

## 学位論文題名

新しいヒト癌・精巣関連遺伝子の  
クローニングとその解析

## 学位論文内容の要旨

## はじめに

癌細胞においては種々の遺伝子が活性化されているが、その中で精巣特異的な遺伝子が活性化されているという報告は極めて少ない。しかし最近の研究により、癌と正常精巣両者に発現する遺伝子群が同定された。それらの中には、宿主に免疫応答を引き起こすものがあり、癌・精巣抗原(cancer/testis antigen, CT antigen)と呼ばれる。また、それらの中には抗原性を持つことが示されていないものもある。総じて、癌・精巣抗原をコードする遺伝子を含めたこれらの遺伝子を癌・精巣関連遺伝子と称する。癌・精巣関連遺伝子は以下のような共通の性格を持っている：1)正常精巣において特異的に発現が認められ、他の正常組織にはその発現は認められない。2)悪性腫瘍において活性化が認められ、その発現は組織非特異的である。癌・精巣関連遺伝子は、その本来の生理的機能が殆どわかっていないが、腫瘍と精巣における特異的遺伝子発現のメカニズムの解析において、あるいは癌の診断と治療への応用の可能性の観点から研究されてきた。

本研究では、正常精巣と種々の癌に発現し、ヒト第15染色体にマップされる新しい癌・精巣関連遺伝子(D40)をクローニングし、その性状について解析した。

## 材料と方法

1. 培養細胞株と腫瘍サンプル：用いた培養細胞株は10%牛胎仔血清と0.3%グルタミンを含むRPMI 1640またはDulbecco's Modified Eagle Mediumで維持し、37°C、5% CO<sub>2</sub>存在下で培養した。原発腫瘍サンプルは液体窒素中で冷凍し、RNAの分離・精製まで-80°Cにて保存した。
2. D40のcDNAクローニング：報告されている転写因子GCFのコーディング領域のカルボキシル末端から2/3をpGBT-9(Clontech)に組み入れ、得られたプラスミドpGAL-GCFを酵母two-hybrid systemのスクリーニング用のbaitとして使用した。これを用いて不死化ヒトB細胞株のcDNAライブラリーをスクリーニングした。ヒスチジンおよびLacZ表現型陽性クローンD40について、GCFとの結合特異性を検討しその塩基配列を同定した。このクローンを用いて、より長いクローンを得るため、ヒト前骨髄性白血病細胞株HL60由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。さらにHL60およびTリンパ白血病細胞株Jurkat由来の全RNAとD40特異的プライマーを使用し、RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 反応を行った。
3. 染色体マッピング：D40 cDNA全長にわたる複数のcDNAクローンを混合したものをデオキシ核糖核酸標識した。このプローブcDNAをR-バンドで染色したヒト男性リンパ球由来の中期染色体標本と反応させてfluorescence in situ hybridization (FISH)法を行った。

4. *In vitro*転写と翻訳：pBluescript KS(-)内にD40 cDNAの全コーディング領域を組み入れたプラスミドpBS-D40とT7 RNAポリメラーゼ、TNTウサギ網状赤血球抽出液(Promega)とを用い、<sup>35</sup>S-メチオニン存在下で *In vitro*転写と翻訳反応を行った。
5. ウェスタンブロット法：D40蛋白質のアミノ末端に標識Flagを付加した蛋白質を発現させるプラスミドをサルCos7細胞に導入し、その細胞の抽出液をTNEバッファーを用いて調整し、抗Flag抗体を用いてウェスタンブロット法を行った。
6. RNA 分離：酸性グアニディウム・チオサイアネイト・フェノール・クロロフォルム法により、細胞株および腫瘍サンプルから全RNAを分離・精製した。
7. ノーザンブロット法およびRT-PCR：既報の方法でノーザンブロット解析を行った。RT-PCRについては、各細胞と原発腫瘍サンプルの全RNAからcDNAに逆転写したものを鋳型として、D40特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRを行った。

## 結 果

1. D40の同定とクローニング：転写因子GCFに特異的に結合する蛋白質を検索するために、酵母のtwo-hybridスクリーニングを行った。検索した120万個の酵母クローンのうち、9個のクローンはヒスチジンおよびLacZ表現型陽性であった。その内の1個をD40と名付けた。D40蛋白質とGCFとの結合は特異的であった。このクローンのDNA塩基配列を決定したところ、オープンリーディングフレームが認められた。これは3'側に停止コドンを持つが、アミノ末端のメチオニンに相当するコドンの5'側には停止コドンがなかった。このD40 cDNAクローンの塩基配列に基づいて、より長いクローンを得るために、HL60細胞由来のcDNAライブラリーのスクリーニング及び5'RACE法を行った。これらの方法により5'末端にin frameの停止コドンを持ち、D40蛋白質の全てのコーディング領域をカバーするcDNAクローンを得ることができた。D40 cDNA内のオープンリーディングフレームは887アミノ酸をコードしていた。GenBank/EMBL/DBJのデータベースに対して相同性検索を行った結果、D40蛋白質と高い相同性を示す蛋白質は認められなかった。
2. *In vitro*と*in vivo*におけるD40蛋白質の発現：D40 cDNA内のオープンリーディングフレームが正しいことを確かめる方法の一つとして*in vitro*転写および翻訳反応を行った。翻訳された蛋白質のゲル解析の結果から、分子量110-130KDの間にバンドが認められた。次に、D40 cDNAによってコードされる蛋白質について*in vivo*における発現を検討した。D40蛋白質のアミノ末端にFlag標識した蛋白質を発現させるプラスミドをCos7細胞に導入し、その細胞抽出液を抗Flag抗体を用いてウェスタンブロット法を行った。その結果、分子量120 KDを示すバンドが検出された。
3. D40の染色体上局在：FISH法によりヒト第15染色体のセントロメア領域の近く、すなわち長腕のq14-15に明らかなシグナルが認められた。他の染色体には再現性のある蛍光シグナルは認められなかった。
4. 正常ヒト組織におけるD40 mRNAの発現：ノーザンブロット法によって検討した結果、D40 mRNA(約5 kbと3.5 kb)の高い発現が精巣において認められた。また、胎盤においてはわずかながらD40mRNAの発現が認められた。しかし、それ以外の正常ヒト成人の組織においてはD40の発現は全く認められなかった。次にノーザンブロット法よりも感度の高いRT-PCR法を用いてD40の発現を確認した。ノーザンブロット法の結果と同様に、D40 mRNAは精巣において選択的に発現していることが示された。
5. 培養癌細胞株と原発癌におけるD40の発現：RT-PCR法によって種々の培養癌細胞株におけるD40の発現を検討した。その結果、悪性黒色腫、肺癌、消化器系由来の癌を含めて調べた全ての癌細胞株においてD40の発現が認められた。しかし正常胎児肺線維芽細胞株では、発現が認められなかった。次に、ヒトの原発癌におけるD40の発現を検討した。D40のmRNAは口腔癌、子宮癌、肺癌などの種々の原発癌において40%以上の発現が認められた。胆管癌、胃癌、セミノーマにはD40の発現は認められなかった。

## 結 論

本研究により、新しいヒト遺伝子D40を発見しそのcDNAの全長をクローニングした。D40 cDNAのオープンリーディングフレームは887個のアミノ酸からなる蛋白質をコードし、D40遺伝子はヒト第15染色体の長腕q14-15に局在する。D40 mRNAは精巣において選択的に発現しており、胎盤においてはわずかに発現していたが、それ以外の正常ヒト成人組織においては全く発現が認められなかった。一方、調べた全ての癌細胞株においてD40 mRNAの発現が認められた。口腔癌、子宮癌、肺癌などのヒト原発癌においては、D40 mRNAの発現が高頻度に認められた。D40遺伝子は新しい癌・精巣関連遺伝子である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 卷 暹  
副 査 教 授 西 信 三  
副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

## 新しいヒト癌・精巣関連遺伝子の クローニングとその解析

癌細胞では癌化に伴って発生母細胞では検出されないか、限られた正常細胞でしか産生されない抗原が発現する。これらの抗原は癌関連抗原と総称されるが、このうち癌細胞に発現し正常組織では精巣に特異的に発現している抗原を癌・精巣関連抗原と呼ぶ。本研究では、転写因子GCFに特異的に結合する蛋白質を酵母のtwo-hybrid法を用いてスクリーニングすることによって、新しいヒト癌・精巣関連遺伝子D40 cDNAの全長をクローニングし、その性状について解析した。in vitro転写および翻訳反応とウエスタンブロット法により、この蛋白質の分子質量は120 KDであることが示された。また、FISH法によりこの遺伝子はヒト第15染色体長腕のq14-15に座位していることが示された。ノーザンブロット法およびRT-PCR法によってヒト正常組織におけるD40遺伝子の発現を検討した結果、高い発現が精巣に、わずかな発現が胎盤において認められた。しかし、他の正常組織では全く発現が認められなかった。一方、RT-PCR法によってヒト悪性黒色腫、肺癌、消化器系癌、子宮癌、乳癌、膀胱癌、白血病など調べた全ての癌細胞株においてD40遺伝子の発現が認められた。しかし正常胎児肺線維芽細胞株では、発現が認められなかった。次に、ヒトの癌組織におけるD40遺伝子の発現を検討したところ、口腔癌、子宮癌、肺癌においては40%以上の高い頻度でmRNAの存在が認められた。

審査に当たっては、副査西教授より、1. D40遺伝子の発現頻度が癌細胞株で高く癌組織で比較的低い理由、2. D40遺伝子の他のヒト正常細胞株や他の動物組織での発現、について、質問があった。申請者はこれらの質問に対して適確な回答をおこなった。さらに副査細川教授より、1. D40蛋白質が結合する転写因子GCF遺伝子の各組織における発現について、2. D40遺伝子が卵巣やセミノーマで発現していない理由、3. D40遺伝子を用いた癌治療への応用、について質問があった。発表者はこれらいずれの質問に対しても適切な回答をおこなった。また主査葛巻が、1. D40遺伝子の発現頻度が口腔癌で高い理由、2. D40遺伝子と他の癌・精巣関連

遺伝子間の相同性について、質問をおこなった。申請者はこれらの質問に対して適切に回答した。

この論文は、新しい癌関連遺伝子を発見したことで高く評価される。今後、この研究をさらに進めることによって、腫瘍と精巣における特異的遺伝子発現のメカニズムが明らかにされることと共に、D40 癌・精巣関連遺伝子の癌の診断と治療への応用の可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程にお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十分な資格を有するものと判定した。