

博士（医 学） 砂 原 正 男

学 位 論 文 題 名

Mutational analysis of the p73 gene localized
at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas

(染色体1p36.3に位置する p73遺伝子の大腸癌における変異解析)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

1. 目的

多くのヒト癌の発生進行において、癌抑制遺伝子p53の変異は重要な意味を持つ。特に、大腸癌におけるp53の変異は高頻度で、約70%ともいわれている。大腸発癌形式には、いくつかの説があるが、p53のほかにAPCやDCCなどの癌抑制遺伝子の変異や欠失が関与するadenoma-carcinoma sequence 説が有力で、多段階発癌説の良きモデルとされている。一方、1番染色体短腕（1p）の欠失が大腸癌で20~84%にみられたとの報告や、1p36の染色体断片の導入により大腸癌由来細胞株の悪性形質が消失したとの報告などから、1p遠位に大腸癌の抑制遺伝子の存在が示唆されている。

さて、1997年に1p36.33に新規遺伝子p73がマッピングされた。この遺伝子は、アミノ酸配列上p53との相同性（特にDNA結合ドメイン）が高いことや、p53の非存在下でもp21の転写活性化能及びアポトーシス誘導能を持つことなどから、構造と機能の両面よりp53の初めてのファミリーメンバーとなる癌抑制遺伝子と認識されている。そこで、本研究ではp73が実際に大腸癌の抑制遺伝子であるかどうかを検証するために、手術検体を用いて、その発現様式、ヘテロ接合性の消失および遺伝子変異の有無について検討した。

2. 方法と結果

症例は北海道大学第一外科、信州大学第二外科および千葉県がんセンターで切除された82例の未治療の大腸腫瘍手術検体で、その内訳は、大腸癌原発巣77例、肝転移巣2例、腹膜播種巣1例および腺腫2例である。Dukes分類に基づく大腸癌の病期は、Dukes Aが11例、Bが28例、Cが39例、不明が2例であった。大腸癌原発巣3例から各々の正常部粘膜も採取しこれら全てからRNAを抽出した。さらに大腸癌75例の原発巣と末梢血白血球からDNAを抽出した。

p73遺伝子のヘテロ接合性消失（loss of heterozygosity: LOH）の検討は、我々が見い出した第9イントロンに存在するCTリピートマイクロサテライトマークターを用いて行った。すなわち、このCTリピート領域を挟むプライマーを設計し、73例の癌部および血液DNAをテンプレートとしてPCR（polymerase chain reaction）を行い、そのPCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて確認した。その結果、informative case 46例中8例（17%）にp73のLOHを認めた。つぎに、82例の大腸癌組織から抽出したRNAを用いてp73遺伝子変異の有無を調べた。p73の翻訳領域を10組のプライマーセットでカバーし、RT-PCR SSCP（reverse transcriptase-PCR singlestrand conformation polymorphism）法を用いて検索したが、いくつかのバンドのシフトをみたものの、DNAシークエンスの結果、3パターンのポリモルフィズム（遺伝的多型）のみで、意味のある遺伝子変異は検出されなかった。

さらに、大腸癌におけるp73遺伝子発現の検討をしたところ、Northern blot 解析では発現を検出できなかったが、RT-PCR法では3例の転移巣と1例の腺腫を含む80例の大腸腫瘍

中76例（95%）で発現を認めた。また、3例から得られた正常大腸粘膜も全てp73を発現していた。同一症例の癌部と正常部での発現を比較するために、各々のcDNAをテンプレートとして用いて半定量的PCRを施行したところ、3例全例において正常粘膜よりも癌部でp73の発現が高かった。一方、p73にはp73aと、そのエクソン13のスプライシングバリエントであるp73bという2つのタイプがあるが、エクソン13をはさむプライマーを用いてRT-PCRをおこなったところ、80例の癌部のうちほとんど全てにおいてp73bよりもp73aが高く発現していた。

p73は神経芽細胞腫において、モノアレリックな発現をしていると報告されているため、大腸癌における発現様式を検討した。p73がLOH解析において陰性であった4症例に対し、発現しているmRNAの型を調べたところ、4例すべてにおいて野生型とポリモルフィズム型のp73が両方とも発現していた。このことは、癌部における正常組織の混在という問題を残してはいるものの、すくなくとも大腸癌においては、p73は両アレルから発現していることが示唆された。ちなみに、p53の変異の状況を調べるために、ここで用いた大腸癌75例からのDNAを用いてp53のDNA結合ドメイン（エクソン5から9）のPCR SSCPをおこなったところ、26例（33%）に異常バンドが出現し、うち15例にDNAシークエンスを行い、13例にアミノ酸の置換を検出した。

3. 考察

1番染色体1p36領域は、神経芽細胞腫、大腸癌など多くのヒト腫瘍で高頻度に欠失していることが報告されており、1つまたは複数の癌抑制遺伝子が存在していると推測されている。新規p53関連遺伝子、p73は1p36.3にマップされ、その蛋白は、サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21の転写を活性化して細胞周期を調節することが明らかにされた。したがって、p73はp53同様、大腸癌の抑制遺伝子である可能性が考えられた。

しかしながら、本研究から、p73は大腸癌において、LOHが17%にみられたものの、82例の大腸腫瘍には遺伝子変異が全くみられず、いわゆるKnudsonの2ヒット理論に当てはまる癌抑制遺伝子ではないことが明らかになった。一方において、p73が大腸正常粘膜よりも癌部で発現が高いことが確認されたが、これはp53と同様のパターンである。p73は、神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子の候補で、しかもインプリントされていると報告されている。また、p73は神経芽細胞腫の細胞株においてモノアレリックな発現形式をとることが証明されている。翻訳領域のポリモルフィズムを利用した解析からは、大腸癌におけるp73は両アレルから発現しており、癌部におけるインプリントの消失は可能性が低い。ただし、大腸癌のp73の過剰発現の意義については今後の検討が必要である。

これまでの研究から、p73とp53は同様の機能を有していることが示唆されている。しかし、p73ジーンターゲティングの結果から（F. McKeon, 私信）、胎生期ではp73が、出生後はp53が主に働いて細胞の分化や死を制御している可能性が示唆されている。このことは、大腸癌でp53が高頻度に変異している一方で、p73が変異していないということをよく説明するかもしれない。

学位論文審査の要旨

主査教授 守内哲也

副査教授 加藤絢之

副査教授 藤堂省

学位論文題名

Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas

(染色体1p36.3に位置するp73遺伝子の大腸癌における変異解析)

大腸発癌には、複数の遺伝子が関与しているが、なかでも、癌抑制遺伝子p53の変異や欠失は特に重要な意味を持っている。さて、最近クローニングされた遺伝子p73は、2つのサブタイプp73 α 、p73 β とともに、アミノ酸配列上、p53との相同意が高く、また、p53同様、p21の転写活性化能やアポトーシス誘導能を持っていることなどからp53の初めてのファミリーメンバーであると認識されている。しかも、この遺伝子は神経芽細胞腫、大腸癌などで欠失を示す染色体1p36.33にマッピングされている。そこで申請者は、新規遺伝子p73の大腸発癌における関与を想定し、82例の手術検体を用いてこれを分子生物学的手法で検討した。症例の内訳は、大腸癌原発巣77例、大腸腺腫2例、肝転移巣2例、および腹膜播種巣1例であり、うち3例の癌症例から各々の正常部粘膜も採取し、これらからRNA、DNAを抽出した。p73のヘテロ接合性の消失(LOH)の検討では、informative case 46例中8例(17.4%)にp73のLOHを認め、p53とは異なり、その頻度が低いことが判明した。RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)法により、p73がほぼ全て(95%)の大腸癌で発現していることが判明した。また、p73の発現が正常大腸粘膜よりも癌部において高いことを半定量PCR法にて確認した。さらに、RT-PCR single strand conformation polymorphism(RT-PCR SSCP)法を用いて、p53とは異なり、p73には変異がないことを確認した。p73はimprinting gene、すなわち2つのアレルのうち片方のみから発現する遺伝子であると報告されているが、p73の翻訳領域におけるポリモルフィズム(遺伝的多型)を利用し、p73が大腸癌においては両方のアレルから発現していることも確かめた。以上より、p73は、大腸発癌において、p53とは異なり、クヌットソンのツーヒット理論に当てはまるタイプの癌抑制遺伝子ではないと考えられた。

審査にあたって、加藤教授からp73のLOHとp53遺伝子変異との関係、大腸発癌抑制においてp73が果たす役割の程度、本研究におけるp53の変異検出率の問題、正常粘膜よりも癌部で発現が高いことの意義などについての質問があった。申請者は、p73のLOH陽性

例のうち半数に p53 の遺伝子変異を認めること、および、これを考慮すると p73 の大腸発癌抑制への貢献度はさらに低下する可能性があること、一般に免疫染色法が SSCP 法よりも高い p53 変異率を示すこと、大腸癌では p53 の SSCP はエクソン 5 から 9 まで変異の約 90%を拾いうるとの報告があること、p73 が癌部において p53 とは別個の系であるいは p53 機能が欠損した細胞ではこれを代償するかたちで p21 転写活性化能やアポトーシス誘導能を発揮している可能性などを回答した。続いて、藤堂教授より、p73 の機能、発現形式が他の報告と相違した理由についての質問があった。申請者は、p73 β が p53 と結合することから、p73 が不活化した p53 の機能を代償する可能性、逆にその相同性から p53 の変異型と同様にドミナントネガティブ効果を及ぼしてしまう可能性、p73 では p53 との相同性が低い C 末端側にも転写活性化能があること、ジーンターゲッティングの結果から p73 は胎生期では p53 よりも優位に機能している可能性があること、乳癌組織でのデータも用いてインプリントされている症例の方が例外的で、その場合も癌化への関与は否定的であることなどを回答した。最後に、守内教授から p73 の PCR 増幅の難易度、癌との関係がない遺伝子で LOH が検出された理由、LOH 陽性のために不充分になった蛋白発現が発癌に関与している可能性、一部の症例で p73 の発現が確認されなかったことに対する解釈、今後の p73 研究の方向性、p73 が神経芽細胞腫の癌抑制遺伝子である可能性についての質問があった。申請者は、p73 の PCR 増幅は容易ではないがこれは発現が低いことに起因している可能性があること、近隣の遺伝子に伴って p73 も一緒に欠失した可能性があること、発現蛋白量についての検討はなされていないこと、35 サイクルの PCR では全症例で発現がみられたこと、p73 は p53 よりも種を越えて保存されていることから進化の点でも研究が盛んであること、手術症例での検討から p73 は神経芽細胞腫においても大腸癌と同様の結果を得ていることを明解に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。