

摘要：

在大腸直腸癌的致癌過程中之起始步驟是 APC 基因的突變。因而造成 APC/ β -catenin/Tcf 致癌路徑的活化。先前本院關於肝癌的研究指出肝癌致癌過程 β -catenin 突變似乎與 APC 的突變互不相容。為了進一步探討此一概念，我們實際分析 464 例大腸直腸癌腫瘤之 β -catenin exon 3 的突變狀況。結果發現 β -catenin 的突變列十分罕見，約只占 2.6%(n=12) 而已。當具 β -catenin 突變的腫瘤與 48 例未具 β -catenin 突變的腫瘤相比較，我們發現 β -catenin 的突變與 APC 基因突變是相互獨立的事件，而且具 β -catenin 基因突變的腫瘤，很明顯地其細胞核中會堆積 β -catenin 蛋白。當以多變數方法分析病患的存活狀況時，我們發現 β -catenin 基因突變，細胞核中 β -catenin 蛋白堆積，以及 APC 基因突變三者並不具預後意義。而值得注意的是以前的文獻以為 β -catenin 之 exon 3 的突變大多位於 codon 29 至 codon 51 之間。然而在本實驗中我們發現二個新的突變位置，即 codon 60 (TCC→GCC, Ser→Ala) 和 codon 59 (ACC→GCC, Thre→Ala) 位置的突變，由於這二個突變位置是屬於 GSK-3 phosphorylation sites，故我們以為此二位置的突變深具意義，目前正整發表中。

Abstract:

Mutation of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene initiates the majority of colorectal cancers. One consequence of this inactivation is constitutive activation of β -catenin / Tcf - mediated transcription. To further explore the role of the APC / β -catenin / Tcf pathway in colorectal tumorigenesis, we searched for mutations in genes implicated in this pathway. Previous study on hepatocellular carcinoma in our institution indicated that β -catenin mutation and APC gene mutation might be mutual exclusiveness with each other. However, In our direct sequencing of the exon 3 of β -catenin gene, we found that primary β -catenin mutation was rare (2.6%, 12/464). Moreover, β -catenin mutation and APC gene mutation seem to be independent with each other. Tumor with β -catenin mutation tended to have nuclear accumulation of β -catenin protein. Further multivariate analysis indicated that APC mutation, β -catenin mutation and nuclear β -catenin expression were without prognostic significance. Remarkably, previous studies indicated that the mutational sites of exon 3 of β -catenin gene were located between codon 29 and codon 51. However, in this study, we found two novel mutational sites : codon 60 (TCC→GCC, Ser→Ala) and codon 59 (ACC→GCC, Thr→Ala). Since the mutation of these 2 novel mutational sites will result in the inactivation of GSK-3 β phosphorylation sites, we therefore considered the data to be valid. We will have these data published in the near future.

緣由及目的：

我們先前的概念是在大腸直腸癌致癌過程，APC 基因是充當守門基因，一旦 APC 基因發生突變，它可透過下列機轉使細胞癌化：(1)細胞結構的改變。免疫螢光染色顯示 APC 蛋白會與細胞質之 microtubule 結合。而一旦 APC 因突變而造成蛋白合成截斷，則便無法與 microtubule 結合，導致細胞結構發生變化；(2)細胞彼此之間的互動發生變化。目前知道 β -catenin 會與 cadherin 的細胞質部分結合。因此，一旦 APC 蛋白在中段發生突變致使 APC 與 β -catenin 之結合能力發生變化時，便導致細胞間黏著能力，或接觸抑制發生異常。而眾所周知，細胞彼此間黏著力的異常乃是癌症的特徵之一。(3)DNA transcription 的調節發生變化。當 APC

蛋白正常時，其會與 β -catenin 形成複合體，此複合體會激活 GSK-3 β 這種 kinase，一旦 APC 蛋白發生突變， β -catenin 便在細胞質乃至核中沈積起來，當 β -catenin 濃度上升時，便會與 Tcf 蛋白結合，而造成下游基因的不正當表現。事實上，APC 基因的突變可以說是大腸直腸癌致癌過程的起始變化，大部分的大腸直腸癌可以找到 APC 基因的突變。然而，近年來，我們從肝癌和肝母細胞癌的研究中發現，這些癌細胞中有些是 APC 基因正常，而突變的地方反而是 β -catenin 基因的 exon 3 (參閱參考資料 1-3)， β -catenin 發生突變的肝癌較為早期，且術後預後較佳。這不禁使我們聯想到偶發性大腸直腸癌是否致癌路徑亦分為二類，一類是 APC 突變者，另一類是 APC 正常，但其下游的 β -catenin 發生突變。另外，我們也對 β -catenin 發生突變這一類大腸癌的臨床病理表徵十分好奇。環顧國內外，相關的研究尚屬起步階段且沒有定論。

在本計畫中，我們擬針對大腸良性息肉或各期的大腸直腸癌，以 PCR 的方法，將其 exon 3 放大出來，然後直接定序。一旦發現 β -catenin 發生突變，我們會進一步以免疫螢光染色的方法，觀察 β -catenin 在細胞中沈積及分佈的狀況，並與 APC 蛋白的表現正常正否做一比較，最後再針對這二類大腸直腸癌的臨床病理表徵做一分析比較。相信此舉不僅促進對大腸直腸癌致癌機轉的進一步了解，也會對臨床治療有所幫助。

結果及討論：

本計劃的研究成果整理於表 1-3 及圖 1-2。由表一可見 β -catenin exon 3 的突變，除了以往報告過的 codon 34, 37, 41 及 45 之外，我們尚發現二個新的突變位置，即 codon 60(n=2)及 codon 59(n=3)，其突變分別造成 Serine \rightarrow Ala (Tcc \rightarrow Gcc)以及 Thr \rightarrow Ala(Acc \rightarrow Gcc) 由於這些突變分別造成 Serine 和 Threonin 之 phosphorylation sites 已發生變化，因此這二個突變位置應該也是 GSK-3 β 的 phosphorylation sites，其突變應該亦足以致癌，何況具 codon 59, codon 60 突變之腫瘤，其臨床病理表徵與具 codon34, 37, 41, 45 突變之腫瘤亦無二致。當就 β -catenin exon 3 未突變的腫瘤中隨機選出 48 個病例與具 β -catenin 的腫瘤比較，由表二我們可見具 β -catenin 突變的腫瘤，其 nuclear β -catenin 突變率明顯較高，(100% vs. 56%, p=0.004)再者 β -catenin 基因突變，似乎與 APC 基因突變，相互獨立。另外，以多變數分析來比較 APC mutation, β -catenin expression 的預後意義時，我們發現此三者均不具預後意義。

計劃成果自評：

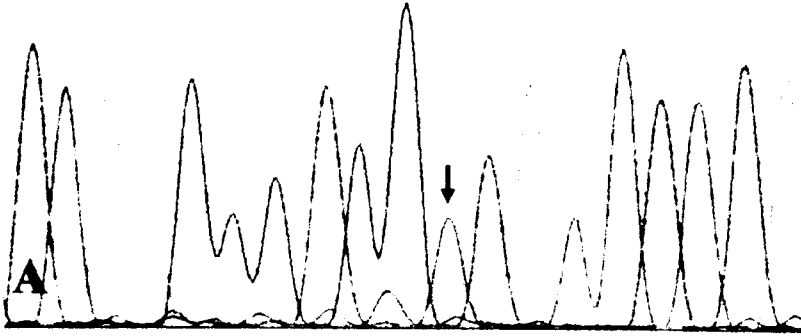
本計劃深入探討 β -catenin 突變在大腸直腸癌的致癌角色，由於本研究發現二個先前所未報告過的突變型態，具原創性，相信可在優秀的雜誌發表。

參考資料：

1. Jeng YM, Wu MZ, Mao TL, Chang MH, Hsu HC, Somatic mutation of β -catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma. *Cancer Letters* 2000;152:45-51.
2. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, et al. β -catenin mutations are associated with a subset of low-stage HCC negative for hepatitis β virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol* 2000, 157:763-770.
3. Mao TL, Chu JS, Jeng YM, Lai PL, Hsu HC. Expression of mutant nuclear β -catenin correlates with non-invasive HCC, absence of portal vein spread, and good prognosis. *J Pathol* 2001;193:95-101.

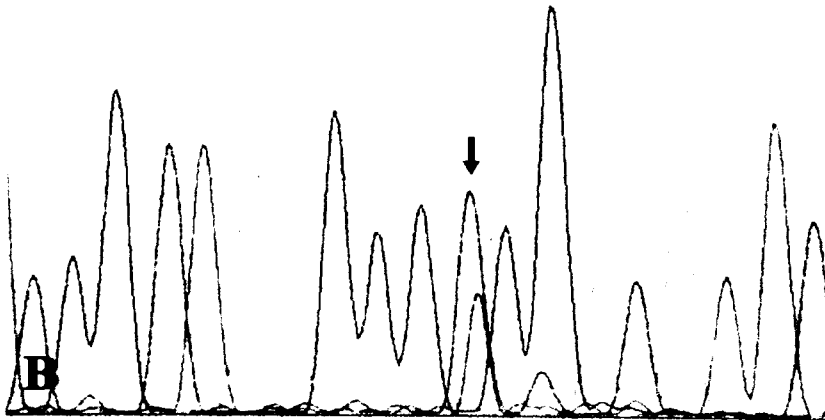
A C T T G G G A G G C A T C C A C A T
 | 61 | 60 | 59 | 58 | 57 |

ACC → GCC
 Thr → Ala

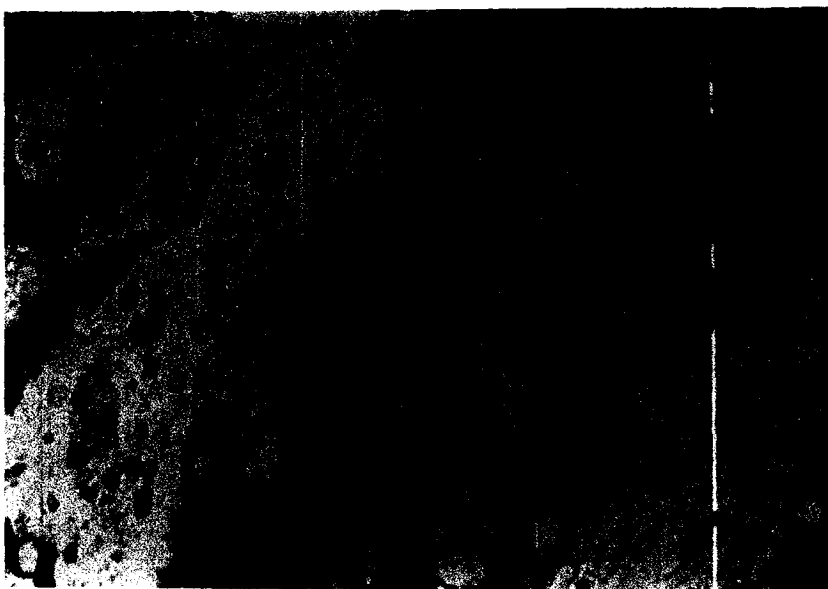
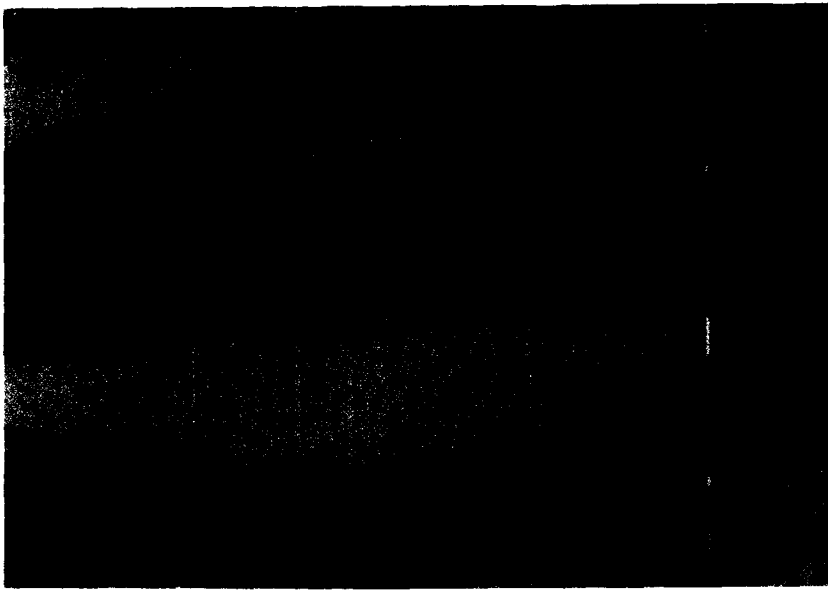
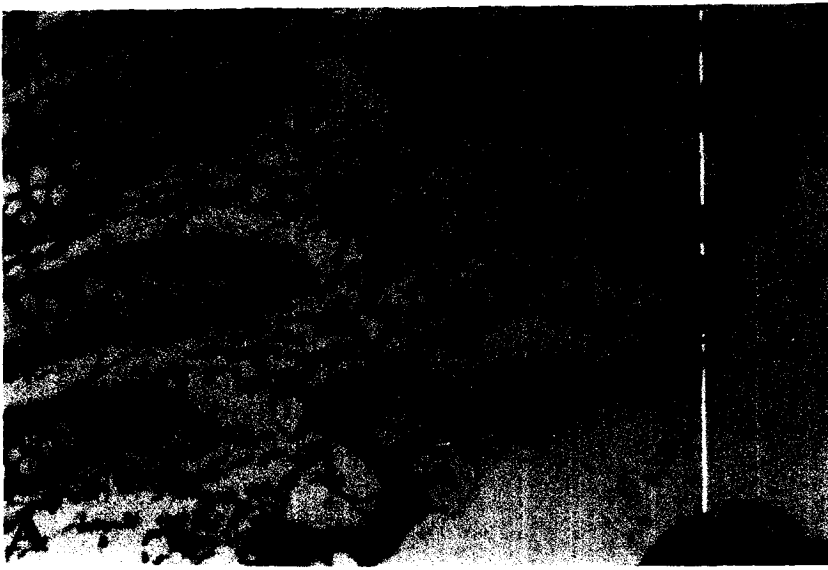


A G G A C T G G G A G G T A T C C A
 | 62 | 61 | 60 | 59 | 58 |

TCC → GCC
 Thr → Ala



圖一：codon 59 和 codon 60 的突變分析。



圖二：(A)正常組織中 β -catenin 的分佈接近細胞膜。
(B)腫瘤組織中，細胞膜及細胞質中 β -catenin 聚積。
(C)腫瘤組織中，細胞核可見 β -catenin 蛋白表現。

TABLE 1. Demographics and histopathologic features of colorectal tumors with mutation of β -catenin gene

	<u>Mutational Pattern</u>	<u>Nuclear β-Catenin</u>	<u>APC status</u>	<u>Age /gender</u>	<u>Tumor location</u>	<u>Size</u>	<u>Gross type /Tumor histology /Differentiation</u>	<u>Stage</u>
1.	Codon 60 TCC (Ser) ↓ GCC (Ala)	+	WT	54/F	descending	35mm	U/adenocarcinoma /moderate	T ₃ N ₀ M ₀ (II)
2.	Codon 60 TCC (Ser) ↓ GCC (Ala)	+	MT	75/M	sigmoid	40mm	P/adenocarcinoma /moderate	T ₃ N ₁ M ₀ (III)
3.	Codon 59 ACC (Thr) ↓ GCC (Ala)	+	WT	68/M	rectum	45mm	P/adenocarcinoma /moderate	T ₃ N ₂ M ₁ (IV)
4.	Codon 59 ACC (Thr) ↓ GCC (Ala)	+	MT	61/F	sigmoid	4mm	P/adenomatous polyp/well	benign
5.	Codon 59 ACC (Thr) ↓ GCC (Ala)	+	MT	65/M	transverse	52mm	U/adenocarcinoma /moderate	T ₃ N ₀ M ₀ (II)
6.	Codon 45 TCT (Ser) ↓ TTT (Phe)	+	WT	67/M	sigmoid	42mm	U/adenocarcinoma /moderate	T ₃ N ₁ M ₁ (IV)
7.	Codon 45 TCT (Ser) ↓ TTT (Phe)	+	MT	64/F	rectum	12mm	P/adenomatous polyp with dysplasia/well	TisN ₀ M ₀ (0)
8.	Codon 41 ACC (Thr) ↓ ATC (Ile)	+	MT	60/F	sigmoid	48mm	U/adenocarcinoma /moderate	T ₃ N ₀ M ₀ (II)
9.	Codon 41 ACC (Thr) ↓ ATC (Ile)	+	WT	72/M	ascending	25mm	U/adenocarcinoma /moderate	T ₁ N ₂ M ₀ (I)
10.	Codon 37 TCT (Ser) ↓ TTT (Phe)	+	MT	57/M	sigmoid	40mm	P/adenocarcinoma /well	T ₃ N ₀ M ₀ (II)
11.	Codon 37 TCT (Ser) ↓ TTT (Phe)	+	MT	68/F	rectum	62mm	U/adenocarcinoma /moderate	T ₃ N ₁ M ₀ (III)
12.	Codon 34 GGA (Gly) ↓ GTA (Val)	+	MT	62/M	sigmoid	52mm	U/adenocarcinoma /moderate	T ₃ N ₁ M ₀ (III)

Abbreviation: Wt:wild type; Mt:mutated; APC:adenomatous polyposis coli gene; F :female; M:male, U:ulcerative growth; P:polypoid growth.

TABLE 2. Comparisons of APC mutation and clinicopathologic features between colorectal tumors with or without β -catenin mutation

	<u>Mutated β-catenin (n=12)</u>	<u>Wild-typeβ-catenin (n=48)</u>	<u>P-Value</u>
Age (mean \pm S.D.)	64.4 \pm 6.1	62.7 \pm 8.5	0.517
Gender			
Male	7	26	0.795
Female	5	22	
Tumor location			
Right colon	2	8	0.949
Left colon	7	30	
Rectum	3	10	
Tumor stage			
Adenomatous polyp	1	2	0.964
0	1	2	
I	1	3	
II	4	20	
III	3	14	
IV	2	7	
Growth type			
Polypoid	5	23	0.698
ulcerative	7	25	
Tumor differentiation			
Well	3	7	0.620
Moderate	9	40	
Poor	0	1	
Tumor size			
< 3cm	2	4	0.686
3-5cm	7	30	
> 5cm	3	14	
APC mutation			
+	8	37	0.456
-	4	11	
Nuclear β -catenin expression			
+	12	27	0.004
-	0	21	

Abbreviation: S.D.: standard deviation, APC: adenomatous polyposis coli gene,

Table 3. Cox multivariate proportional regression analysis of the effects of β -catenin mutation, nuclear β -catenin expression, and APC mutation on Kaplan-Meier predicted 5- year survival in colorectal tumor

	<u>No.of patients</u>	<u>P-value</u>	<u>Hazard ratio</u>
β-catenin mutation			
+	12	0.236	2.172 (0.602 – 7.839) referent
–	48		
Nuclearβ-catenin expression			
+	39	0.187	0.470 (0.153 – 1.444) referent
–	21		
APC mutation			
+	45	0.552	1.409 (0.455 – 4.368) referent
–	15		

Values in parentheses are 95 per cent confidence intervals.
APC: adenomatous polyposis coli gene.