The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Genomic Analysis of Human Hepatocellular Carcinomas Using Restriction Landmark Genomic Scanning
Author(s)	永井, 尚生
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38696
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 82 】

氏　　名	永（なが）　井（い）　尚（ひさ）　生（き）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11004　号
学位授与年月日	平成 5 年 12 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Genomic Analysis of Human Hepatocellular Carcinomas Using Restriction Landmark Genomic Scanning （RLGS 法を用いた原発性肝癌におけるゲノム変化の解析）
論文審査委員	（主査） 教授　松原　謙一 （副査） 教授　吉川　寛　教授　羽倉　明

論文内容の要旨

【目　的】

癌は，正常細胞におけるゲノム DNA の変化，すなわち塩基置換，増幅，欠失や再編成など様々な変化により悪性の形質を獲得した状態といえる。今日までに特定遺伝子領域の検索およびそこに生じた一定の変化について多くの研究がなされている。しかしながら，この様に癌が多様な複合的要因に基づき発生するにもかかわらず，ヒト全ゲノムサイズに対し，既存の DNA（RFLP/VNTR マーカーや既存癌遺伝子，癌抑制遺伝子等）の数は限られており，技術的にもゲノム上で生じた種々の変化を包括的に把握し，その成因を解明していくことは困難である。そこで我々は全く新しいアプローチとして RLGS 法（Restriction Landmark Genomic Scanning）をヒト原発性肝癌に適応し，効率良くゲノム変化の解析を行うことを試みた。

【方法ならびに成績】

組織相互の混入によるシグナルの差の減少を避けるため，癌部，非癌部組織を顕微鏡学的に分離し，それぞれからゲノム DNA を抽出，精製し，RLGS 法により解析した。この方法では，10 μg のゲノム DNA を制限酵素 NotI で切断，末端を［$\alpha-^{32}$P］dCTP 及び［$\alpha-^{32}$P］dGTP を用い放射能ラベルし，更に電気泳動に適切なサイズにするため EcoRV にて切断し，0.8%アガロースゲル中を10V/cmにて17時間泳動する。DNA を含むゲル部分を切り出し，更に HinfI にてゲル中で切断し，直角方向に 8 V/cmで 7 時間泳動し，ゲル上に 2 次元展開する。オートラジオグラム上，ラベルされた DNA 断片はゲル上に分離可能な約2000個のスポットとして抽出され，各々はゲノム上に散在する Landmark として，従来の多型マーカーを用いる分析よりも 2 桁広い領域の変化を検出しうる。今回はヒト原発性肝癌16症例につき癌部，非癌部でのパターンを比較，検討した。その結果，共通して癌部のみで増強する 5 個のスポットを見いだした。その癌部における増強は16例中13例（81%），14例（88%），12例（75%），12例（75%），10例（63%）と非常に高頻度であった。

又，癌部において高頻度に濃度が消失ないし減少した複数個のスポットを検出した。すなわち，2 例以上にわたって共通に減少性変化の認められる60個のスポットに注目し，更に詳細に解析した。60個中，最高頻度のものは16例中

14例（88%）で減少しており，60%以上のものが6個，70%以上のものが4個と非常に高頻度のものを多く見い出した。全体での減少頻度は20%から88%に分布した。

【総　括】

RLGS法を原発性肝癌に適応し，癌部において特異的に増強あるいは減少するゲノムの変化を検出した。この様な癌部において非常に高頻度に共通して変化の認められるスポットはその対応するDNA断片がヒト肝細胞の癌化と深い関連がある可能性が示唆された。すなわち，癌の原因あるいはその結果によると考えられるゲノム上に生じた数多くの変化を非常に効率良く解析することが可能であった。

論文審査の結果の要旨

本研究は，新しいアプローチとしてのRLGS法を用い原発生肝癌におけるゲノム変化を解析することを目的としたものである。この方法では，ヒトゲノム上に存在する数千個の制限酵素NotI部位を指標に，一度に効率良くゲノムのスキャニングを可能にし，又，各断片に末端ラベルするため，取り込まれた放射能活性は断片のコピー数を反映し，diploidとhaploidゲノムの区別が可能であるという非常に鋭敏な感度を有している。このため，相互の混入を防ぐため顕微鏡下に分離した組織からDNAを抽出し全部で16例の原発性肝癌を解析した。その結果，肝癌において非常に高率に増加，減少するゲノム変化を見いだした。すでにこれらの変化の一部の解析をすすめており，これらの結果は，肝発癌のメカニズムを明かにしていく上で，重要な知見を加えるものであり，学位論文として価値のあるものと評価される。