

学 位 論 文 題 名

Rare occurrence of inactivating p53 gene mutations  
in primary non-astrocytic tumors of the central  
nervous system: reappraisal by yeast functional assay.

(中枢神経系非星細胞系腫瘍において機能不活性 p53変異は  
まれである：酵母機能アッセイを用いた再検討)

学位論文内容の要旨

[目的]

非星細胞系腫瘍におけるp53変異の有無を検討するためp53遺伝子の転写活性を調べることの可能な酵母機能アッセイを用いて、81例の中枢神経系原発腫瘍[4 neuronal tumors (3 central neurocytomas and 1 pineocytoma), 10 primitive neuroectodermal tumors, 13 germ cell tumors (6 germinomas, 7 non-germinomatous tumors), 4 craniopharyngiomas, 14 ependymomas, 22 schwannomas, 9 primary malignant lymphomas, 5 skull bone tumors]についてp53変異の有無の検討を行った。本アッセイでは発現されたp53蛋白が正常な転写活性化能を持っている場合、リポーターのp53結合配列下流のADE2遺伝子が酵母内で発現され正常な白色コロニーを呈するが、転写活性化能を失う変異体の場合、ADE2が発現せず中間代謝産物のphosphoribosyl-aminoimidazoleが蓄積し酵母コロニーは赤色を呈し、変異の判定が可能であり、従来の方法に比べ、変異の有無について鋭敏かつ正確な判定が可能である。

[材料および方法]

対象とした症例は、北海道大学附属病院ならびに関連施設で、摘出手術とbiopsyを受けた計81例(上記)の非星細胞腫性腫瘍である。およそ100mgの凍結腫瘍組織からguanidinium/phenol/chloroform法によりRNA抽出を行った。悪性リンパ腫9例を含め、biopsyのため検体が50mg以下の少量のものには、poly A+選択によるmRNA抽出を行った。アッセイは抽出したRNAをp53-特異的プライマー(RT1, 5'-CGGGAGGTAGAC-3')とMMLV逆転写酵素を用いcDNAに変換し、Pfuポリメラーゼとp53特異的プライマーP3, P4を用い、PCR増幅をおこなった良好な増幅を示すPCR産物を線形化p53発現ベクターpSS16とともにleu2, ade2

欠損リポーター酵母株yIG397に導入し、低adenine, leucine無添加選択合成培地で48～72時間培養し判定を行った。アッセイの結果10%以上の赤色コロニーを呈した例では4個以上の赤色コロニーからplasmidを抽出・E. coliにて増幅し、自動シーケンサーにて塩基配列解析を行った。

#### [結果]

今回の81例の検討の結果、10例の中脳神経原発悪性リンパ腫 中3例にのみ、赤色コロニーが20%以上と有意な結果となり、これらを除いたものは全て10%以下の値となった。すなわち悪性リンパ腫3例にのみ変異は陽性であった。

p53変異を認めた3例のSequenceを行った。case number 396では、6クローン中4つにcodon 88-314のclonal frame-shift deletionを認め、506では4クローン全てでcodon 273のArg(CGT)がHis(CAT)に、また553でも4クローン全てがcodon 220のTyr(TAT)がHis(CAT)に変わるtransitional mutationが認められた。

#### [考察]

今回我々はnon-astrocytic brain tumorについてp53変異の有無を、特に機能的な面を評価することのできる方法を用いて行った。これまでの報告は、腫瘍のgenomic DNAの構造的な異常のみを解析、検討したものであることを考えると、今回の報告はこれまでの結果を単に反復しているだけではなく、新たに機能的な面でp53変異を再評価していると言える。

今回の結果は中枢神経系に発生する非星細胞系腫瘍の多くはp53遺伝子変異と無関係に発生するという従来から一部唱えられてきた説を確認するものである。例外として悪性リンパ腫がその一部にp53変異を伴うことが今回の結果で明らかになった。これまで全身性リンパ腫の一部でp53変異は認められていたが、中枢神経系原発悪性リンパ腫での変異の有無については不明な点が多かった。今回の結果は全身性リンパ腫と同じように中枢神経原発悪性リンパ腫でもp53変異が腫瘍発生に関係していることを示唆している。

#### [結語]

一部の中脳神経原発悪性リンパ腫を除いて、腫瘍発生とp53変異の関連はきわめて稀と考えられた。種々の腫瘍で、腫瘍の発生と悪性転化にp53遺伝子の欠失・不活化が関わることは明らかであるが、中枢神経系の腫瘍については組織分類を含めて検討しても、p53遺伝子の異常が共通している因子ではない。今後も脳腫瘍の発生と進展については、各蛋白質同士の相互作用を含めて野生型p53蛋白にどのように関係してくるかを十分検討すべきであると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎

副 査 教 授 岡 部 弘

副 査 教 授 守 内 哲 也

## 学 位 論 文 題 名

Rare occurrence of inactivating p53 gene mutations  
in primary non-astrocytic tumors of the central  
nervous system: reappraisal by yeast functional assay.

(中枢神経系非星細胞系腫瘍において機能不活性 p53変異は  
まれである：酵母機能アッセイを用いた再検討)

腫瘍抑制遺伝子のp53 遺伝子の転写活性化能を直接、正確かつ鋭敏に判定できる酵母機能アッセイを用いて、非星細胞系腫瘍におけるp53遺伝子の変異の有無を再検討した。本アッセイでは、発現されたp53蛋白が正常な転写活性化能を持っている場合、リポーターのp53結合配列下流のADE2遺伝子が酵母内で発現され正常な白色コロニーを呈するが、転写活性化能を失う変異体の場合、ADE2が発現せず中間代謝産物のphosphoribosyl-aminoimidazolが蓄積し酵母コロニーは赤色を呈し、変異の検出が可能となる。従来の多くのp53遺伝子変異を検討している報告では、single-strand conformational polymorphism解析 (SSCP) が主に用いられているが、本アッセイでは一本鎖DNA多形などによる影響を受けないこと、またp53遺伝子増幅に際してPCRエラーの最も少ないPfu polymeraseを用いることなどでSSCPなどに比し変異検出の精度が優れている点やp53蛋白の機能を正しく評価できる点などが特徴づけられる。今回の対象は81例の中枢神経原発の非星細胞系脳腫瘍で、benign neuronal tumor 4例、PNET 10例、ependymoma 14例、germ cell tumor 13例、craniopharyngioma 4例、schwannoma 22例、malignant lymphoma 9例、bone tumor 5例である。

この81例について酵母機能アッセイを行いp53遺伝子変異を調べた結果、これまでp53遺伝子変異の有無について一定の見解が得られていなかったmedulloblastomaをはじめとするPNET, ependymoma, germ cell tumorについては全ての症例でp53遺伝子変異は認められず、脳腫瘍のうちの星細胞腫瘍を除いたほとんどの腫瘍ではp53遺伝子変異は関係していないことが明らかになった。一方、中枢神経系原発性悪性リンパ腫に関しては少ない症例でp53遺伝子変異の存在が示唆されている報告を裏付けるように9例中3例にp53遺伝子変異が認められ、この結果は全身性リンパ腫と同じように中枢神経系原

発性悪性リンパ腫でもp53遺伝子変異が腫瘍発生に関係しているものと考えられた。

公開発表において守内哲也教授より本アッセイでp53遺伝子変異が見つからない事の解釈やNF-2症例と孤発性schwannomaでの差についての質問と、p53遺伝子変異のない症例での他の因子の検討の必要性の指摘を受けた。また阿部弘教授より従来の遺伝子変異検討法と比べた本アッセイの利点の詳細とp53遺伝子変異を示した悪性リンパ腫でのアッセイの赤色コロニーの比率の意義について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、豊富な知識に基づいて明快に回答した。

この論文は、一部の中枢神経系悪性リンパ腫を除いた非星細胞系脳腫瘍にはp53遺伝子変異は関係しないことを明らかにした点で高く評価され、今後の分子生物学的な腫瘍発生メカニズムの解析において役立つものと期待される。

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て申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。