やかに行えるので、遺伝子変異診断法としての必要な条件をほとんど満たしている。本アッセイ系では17%以上の赤コロニーが形成された大腸癌組織全例に変異が検出できたので、本法は正常組織の混入する臨床材料に対して特に有効な診断技術であると考えられた。

本アッセイ法でRNAを用いると*APC*変異の約95%の検出が可能で、しかも体細胞変異の94%が巨大なエクソン15に位置していることから、DNAのみを用いても約90%の*APC*変異が検出可能である。従って、本アッセイ法では保存状態が悪い材料であっても通常はDNAの抽出が可能なため適応範囲は広くなりこの方法の利点と考えられる。

公開発表に於いて田中一馬教授よりミスセンス変異も検出できる技術が開発可能か、検出感度を高める方法についての質問があった。ついで籐堂省教授より本法の臨床応用への利用方法についての質問があった。また守内哲也教授より乳癌での検出結果と今後変異診断の対象とすべき癌に関しての質問があったが申請者はいずれの質問に対しても妥当な回答を行った。

この論文は、実用性の高いAPC遺伝子の変異診断法を新たに考案した点で高く評価され、今後内視鏡検査等の微量な生検や様々な癌組織の*APC*の遺伝子変異の診断技術として臨床応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程に於ける研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。