

学 位 論 文 題 名

Point mutation of K-ras gene codon 12
in biliary tract tumors

（胆道系悪性腫瘍のK-ras遺伝子コドン12における点突然変異）

学位論文内容の要旨

近年、癌遺伝子および癌抑制遺伝子の発見はめざましく、分子レベルでの発癌、増殖、転移のメカニズムが次第に明らかになってきた。なかでも ras 遺伝子は Weinberg らによって分離された最初の癌遺伝子で、多くの人悪性腫瘍において点突然変異による活性化が認められている。この遺伝子は分子量 21,000 の細胞膜局在性の蛋白質をコードし、多くの受容体型チロシンキナーゼの情報伝達経路の共役体として機能していることが最近明らかにされた。さらに、人以外の哺乳類や酵母などの下等動物にも類似の蛋白質が存在し、その機能が真核生物に広く普遍的であることを示唆している。ras 遺伝子は相同性の高い 3 種類の iso-form が同定されており、中でも K-ras 遺伝子は大腸癌、膵癌などの消化器癌で高率に変異が証明された。特に膵癌では驚くべきことに 90% 以上の例で変異が認められ、その大部分が codon 12 に集中していた。一方、胆道系悪性腫瘍においてはこれまで変異の存在について否定的な報告がなされていた。最近、PCR 法と制限酵素消化を組み合わせた高感度な変異検出法が開発され、肝外胆管癌において 100% の変異が報告された。そこで今回、同様の手法を用いて胆嚢癌を含む胆道系悪性腫瘍における K-ras 遺伝子の変異の検出を行った。

（方法）外科的に切除された胆嚢癌 11 例、肝外胆管癌 10 例、乳頭部癌 4 例を対象とし、パラフィン切片より薄切切片の検鏡にて腫瘍の存在を確認後、沸騰法にて DNA を抽出した。MvaI 認識部位を人為的に挿入したプライマーを用いた PCR 法を行い、増幅した K-ras 遺伝子の exon 1 を含む断片を制限酵素で切断した後、再度 nested PCR 法を行い、変異を持つ断片を相対的高率に増幅した。再度生成物を制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動法にて変異バンドを分離、確認した。続いて変異バンドをゲルより切り出し、DNA を回収後、非対称 PCR にて 1 本鎖 DNA を増幅した後 dideoxy 法にて塩基配列を決定した。

（結果）対照とした非癌胆嚢粘膜 9 例（胆癌正常粘膜 3 例、胆石胆嚢炎 3 例、非胆癌正常粘膜 3 例）はいずれも正常バンドのみを認めた。胆嚢癌 11 例中 6

例（55%）、肝外胆管癌10例中10例（100%）、乳頭部癌4例中4例（100%）に変異バンドを認めた。変異バンドの回収による塩基配列解析では GGT(Gly)から GAT(Asp)への変異が最も多く、胆嚢癌6例中5例、肝外胆管癌10例中8例、乳頭部癌4例中4例に認められた。他の変異型は胆嚢癌の1例が GTT(Val)へ、肝外胆管癌は AGT(Ser)と GTT(Val)の一塩基置換が各1例、GAT(Asp)・GTT(Val)への重複置換が2例、GAT(Asp)・GTT(Val)・AGT(Ser)への三重複置換が1例認められた。胆嚢癌のうち1例は腺腫内癌であり、癌と腺腫の部分それぞれ切り出して検討した結果、同一の変異を検出した。

（考察）これまでの胆嚢癌における K-ras 遺伝子変異に関する検討は、Tada らによる9例のみであり、彼等はパラフィン切片より抽出・増幅した DNA から直接塩基配列を決定したが、いずれも異常は認められず、肝外胆管癌においても変異は極めて低率であったとしている。一方、Levi らは PCR 法と制限酵素切断を組み合わせた方法により検体中に存在する少量の変異アレルを特異的に増幅することに成功し、肝外胆管癌において100%の変異を検出した。今回われわれは、同様のアプローチを採用することにより、胆道系悪性腫瘍においても他の消化器系悪性腫瘍と同様に高率に K-ras 遺伝子変異が起きていることを証明した。中でも胆嚢癌の変異は初の報告であり、Levi らによれば0.1%の比率で存在する変異アレルの検出を可能にする高効率なシステムを用いたことが従来と異なる結果となった原因と考えられる。

興味あることには、このような選択的増幅を用いて初めて変異を検出し得た事実、全腫瘍細胞集団中の変異を有する細胞の比率が低いことを示唆している。また今回変異を検出した胆嚢腺腫の他にも、大腸腺腫、潰瘍性大腸炎などのいわゆる前癌状態と考えられている病変でも ras 遺伝子変異が認められている。これらの事実を符合して考えると、ras 遺伝子変異は癌化の初期段階で起きているが、胆道系悪性腫瘍においてはその発育・進展とともにむしろそれを保持した細胞の割合を減じていく可能性も示唆される。それには他の癌遺伝子異常などによる何らかの環境の変化が変異細胞を選択・淘汰し、正常 ras 遺伝子を持った細胞がむしろ優勢に発育する機構が存在するものと推測される。

今回の検討では、G から A への置換が最も多い結果となった。膵癌・大腸癌でも GAT(Asp)変異が最も多かったとする報告が多く見られ、その原因の一つとして化学物質を考慮する必要があると思われる。アルキル化剤の一つであるメチルニトロソウレアは、DNA に作用してメチルグアニンなどのアルキル化プリンを生成する。グアニンは本来シトシンと塩基対をつくるが、メチル化によりチミンとも対合するようになり、DNA 複製を通じて GC 塩基対が AT 塩基対に変化する。実験的に投与されたメチルニトロソウレアにより発生したマウス乳癌細胞でも ras 遺伝子の codon12 が G から A に変異しており、人においても変異惹起物質の発癌への関与が示唆される。その一方で海外の報告として大腸癌で G から T への変異（GTT(Val)）が最も多かったとする報告もみられ、人種・

環境等の差異が変異型に影響する可能性も考えられ、今後の症例の蓄積が待たれる。

以上胆嚢・総胆管・乳頭部という一連の胆道系の悪性腫瘍が、同じ発生原基由来の膵癌と同様の変異を有することが明らかになった。今回我々が用いた方法は少数の変異細胞を検知する目的において、極めて鋭敏で優れた方法であり、まだ変異の証明されていない疾患における適応も期待できるものと考えられる。また全腫瘍細胞中における変異細胞の低比率化の原因の究明は今後の課題と思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

Point mutation of K-ras gene codon 12 in biliary tract tumors

(胆道系悪性腫瘍のK-ras遺伝子コドン12における点突然変異)

近年、癌遺伝子・癌抑制遺伝子研究の進展はめざましく、分子レベルでの発癌、増殖、転移のメカニズムが次第に明らかになってきた。ras 遺伝子は Weinberg らによって分離された最初の癌遺伝子で、多くの人悪性腫瘍において点突然変異による活性化が認められている。中でも K-ras 遺伝子は大腸癌、膵癌などの消化器癌で高率に変異が証明され、特に膵癌では変異率が 90% 以上と高率でその大部分が codon 12 に集中していた。一方、胆道系悪性腫瘍においては、これまで変異の存在は否定的な報告がなされていた。最近、PCR 法と制限酵素消化を組み合わせた高感度な変異検出法が開発され、肝外胆管癌において 100% の変異が報告された。そこで今回、同様の手法を用いて胆嚢癌を含む胆道系悪性腫瘍における K-ras 遺伝子の変異の検出を行った。

(方法) 外科的に切除された胆嚢癌 11 例、肝外胆管癌 10 例、乳頭部癌 4 例を対象とし、パラフィン切片より薄切切片の検鏡にて腫瘍の存在を確認後、沸騰法にて DNA を抽出した。MvaI 認識部位を人為的に挿入したプライマーを用いた PCR 法を行い、増幅した K-ras 遺伝子の exon 1 を含む断片を制限酵素で切断した後、再度 semi-nested PCR 法を行い、変異を持つ断片を相対的高率に増幅した。再度生成物を制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動法にて変異バンドを分離、確認した。続いて変異バンドをゲルより切り出し、DNA を回収後、非対称 PCR にて 1 本鎖 DNA を増幅した後 dideoxy 法にて塩基配列を決定した。

(結果) 対照とした非癌胆嚢粘膜 9 例 (胆癌正常粘膜 3 例、胆石胆嚢炎 3 例、非胆癌正常粘膜 3 例) はいずれも正常バンドのみを認めた。胆嚢癌 11 例中 6 例 (55%)、肝外胆管癌 10 例中 10 例 (100%)、乳頭部癌 4 例中 4 例 (100%) に変異バンドを認めた。変異バンドの回収による塩基配列解析では GGT(Gly) から GAT(Asp) への変異が最も多く、胆嚢癌 6 例中 5 例、肝外胆管癌 10 例中 8 例、乳頭部癌 4 例中 4 例に認められた。他の変異型は胆嚢癌の 1 例が GTT(Val) へ、肝外胆管癌は AGT(Ser) と GTT(Val) の一塩基置換が各 1 例、GAT(Asp)・GTT(Val) への重複置換が 2 例、GAT(Asp)・GTT(Val)・AGT(Ser) への三重複置換が 1 例認められた。胆嚢癌のうち 1 例は腺腫内癌であり、癌と腺腫の部分それぞれ切り出して検討した結果、同一の変異を検出した。

(考察) これまでの胆嚢癌における K-ras 遺伝子変異に関する検討は、Tada らによる 9

例であり、彼等はパラフィン切片より抽出・増幅した DNA から直接塩基配列を決定したが、いずれも異常は認められず、肝外胆管癌においても変異は極めて低率であったとしている。一方、Levi らは PCR 法と制限酵素切断を組み合わせた方法により検体中に存在する少量の変異アレルを特異的に増幅することに成功し、肝外胆管癌において 100% の変異を検出した。本研究では、同様のアプローチを採用することにより、胆道系悪性腫瘍においても他の消化器系悪性腫瘍と同様に高率に K-ras 遺伝子変異が起きていることを証明した。中でも胆嚢癌の変異は初の報告であり、Levi らによれば 0.1% の比率で存在する変異アレルの検出を可能にする高効率なシステムを用いたことが従来と異なる結果となった原因と考えられる。

興味あることには、このような選択的増幅を用いて初めて変異を検出し得た事実は、全腫瘍細胞集団中の変異を有する細胞の比率が低いことを示唆している。また今回変異を検出した胆嚢腺腫の他にも、大腸腺腫、潰瘍性大腸炎などのいわゆる前癌状態と考えられている病変でも ras 遺伝子変異が認められている。これらの事実を符合して考えると、ras 遺伝子変異は癌化の初期段階で起こっているが、胆道系悪性腫瘍においてはその発育・進展とともにむしろそれを保持した細胞の割合を減じていく可能性も示唆される。それには他の癌遺伝子異常など他の因子による発育環境の変化が変異細胞を選択・淘汰し、正常 ras 遺伝子を持った細胞がむしろ優勢に発育する機構の存在なども推測される。

本研究により、胆嚢・総胆管・乳頭部という一連の胆道系の悪性腫瘍が、同じ発生原基由来の膵癌をはじめとする他の消化器系悪性腫瘍と同様の変異を有することが明らかになった。さらにこの方法は少数の変異細胞を検知する目的において、極めて鋭敏で優れた方法であり、まだ変異の証明されていない疾患における適応も期待できるものと考えられる。以上より、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た。