

学 位 論 文 題 名

Yeast functional assay法によるヒト口腔扁平上皮癌における

p53遺伝子変異の検出感度と診断規準

学位論文内容の要旨

背景・目的

癌は、正常細胞の遺伝子に複数の変異が累積することにより発生すると考えられている。とりわけ癌抑制遺伝子p53の変異は口腔扁平上皮癌のみならずヒト腫瘍において最も高頻度にみられる遺伝子変異で、癌の悪性度の一つの指標となる可能性がある。

従来までのp53の変異を調べる方法（SSCP法、DNA塩基配列の直接決定法、免疫組織化学的検査法など）では、1）p53蛋白の機能解析ができず、2）検索サンプル中の少数細胞にある遺伝子変異を検出できない、といった問題点があった。加えてこれら従来の解析法は操作が煩雑で、しかも信頼できる結果を得るためにはかなりの経験を要するなどの問題点がある。これらの方法の持つ欠点を克服するため、p53の機能異常を特異的かつ鋭敏にしかも簡便に検出する方法の開発が試みられてきた。

Iggoらが開発したyeast functional assay法は、p53の転写活性化機能異常を酵母コロニーの色彩の変化で検出する方法であり、従来の欠点を克服できる可能性がある。そこで今回、ヒト口腔扁平上皮癌のp53変異の検出におけるyeast functional assay法の有用性、および臨床応用する上での問題点を検討するために以下の研究を行った。

- 1）p53の変異が既に報告されている口腔扁平上皮癌細胞株を用いてyeast functional assayを行い、本法の口腔扁平上皮癌におけるp53変異解析システムとしての有用性を検討する。
- 2）yeast functional assayの非特異的バックグラウンドおよび検出感度の解析を行う。
- 3）臨床材料を用いてyeast functional assayによるp53変異のスクリーニングと塩基配

列の決定を行い、今後の臨床適用にふまえて本法の利点、意義および問題点を検討する。

材料と方法

1. 細胞株および臨床材料

細胞株：ヒト口腔扁平上皮癌細胞株SAS, HSC-2, HSC-3, Ca9-22, KBおよびKSC-1細胞を使用した。この他に、ヒトp53発現ベクターを組み込んだラット肝癌細胞株WHp53を用いた。

臨床材料：北海道大学歯学部付属病院口腔外科において採取した22例の口腔扁平上皮癌組織を用いた。また、非腫瘍サンプルとして、正常口腔粘膜、肉芽組織、瘢痕組織、および口腔扁平上皮癌組織由来の線維芽細胞を用いた。

2. yeast functional assay

細胞あるいは組織から抽出した全RNAでRT-PCRを行い、p53 cDNAを増幅した。これとp53 cDNAの両端の配列を持つ発現ベクターとを同時に酵母へ導入し、両者間で相同組換えを起こさせた。これにより発現するp53蛋白が酵母染色体上のp53蛋白認識配列に結合して下流のADE2遺伝子の転写を活性化するか否かをコロニーの色（白；野生型p53, 赤；変異型p53）で判定した。

3. 被検p53 cDNAの単離と塩基配列の決定

赤の酵母コロニーからプラスミドをalkaline lysis法により抽出し、Dye Deoxy法により被検p53 cDNAの塩基配列を決定した。

4. yeast functional assay法の検出感度の検定

野生型p53のPCR産物（本研究でp53変異を認めなかったKB細胞由来）および変異型p53のPCR産物（本研究でp53変異が同定されたKSC-1細胞由来）をそれぞれ、100:0, 97:3, 94:6, 90:10, 87:13, 83:17, 62:38, 42:58, 33:67, 0:100の割合で混合したものについてそれ

ぞれ4回ずつyeast functional assayを行い、赤コロニーの平均値を算出した。

結果・考察

1. yeast functional assay によるヒト口腔扁平上皮癌細胞株のp53変異の検出

既にp53の変異が報告されている4系のヒト口腔扁平上皮癌細胞株(SAS, HSC-2, HSC-3およびCa9-22細胞)においては、いずれも100%の赤コロニーを認めた。また、赤コロニーから抽出したプラスミドのDNA塩基配列の決定により既知の報告と同一の変異が見い出された。筆者が樹立したヒト口腔扁平上皮癌細胞株KSC-1細胞においても100%の赤コロニーを認め、塩基配列の決定によりp53 cDNAの遺伝子変異を同定した。これに対して、p53変異が報告されていないKB細胞では赤コロニーは5%であった。

2. yeast functional assay の非特異的バックグラウンドおよび検出感度の解析

KB細胞で認められた5%の赤コロニーが非特異的なバックグラウンドであるか否かを検討した。まず9例の非腫瘍組織（口腔正常組織・肉芽組織・瘢痕組織など）においてyeast functional assayを施行すると、2.9-10%（平均値 $5.2 \pm 2.7\%$ ）の赤コロニーが検出された。ヒト野生型p53発現ベクターを組み込んだラット肝癌細胞WHp53においてヒトp53のyeast functional assayを施行したところ赤コロニーは7.8%であった。これらの結果、非腫瘍組織における赤コロニーの出現頻度（バックグラウンド）は3-10%の範囲であることが示された。

次に、yeast functional assay法の検出感度を検定するために、野生型と変異型p53のPCR産物を種々の割合に混合してyeast functional assayを行った。その結果、サンプル中の変異型p53 PCR産物の割合と赤コロニーの比率は正の相関関係を示した。また、野生型p53のPCR産物のみの場合、 $4.8 \pm 1.8\%$ の赤コロニーが検出されたのに対し、野生型と変異型のp53 PCR産物を94 : 6の割合で混合した場合、 $9.1 \pm 1.3\%$ の赤コロニーが検出され、危険率0.01以下で有意差が認められた。この結果より、機能的な変異のあるp53 mRNAがサンプル中に6%以上あればyeast functional assayで検出可能であることが示された。

3. yeast functional assay によるヒト口腔扁平上皮癌組織のp53変異の検出

22例のヒト口腔扁平上皮癌組織についてyeast functional assay 法を行った。赤コロニーが20%以上認められたのは22例中14例で、複数の赤コロニーの塩基配列決定によりp53の欠失、ナンセンス変異あるいはミスセンス変異がクローナルに同定された。17%の赤コロニーを示した例では赤コロニー6個中2個に同一のp53変異を認めた。しかし、13, 9および8%の赤コロニーを示した組織ではp53 cDNAにクローナルな変異は認められずランダムな変異が検出された。これらの結果から、yeast functional assay 法におけるp53変異のcut-off値は赤コロニーの比率20%とするのが妥当と判断された。

まとめ

以上より、本法は、1) サンプル中に機能的な変異のあるp53 mRNAが6%以上あれば検出可能であり、2) 多くの症例で塩基配列を決定することなしにp53の変異を検出できることから、臨床適用に十分な検出感度ならびに、迅速性と簡便性を兼ね備えていると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 雨 宮 璋

副 査 教 授 福 田 博

副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

Yeast functional assay法によるヒト口腔扁平上皮癌における p 53遺伝子変異の検出感度と診断規準

審査は、審査員全員の出席のもとに、申請者に対し、口頭試問により、提出論文の内容とそれに関連した学科目について行われた。

癌抑制遺伝子p53の変異はヒト腫瘍において最も高頻度にみられる遺伝子変異で、癌の悪性度の指標の一つとなるものと考えられている。p53変異の検査法としてはこれまでも幾つかの方法が開発されているが、いずれも精度や信頼性、簡便性などに問題があった。yeast functional assay法は、酵母の旺盛な遺伝子相同組換え能を利用したもので、染色体上にp53タンパク認識配列を組込んだ酵母株を用いて、p53の転写活性に係わる機能異常を酵母コロニーの色彩の変化で検出する方法であり、従来の検査法に比べて多くの利点を有している。

本研究は、ヒト口腔扁平上皮癌のp53変異の検出における本検査法の有用性ならびに臨床応用に当たっての問題点を明らかにする目的で行われた。

まず、本検査法を用いて、口腔扁平上皮癌細胞株におけるp53の変異の検出を試み、これまでにp53の変異が確認されている細胞株(SAS, HSC-2, HSC-3およびCa9-22細胞)ではいずれも100%が赤コロニーであり、一方p53変異が報告されていないKB細胞では、赤コロニーは5%に過ぎないことを示した。また、赤コロニーから抽出したプラスミドのDNA塩基配列の決定により、既知の報告と同一の変異を確認した。次に、申請者が樹立し、p53変異の有無が確認されていないヒト口腔扁平上皮癌細胞株KSC-1細胞について検査し、100%が赤コロニーであり、塩基配列の決定により予想通りp53 cDNAに遺伝子変異が同定されることを示した。

KB細胞で認められた5%の赤コロニーが、本検査法の特異的なバックグラ

ウンドであるかいなかを検討するため、非腫瘍組織である口腔正常組織、肉芽組織、瘢痕組織、繊維芽細胞と、ヒト野生型p53発現ベクターを組み込んだラット肝癌細胞WHp53とを用いて実験を行い、赤コロニー検出の割合は、前者で2.9-10%（平均値 $5.2 \pm 2.7\%$ ）、後者で7.8%であったことから、非腫瘍組織における赤コロニーの出現頻度、すなわち本検査法の非特異的なバックグラウンドは3-10%の範囲であることを明らかにした。またPCRの手技とDNAポリメラーゼの種類とを検討し、非特異的なバックグラウンドをできるだけ低くするうえで、Pfuポリメラーゼとホットスタートの組み合わせが最も適切であることを明らかにした。

次に、本検査法の検出感度を検定する目的で、野生型p53と変異型p53のPCR産物を種々の割合に混合して実験を行い、サンプル中の変異型p53 PCR産物の割合と赤コロニーの比率とは正の相関を示すことを明らかにした。さらに、野生型p53のPCR産物のみの場合と野生型と変異型のp53 PCR産物を94 : 6の割合で混合した場合とでは、赤コロニーの出現頻度はそれぞれ $4.8 \pm 1.8\%$ 、 $9.1 \pm 1.3\%$ で、危険率0.01以下で有意差があることを示し、サンプル中に機能的な変異のあるp53 mRNAが6%以上あれば、本検査法で検出可能であることを明らかにした。

これらの結果をもとに、ヒト口腔扁平上皮癌組織22例について本検査を行い、赤コロニーが20%以上の14例において、塩基配列の決定により、p53の欠失やミスセンス変異などの変異がクローナルに同定されることを確認した。また、赤コロニーが17%であった腫瘍では赤コロニー6個中2個に同一のp53変異を認めたのに対し、赤コロニーが13, 9および8%であった腫瘍ではいずれもランダムな変異であることを確認し、本検査法におけるp53変異のcut-off値は赤コロニーの比率を20%とするのが妥当で、10-20%の場合は、塩基配列の決定が必要なことを明らかにした。

このように、本研究は、本検査法が多くの症例で塩基配列を決定することなしにp53の変異を検出でき、しかもサンプル中に機能的な変異のあるp53 mRNAが6%以上あれば検出可能で、従来の検査法に比べて検出感度が高く、臨床適用に十分な検出感度と迅速性、簡便性を兼ね備えた検査法であることを示した。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について、主査および副査より質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、ヒト口腔扁平上皮癌のp53変異の検出におけるyeast functional assay法の有用性ならびにその精度と判定規準を明らかにし、臨床応用への道を開いたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。