

博士（医学） 中村由美子

学位論文題名

微小生検標本を用いた大腸腫瘍性病変における

Yeast assay 法による p53 突然変異の検出の検討

学位論文内容の要旨

緒言

p53 癌抑制遺伝子の突然変異はヒトの様々な悪性腫瘍の発生に非常に重要な役割を果たしていることが知られている。特に大腸腫瘍においては多段階発癌説で示されているように癌化の最終段階で重要な役割を果たしていると言われている。しかしながら、近年の内視鏡検査の発達に伴い、微小腺癌、特にその発生の過程において腺腫が関与していないと考えられる *de novo* 型腫瘍の存在が明らかになり、大腸腫瘍における癌化のメカニズムの再検討が必要と考えられてきた。しかし、このような微小な病変を対象にして組織学的な検討と併せて分子生物学的な検討を行うことは、今までの検査法では非常に困難であった。現在 *de novo* 型腫瘍は早期癌に限られており、検体が小さいため、p53、p21、bcl-2、ras などの免疫染色による間接的な検出法を用いた報告はいくつかなされているが、特異的な変異点が明らかな K-ras 遺伝子の他は遺伝子の詳細な検討はあまり行われていない。また p53 においては免疫染色法はすべての p53 蛋白の異常を正しく検出しているわけではないこともすでに明らかである。このため、このような微小癌の発癌メカニズムの解明のためにはより小さな検体から組織学的検討と同時に分子生物学的検討を可能とする技術が必要とされてきている。最近開発された yeast functional assay (以下 yeast assay) は、cDNA の PCR 増幅後にその産物をそのまま酵母に遺伝子導入するだけで約 2 日後には酵母コロニーの色彩で p53 遺伝子の変異が検出できるという簡便さと、p53 遺伝子の Exon 3-9 の幅広い領域の異常の有無を一度に検索可能という適応性とを備えた解析法である。しかしながら、現在までの報告では、術中標本や細胞株による検討が主体であった。本研究では実際に大腸内視鏡検査時に採取された直径 2~3mm の微小検体で病理組織学的および免疫組織化学的検討と同時に yeast assay を用いて p53 の突然変異のスクリーニングを行い、その臨床応用への有用性を検討すると同時に p53 の変異を有するコロニーの比率が癌細胞における p53 の遺伝子異常の状態をどのように反映しているのかを検討した。

材料と方法・結果

- 1) 細胞株での検討：野生型 p53 を発現している細胞株 293 (WT/WT) と p53 の変異が明らかな細胞株 TMK-1 (Met173/-), HSC-39 (Ser245/-) を混合して変異型 p53 の存在を示す赤色コロニーの出現頻度を調べた。その結果、100% 変異株細胞の時にはどちらも赤色コロニーは 99.9% となり、100% 野生型細胞の時はほぼ 3% の赤色コロニーを認めた。後者は既に報告されているこの yeast assay 法のバックグラウンド内であった。そこで変異株細胞の混合率と赤色コロニーを形成する比率との関係をグラフ化した。TMK-1 は直線上の増加を示したが、HSC-39 では左上方に凸の増加曲線を描いた。yeast assay では赤色コロニーの割合が検体で発現している p53 mRNA の変異型の割合を反映していることより、変異型細胞株での mRNA の発現頻度を野生型を基準にして理論曲線を求めて比較検

討した。この理論曲線からすべての細胞が変異株である時に赤色コロニーが100%であると言うことはその細胞内の対立遺伝子の両方に変異があること、赤色コロニーが約50%である時は変異が一方のみであることが示され、塩基配列が特定されるならその遺伝子型まで特定されることが確認された。また、p53対立遺伝子の欠失のあるこれらの細胞株では一つのalleleからTMK-1細胞では約2倍量のmRNAを、HSC-39では約3倍量のmRNAを発現していることがわかった。以上より、野生型細胞と変異型細胞の混合比率が明らかであれば、このyeast assayでは遺伝子型やmRNAの発現状態を検出可能であることが示された。

2) 臨床症例での検討：内視鏡下生検検体を二分して組織学的検討とyeast assayを施行した。さらに術中に術野から直接採取した検体も用いて同様の検討を行った。その結果、内視鏡下生検検体という微小検体でも術野から直接採取した検体と同様にこのyeast assayに十分に適応可能であることが示された。さらに本研究の初期には摘出後約30分以内の手術検体から採取した検体や内視鏡的ポリペクトミーの部分標本からもmRNAの抽出を試みたが、cDNAをPCRで増幅できないものが多く評価の対象になりえなかった。これらはmRNAの半減期が非常に短いため、手術操作中の体温や摘出後に室温で行われる洗浄や標本写真撮影などの処理の影響、また腸内細菌の產生するRNaseによる分解も加わったことも原因と考えられた。このことからも、このyeast assayは手術検体よりもより迅速に凍結保存が可能な内視鏡下生検に適していると考えられた。また、正常組織・腺腫病変では赤色コロニーの比率はバックグラウンドに含まれ、それに対して癌ではいずれも20%以上の割合で赤色コロニーが認められ、変異型p53と判定しさらに塩基配列も特定された。さらに組織学的検討を加えることによって腫瘍細胞の割合を推測し、理論曲線上での分布を検討した。ここで特に一つの癌病変から2つの変異型p53の塩基配列が特定された2病変についてさらに詳細な考察を加え、遺伝子型の特定の実際例について述べた。その結果から、腫瘍細胞の比率が推測される時には細胞株での検討と同様に遺伝子型の特定とmRNAの発現の状態を推測することが可能であることが示唆された。また、免疫組織学的検討はPCR-SSCP等との検討で既に述べられているように、スクリーニングとしては必ずしも有効ではないことが確認された。

考案

今回の検討より、非常に微細な組織標本(30 μg)からも術中標本と同程度の判定が十分可能で、病理学的検索と平行して施行できることより、近年の内視鏡検査の発達と併せて考えると、微小病変におけるp53変異の役割を解析検討するうえで非常に有効であると考えられる。また、質的にも量的にも精度が高いため組織学的検討において腫瘍細胞の比率を予測することにより、塩基配列の検索と併せてp53 mRNAの発現の状態をより正確に予測することが可能な検査法であると考えられた。なお、本法ではプライマーの設定の関係上codon 42以前のN末端やcodon 364以後のC末端の変異では検出ができない。しかしながら、現在までの様々な研究でこれらの部位の変異は頻度が少なく、また転写活性に大きな影響を与えないものと考えられ、実際の癌での報告例も認められておらず、本法の有効性を否定するものではないと考えられた。

結論

以上の研究結果から、このyeast functional assayは今後のp53遺伝子の機能的変異の検出方法として優れていることが確認された。特に内視鏡検査技術の発達に伴う微小病変でのp53の解析と病理組織学的検索との併用によってp53遺伝子の発現状態の検出とその役割の検討に非常に有効な方法であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査 教授 浅香正博
副査 教授 長嶋和郎
副査 教授 守内哲也

学位論文題名

微小生検標本を用いた大腸腫瘍性病変における Yeast assay 法による p53 突然変異の検出の検討

学位申請者 中村由美子の学位論文公開発表は、平成10年1月29日午前10時10分より医学部臨床大講堂において約25名の参加をえて行われた。主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約20分に渡って以下のような内容の発表を行った。

p53癌抑制遺伝子の突然変異はヒトの様々な悪性腫瘍の発生に非常に重要な役割を果たしていることが知られている。また p53蛋白は四量体を形成して塩基配列特異的な転写活性を有することも明らかである。この転写活性を利用して最近開発されたp53 yeast functional assay (以下 yeast assay) は、簡便さと適応性とを備えた解析法であるが、現在までの報告では 手術材料や細胞株による検討が主体であった。以上のこととふまえて、実際に大腸内視鏡検査時に内視鏡下にて採取された直径2~3mmの微小検体で組織病理学的および免疫組織化学的検討と同時にyeast assayを用いてp53の突然変異のスクリーニングを行い、その臨床応用への有用性を検討したのが本研究である。

はじめに 細胞株での検討が示された。野生型p53を発現している細胞株293(WT/WT)とp53の変異が明らかな細胞株TMK-1 (Met173/-) 、HSC-39 (Ser245/-) を混合して変異型p53の存在を示す赤色コロニーの出現頻度が検討された。その結果 野生型p53のみの時 p53変異を示す赤色コロニー数は既に報告されているこのyeast assay法のバックグラウンドに一致していた。そこで変異株細胞の混合率と赤色コロニーを形成する比率との関係をグラフ化した。同時にyeast assayでは赤色コロニーの割合が検体で発現しているp53mRNAの変異型の割合を反映していることより、変異型細胞でのmRNAの発現の状態を野生型を基準にして理論曲線を求めて比較検討を行った。この理論曲線からすべての細胞が変異株である時に赤色コロニーが100%であると言うことはその細胞内の対立遺伝子の両方に変異があること、赤色コロニーが約50%である時は変異が一方のみであることが

示され、塩基配列とその遺伝子型まで特定されることが確認された。また p53対立遺伝子の欠失のあるこれらの細胞株では一つのalleleから、TMK-1細胞では約2倍量のmRNAを、HSC-39では約3倍量のmRNAを発現していることを示した。これは野生型細胞と変異型細胞の混合比率が明らかであれば、このyeast assayでは遺伝子型やmRNAの発現の状態を特定可能であることを示したものである。

次に 臨床症例での検討として、内視鏡下生検検体を二分して組織学的検討とyeast assayを施行した。また手術中に術野から直接採取した検体も用いて同様の検討を行った。今回の検討により非常に微細な組織標本(30 μ g)からも遺伝子異常の判定が十分可能であること、質的にも精度が高いため組織学的検討において腫瘍細胞の比率を予測した上で、細胞系での検討に用いた理論曲線に当てはめることによって塩基配列の所見と併せると p53 mRNAの発現の状態をより正確に予測することが可能な検査法であることが示された。これに加えp53の変異の多様性と腫瘍分化度に関する種々の症例について考察が加えられた。これらの発表に対して守内教授から p53についての基本的な知識の確認や理論曲線におけるmRNAの寿命についての考察、腺腫症例での細胞質でのp53蛋白の過剰発現についてなどの質問があり、さらに長嶋教授から大腸癌におけるyeast assayによるp53変異の検出率、高度異型腺腫におけるp53変異について、内視鏡下にて腺癌と腺腫との移行部の変異について、微小腫瘍の治療後の残存病変に対するyeast assayの応用についてなど、さらに フロアーから単一病変において二つの細胞群からなる病変の解釈について質問が出された。その後守内教授から内視鏡的治療後の経過観察について臨床に関連した質問が 最後に浅香教授からde novo癌への応用や組織診断の根拠としての有用性などについて質問が出された。これらの質問に関して、yeast assayの過去の報告例や大腸癌発生に関する多段階発癌説、最新の文献などを引用し、概ね適切な回答をし さらに今後のこの検査法の応用などについて意見を述べた。

本論文は、Yeast functional assayの内視鏡下生検への応用の可能性を示したのみならず、病理学的検討を加えることによって腫瘍の分化度とp53変異の関係さらにp53 mRNAの発現量との関係などを示している点で貴重な報告と思われた。

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充分な資格を有するものと判定した。