

学 位 論 文 題 名

造血器腫瘍における p 53 遺伝子及び

N-ras 遺伝子の微細構造異常に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 目 的

ヒト癌は多段階過程を経て発症・進展するが、その主体には癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化が関係すると考えられている。造血器腫瘍も他の固形癌と同様に造血細胞における癌遺伝子や癌抑制遺伝子の複数の遺伝子変化を経て発症、進展すると考えられている。本研究では造血器腫瘍における p 53 癌抑制遺伝子及び N-ras 癌遺伝子の異常と病態やその進展との関連性を明らかにすることを目的として、polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法と直接塩基配列決定法を用いてそれらの微細構造異常に関して検討した。

II. 症例、材料と方法

1. 症例と材料：p 53 遺伝子に関しては106 例（急性骨髄性白血病（AML）16例、急性リンパ性白血病（ALL）21例、慢性骨髄性白血病（CML）慢性期16例、移行期3例、急性転化期9例、骨髄異形成症候群（MDS）15例、慢性リンパ性白血病（CLL）8例、成人T細胞性白血病（ATL）4例、悪性リンパ腫13例、多発性骨髄腫1例）を対象とした。N-ras 遺伝子に関しては23例（AML 7例、ALL 5例、CML 慢性期3例、急性転化期2例、MDS 5例、CLL 1例）について検討した。各症例について、Ficoll-Conray 比重遠沈法により骨髄血、末梢血またはリンパ節の単核球を回収し、Phenol法により高分子DNAを抽出し解析に供した。

2. p 53 遺伝子の解析：p 53 遺伝子の領域のうち変異の hot spot であるエクソン5～8についてPCR-SSCP法で解析した。各々のエクソンをはさむプライマーを作製し、それを用いて各エクソンをPCRによって増幅した。そのPCR生成物をホルムアミド溶液で50倍に希釈し、加熱して1本鎖DNAに解離させた後、10%グリセロールを含む、あるいは含まない5%非変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行った。泳動の終了したゲルを濾紙上で乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

次に、SSCP法で異常な移動度を示し、変異の存在が示唆された症例について直接塩基配列決定法による同定を行なった。目的とするDNA断片をPCRで増幅し、

そのPCR生成物をアガロースゲルで精製した後、その一部を鋳型として非対称PCRを行ない、1本鎖DNAを多量に生成した。一部の症例ではゲノムDNAを鋳型として、直接、非対称PCRを行なった。さらに、一部の症例ではSSCPで異常な移動度を示したバンドの部分を、直接、ゲルから切り出してDNAを抽出し、非対称PCRを行なった。そしてそのPCR生成物を精製した後、Sequenase kit version 2.0を用いてその使用法に従い、dideoxy chain termination法で塩基配列を決定した。電気泳動は尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲル中で行ない、泳動の終了したゲルを濾紙上で乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

3. N-ras 遺伝子の解析：N-ras 遺伝子の領域のうち点突然変異の集中している部位であるコドン12,13（エクソン1）を含む領域及び61（エクソン2）を含む領域を設定して、PCR-SSCP法で解析した。各々の領域をはさむプライマーを作製し、それを用いて各領域をPCRを行って増幅した後、その生成物を検体とした。

次に、SSCP法で異常な移動度を示し、変異の存在が示唆された症例については直接塩基配列決定法による同定を行なった。いずれも実際の方法はp53遺伝子の解析のところで記載したものと同様の方法で行った。

Ⅲ. 結 果

1. p53遺伝子の解析：PCR-SSCP法で106例中9例(8.5%)に微細構造異常が検出された。その内訳はエクソン5ではAML及び悪性リンパ腫各1例、エクソン6ではAML及びCML慢性期各1例、エクソン7ではAML1例、エクソン8ではCML移行期、急性転化期各1例、ALL、CLL各1例であった。これら9例のうち7例を直接塩基配列決定法によって同定したが、1塩基置換によるミスセンス変異が3例、欠失、挿入によるフレームシフト変異が3例、サイレント変異が1例であった。

2. N-ras 遺伝子の解析：PCR-SSCP法で23例中5例(22%)に微細構造異常が検出された。その内訳はエクソン1ではAML、ALL、CML慢性期、MDS各1例、エクソン2ではALL1例であった。これらの5例のうち3例を直接塩基配列決定法によって同定したが、3例とも1塩基置換によるミスセンス変異であった。

3. p53遺伝子とN-ras 遺伝子の両者について検討した23例中、両遺伝子に変異が認められた症例が2例あった。

Ⅳ. 考 察

p53遺伝子で点突然変異がみられた4例のうち3例は、変異の90%近くが含まれているとされている高度保存領域にあった。他の1例及び短い範囲の欠失、挿入でフレームシフト変異をもたらした4例はいずれもこの領域外にあった。従って、造血器腫瘍におけるp53遺伝子の変異は必ずしも高度保存領域のみに集中しているとは限らないと考えられた。さらに、点突然変異の塩基変化からみると5例の点突然変異のうち

1例がG : C → A : T transition で、他の4例はG : C → T : A 或いはA : T → T : A transversion であった。従って、癌原物質との関連性を予想させるような変異の偏りは認められなかった。

リンパ系腫瘍におけるp 53遺伝子の変異はこれまで一般に稀とされていたが、今回の検討では3例に変異が認められ、他の造血器腫瘍と比較しても頻度は変わらなかった。MDSにおいては今回検討した15症例には変異は認められず、MDSにおけるp 53遺伝子の変異の頻度はかなり低いと考えられた。

今回の検討症例の中にはp 53遺伝子の座位する17番染色体欠損症例が4例あったが、このうち2例でp 53遺伝子の変異が認められたことから、これらの遺伝子変化が連続して発生しやすい可能性が示唆された。

N-ras 遺伝子については、点突然変異が認められた症例の中にMDSより白血病化したAMLの症例が含まれており、N-ras 遺伝子の変異はMDSにおいて、白血病への進展に関与する遺伝子変化の一つである可能性が示唆された。

両遺伝子の変異がともに認められた症例は少なく、今回の検討からは造血器腫瘍では両遺伝子の変異の関連性は低いと推察された。

V. 結 語

1. 造血器腫瘍の一部の症例ではその発症や進展にp 53遺伝子の変異が関与していることが示唆された。
2. 造血器腫瘍においてはp 53遺伝子の変異は必ずしも高度保存領域に集中しておらず、さらに点突然変異の塩基変化に特定の偏りはみられなかった。
3. p 53遺伝子の変異はMDSでは認められず、MDSにおけるp 53遺伝子の変異の頻度はかなり低いと考えられた。
4. 17番染色体欠損症例4例中2例にp 53遺伝子の変異が認められ、これらの遺伝子変化が連続して発生しやすい可能性が示唆された。
5. 造血器腫瘍の一部の症例ではその発症や進展にN-ras 遺伝子の点突然変異が関与していることが示唆された。
6. 造血器腫瘍においてはp 53遺伝子とN-ras 遺伝子の変異が同時に認められる症例は少なく、両遺伝子の変異は互いに独立した変異である可能性の強いことが示唆された。

以上の結果から造血器腫瘍においてp 53癌抑制遺伝子及びN-ras 癌遺伝子の異常と病態やその進展との関連性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 西 信 三

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

造血器腫瘍における p 53 遺伝子及び N-ras 遺伝子の微細構造異常に関する研究

I. 目 的

造血器腫瘍は他の固形癌と同様に造血細胞における癌遺伝子や癌抑制遺伝子の複数の遺伝子変化を経て発症、進展すると考えられている。本研究では造血器腫瘍における p 53 癌抑制遺伝子及び N-ras 癌遺伝子の異常と病態やその進展との関連性を明らかにすることを目的として、polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法と直接塩基配列決定法を用いてそれらの微細構造異常に関して検討した。

II. 症例、材料と方法

1. 症例と材料：p 53 遺伝子に関しては 106 例（急性骨髄性白血病（AML）16 例，急性リンパ性白血病（ALL）21 例，慢性骨髄性白血病（CML）慢性期 16 例，移行期 3 例，急性転化期 9 例，骨髄異形成症候群（MDS）15 例，慢性リンパ性白血病（CLL）8 例，成人 T 細胞性白血病（ATL）4 例，悪性リンパ腫 13 例，多発性骨髄腫 1 例）を対象とした。N-ras 遺伝子に関しては 23 例（AML 7 例，ALL 5 例，CML 慢性期 3 例，急性転化期 2 例，MDS 5 例，CLL 1 例）について検討した。各症例について、Ficoll-Conray 比重遠沈法により骨髄血，末梢血またはリンパ節の単核球を回収し，Phenol 法により高分子 DNA を抽出し解析に供した。
2. p 53 遺伝子の解析：p 53 遺伝子の領域のうち変異の hot spot であるエクソン 5 ～ 8 について PCR-SSCP 法で解析した。各々のエクソンを PCR で増幅し，その生成物をホルムアミド溶液で希釈し，1 本鎖 DNA に解離させた後，非変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行い，ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

次に、SSCP法で異常な移動度を示し、変異の存在が示唆された症例について、直接塩基配列決定法による同定を行った。非対称PCRで多量に生成した1本鎖DNAを鋳型として、Sequenase kitを用い、ジデオキシ法で塩基配列を決定した。電気泳動は変性ポリアクリルアミドゲル中で行い、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィを行った。

3. N-ras 遺伝子の解析：N-ras 遺伝子の領域のうち点突然変異の集中している部位であるコドン12,13（エクソン1）を含む領域及び61（エクソン2）を含む領域をPCRで増幅した後、SSCP法を行った。次に、変異の存在が示唆された症例について直接塩基配列決定法による同定を行なった。

Ⅲ. 結 果

1. p53遺伝子の解析：PCR-SSCP法で106例中9例(8.5%)に微細構造異常が検出された。その内訳はエクソン5ではAML及び悪性リンパ腫各1例、エクソン6ではAML及びCML慢性期各1例、エクソン7ではAML1例、エクソン8ではCML移行期、急性転化期各1例、ALL、CLL各1例であった。これら9例のうち7例の塩基配列を同定したが、ミスセンス変異が3例、フレームシフト変異が3例、サイレント変異が1例であった。

2. N-ras 遺伝子の解析：PCR-SSCP法で23例中5例(22%)に微細構造異常が検出された。その内訳はエクソン1ではAML、ALL、CML慢性期、MDS各1例、エクソン2ではALL1例であった。これらの5例のうち3例の塩基配列を同定したが、3例ともミスセンス変異であった。

3. p53遺伝子とN-ras 遺伝子の両者について検討した23例中、両遺伝子に変異が認められた症例が2例あった。

Ⅳ. 考察ならびに結語

1. 造血器腫瘍の一部の症例ではその発症や進展にp53遺伝子の変異が関与していることが示唆された。

2. p53遺伝子で点突然変異がみられた4例のうち3例は、変異の90%近くが含まれているとされている高度保存領域にあった。他の1例及び短い範囲の欠失、挿入でフレームシフト変異をもたらした4例はいずれもこの領域外にあった。従って、造血器腫瘍におけるp53遺伝子の変異は必ずしも高度保存領域のみに集中しているとは限らないと考えられた。さらに、点突然変異の塩基変化からみると、癌原物質との関連性を予想させるような変異の偏りは認められなかった。

3. p53遺伝子の変異はMDSでは認められず、MDSにおけるp53遺伝子の変異の頻度はかなり低いと考えられた。

4. 今回の検討症例の中にはp53遺伝子の座位する17番染色体欠損症例が4例あったが、このうち2例でp53遺伝子の変異が認められたことから、これらの遺伝子変化

が連続して発生しやすい可能性が示唆された。

5. 造血器腫瘍の一部の症例ではその発症や進展にN-ras 遺伝子の点突然変異が関与していることが示唆された。
6. 造血器腫瘍においては p 53 遺伝子と N-ras 遺伝子の変異が同時に認められる症例は少なく、両遺伝子の変異は互いに独立した変異である可能性の強いことが示唆された。

これらの結果より、造血器腫瘍において p 53 癌抑制遺伝子及び N-ras 癌遺伝子の異常と病態やその進展との関連性が示唆された。

以上により、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。