

学 位 論 文 題 名

Detection of PTEN nonsense mutation and  $\psi$ PTEN expression in central nervous system high-grade astrocytic tumors by a yeast-based stop codon assay

(中枢神経系悪性星細胞腫における PTEN 遺伝子ノンセンス変異及び偽遺伝子 $\psi$ PTEN の発現を検出するための酵母ストップ・コドン・アッセイに関する研究)

学位論文内容の要旨

Glioblastoma は中枢神経系腫瘍のうち最も頻度の高いものの一つであり、かつ非常に悪性度が高く、いまだ予後不良の疾患である。Glioblastoma における遺伝子変異はこれまで数多く報告されているが、なかでも染色体 10q の欠損は約 70%の症例においてみられている。同部位には三つの腫瘍抑制遺伝子 (PTEN, DMBT-1, human neuralized) の存在が同定されており、近年注目されている。PTEN 遺伝子の異常は Glioblastoma の他、前立腺癌、乳癌、腎癌など多くの癌において発見され、ヒト細胞の癌化に重要な役割を果たしていると考えられている。PTEN 遺伝子は、403 のアミノ酸配列からなる、tensin と高い相同性を持つ脱リン酸化作用を有する蛋白質をコードする腫瘍抑制遺伝子であり、この蛋白質は phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3)を標的とし、protein kinase B/Akt pathway を介して、細胞の G1 停止や apoptosis を誘導することが証明されて来た。これまで発見された本遺伝子異常の多くは nonsense 変異であるため、我々は、腫瘍組織における PTEN nonsense 変異の検出が有用であると考え、短時間で効率良く nonsense 変異が検出可能な assay 法、「酵母を用いた PTEN stop codon assay」を開発した。本 assay は、検体から PCR 増幅した PTEN 遺伝子を酵母内に vector と相同組み合わせ、PTEN::ADE2 chimera 蛋白を発現させる事で酵母を発色させる。PTEN 遺伝子が野生型の場合は酵母は白色を、nonsense 変異が存在する場合は赤色を呈する。また、臨床 sample を用いて検証したところ、本 assay では検体において  $\psi$ PTEN 遺伝子が発現された場合は酵母はピンク色を呈することも判明した。

本 assay 法の確立のために、まず特異的 vector “pMT19” を作製した。既存の Vector pLS381 の CYC promoter の後に両端 BamH I site を持つ PTEN open reading frame を挿入し、PCR mutagenesis にて PTEN::ADE2 移行部の PTEN 遺伝子 amber codon を 3つの glycine に入れ替えた。これを Bgl II/Nhe I

酵素で linearize し、codon 40 と 365 に Pvu II site を持つ PTEN cDNA と組み換え pMT19 を得た。本 assay で使用する際には、pMT19 を Pvu II 酵素で linearize し、calf intestinal alkaline phosphatase にて断端処理し安定化させた。

検体から mRNA を抽出し、SuperScript II 酵素にて逆転写し、Pfu polymerase 酵素にて PCR 増幅にて得た cDNA と vector と共に酢酸リチウム法にて ADE2 欠損酵母株 yPH857 に導入した。Ura 欠損 adenine 制限培地にて 30℃ 3 日間培養後、酵母から plasmid を抽出した。これを XL-1 blue E. coli に導入し増幅後、ABI 377 automated sequencer を用いて全長塩基配列の決定をした。

まず circular type pMT19 と Pvu II にて linearized type pMT19 をそれぞれ酵母株に導入し、本 assay の back ground を検討した。Circular pMT19 の方は大量の (平均 500 以上/プレート) 白色コロニーを呈するに対し、linearized pMT19 の方は僅かの (平均約 5 個/プレート) 白色コロニーを呈した。両方とも赤色コロニーの発育は見られなかった。次に、市販の健常人 sample 成人・胎児各臓器 cDNA を用いて assay を行ったところ、成人では  $7.2 \pm 1.4\%$ 、胎児では  $2.9 \pm 0.5\%$  の赤コロニーを示し、本 assay の赤色コロニーの back ground が 10% 以下であることを確認した。本 assay の定量性については、塩基配列の確認された nonsense 変異と wild type との PTEN cDNA を、その比 0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100% に混合し検討した。その結果、それぞれ 1, 8, 16, 26, 38, 49, 72, 99% (6 回の平均値) と混合率とほぼ同等の赤色コロニーが出現し、本 assay の定量性が確認された。

以上の基礎実験を踏まえ、astrocytic tumor 42 例の臨床検体を用いて本 assay を行った。腫瘍組織の内訳は、pilocytic astrocytoma (PA)(WHO: grade I) 6 例、astrocytoma (AS)(grade II) 8 例、anaplastic astrocytoma(AA)(grade III) 10 例と glioblastoma (GBM)(grade IV) 18 例である。

赤色コロニーが 10% 以上の場合を陽性と判定し、腫瘍 nonsense mutation を有すると判断した。Assay の結果: Low grade astrocytoma 14 例中は、すべて陰性であった。一方、AA で 1 例(10%)、GBM では 6 例(33%)が陽性を示した。また、PA 1 例(17%)、AS 3 例(37%)、AA 2 例(20%)、GBM 9 例(50%)においては、ピンクコロニーの発現が見られた。塩基配列決定: 赤色のコロニーは 7 例全例で遺伝子変異の存在を確認した。うち 4 例は exon skip による frame shift を示し、PTEN 遺伝子変異の多くは exon skip による frame shift であることが確認された。ピンクコロニーも同様に塩基配列を検討したところ、これは、染色体 9p21 に位置する PTEN の偽遺伝子  $\phi$ PTEN であることが確認された。 $\phi$ PTEN は PTEN 遺伝子と高い相同性を持ち、僅か 10 個のアミノ酸が異なるだけであり、PTEN 蛋白質との三次元構造の変化によりコロニーが pink になると考えられた。さらに、Glioblastoma においては白色コロニーも検討したが、1 例において missense 変異がみられた。以上から、GBM では計 7 例(39%)において PTEN 変異が確認された。これはこれまで報告されたとほぼ同等であった。 $\phi$ PTEN 発現は low grade astrocytoma に比べ GBM で多い傾向を示した。また興味深いことに、 $\phi$ PTEN 発現は、1 例を除き全て PTEN 変異のない症例に認められ、 $\phi$ PTEN 発現と PTEN 変異とは互いに相補的な傾向が示唆された。

この stop codon assay を用いることにより臨床検体における PTEN 遺伝子診断を簡便にできると期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 岩 崎 喜 信

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

## Detection of PTEN nonsense mutation and $\psi$ PTEN expression in central nervous system high-grade astrocytic tumors by a yeast-based stop codon assay

(中枢神経系悪性星細胞腫における PTEN 遺伝子ノンセンス変異及び偽遺伝子 $\psi$ PTEN の発現を検出するための酵母ストップ・コドン・アッセイに関する研究)

PTEN 遺伝子異常は Glioblastoma の他、前立腺癌、乳癌、腎癌、子宮内膜癌など多くの癌において発見され、ヒト細胞の癌化に重要な役割を果たしていると考えられている。これまで発見された本遺伝子異常の多くは nonsense 変異であるため、我々は、腫瘍組織における PTEN nonsense 変異の検出が有用であると考え、短時間で効率良く nonsense 変異が検出可能な assay 法、「酵母を用いた PTEN stop codon assay」を開発した。ヒト PTEN cDNA を RT-PCR 増幅し、線形化した vector(pMT19)とともに URA3, ADE2 欠損酵母株 yPH857 に導入し酵母内で gap repair を起こさせ、Ura 欠損, adenine 制限培地にて 30℃, 3 日間培養する。酵母体内で被験 cDNA を ADE2 とのキメラ蛋白として ADE2 欠損酵母株に発現させ、nonsense 変異があれば ADE2 部以前に蛋白への翻訳が停止し、酵母代謝物蓄積のため酵母コロニーは赤色を呈する。酵母コロニーからプラスミドを回収し変異の確認のため塩基配列の解析を行った。Vector 及び RT-PCR の background について検討した結果、本 assay の background は 10%以下であることが分かった。赤色コロニーが 10%以上の場合は陽性と判定し、腫瘍検体が nonsense 変異を有すると判断し、astrocytic tumor 42 例の PTEN 遺伝子における変異に関し検討した。腫瘍組織の内訳は、pilocytic astrocytoma (PA)(WHO: grade I) 6 例, astrocytoma (AS)(grade II) 8 例, anaplastic astrocytoma(AA) (grade III) 10 例と glioblastoma (GBM) (grade IV) 18 例である。

Assay の結果：Low grade astrocytoma 14 例中は、すべて陰性であった。一方、AA

で1例(10%), GBM では6例(33%)が陽性を示した。また, PA 1例 (17%), AS 3例(37%), AA 2例 (20%), GBM 9例 (50%)においては, ピンクコロニーの発現が見られた。塩基配列決定: 赤色のコロニーは7例全例で遺伝子変異の存在を確認した。うち4例は exon skip による frame shift を示し, PTEN 遺伝子変異の多くは exon skip による frame shift であることが確認された。ピンクコロニーも同様に塩基配列を検討したところ, これは, 染色体 9p21 に位置する PTEN の偽遺伝子  $\phi$ PTEN であることが確認された。 $\phi$ PTEN は PTEN 遺伝子と高い相同性を持ち, 僅か 10 個のアミノ酸が異なるだけであり, PTEN 蛋白質との三次元構造の変化によりコロニーが pink になると考えられた。さらに, Glioblastoma においては白色コロニーも検討したが, 1例において missense 変異がみられた。以上から, GBM では計7例(39%)において PTEN 変異が確認された。これはこれまで報告されたとほぼ同等であった。 $\phi$ PTEN 発現は low grade astrocytoma に比べ GBM で多い傾向を示した。また興味深いことに,  $\phi$ PTEN 発現は, 1例を除き全て PTEN 変異のない症例に認められ,  $\phi$ PTEN 発現と PTEN 変異とは互いに相補的な傾向が示唆された。

この発表に際して, 長嶋和郎教授より PTEN 遺伝子変異と腫瘍発生の関係について質問があった。次いで守内哲也教授より  $\phi$ PTEN の機能について質問があった。岩崎喜信教授からは  $\phi$ PTEN と PTEN 遺伝子の相補関係について質問があった。いずれの質問に対しても, 申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し, 豊富な知識に基づいて明解に解答した。

この論文は, PTEN 遺伝子の nonsense 変異を簡便かつ的確に診断する方法を確立した点が高く評価され, 今後臨床における PTEN の早期診断による腫瘍発生の予測と対策において役立つものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し, 大学院課程における研鑽や取得単位なども併わせ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。