The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma
Author(s)	細井, 岳
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39011
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

【45】

氏　　名	細　井　　岳（ほそい　がく）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　11797　号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Low frequency of the p53 gene mutations in neuroblastoma （神経芽腫における p53遺伝子の変異の検討）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　岡田伸太郎 （副査） 教　授　岡田　　正　　教　授　辻本　賀英

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

さまざまな種類の成人がんにおいて，p53癌抑制遺伝子の変異が高頻度に存在するとの報告が相次ぎ，細胞がん化を解明する一因子として注目を集めているが，小児がんにおける同遺伝子の変異の報告は少ない。神経芽腫は，小児の悪性固形腫瘍として頻度は高く，進展例の予後はいまだに不良である。今回我々は，p53遺伝子が神経芽腫の発症にどのように関わっているかを検討した。

【方法ならびに結果】

大阪大学医学部附属病院小児科および同小児外科にて診断された20例（stage Ⅰ 2例，Ⅱ 2例，Ⅲ 5例，Ⅳ11例）の神経芽腫の凍結腫瘍細胞（切除組織および骨髄細胞）より抽出したＤＮＡを検体として用いた。p53遺伝子のエクソン5～エクソン9の領域を3組のプライマーを使用して増幅した後，ＳＳＣＰ法にて同遺伝子の変異の有無を検討した。ＳＳＣＰ法にて移動度に変化のあった検体では，ＰＣＲ産物を鋳型ＤＮＡとし direct sequencing 法により塩基配列を決定した。また，各検体および健康成人のＤＮＡを制限酵素 EcoRI で消化後，サザン法にて N-myc 遺伝子の増幅を検討した。

ＰＣＲ-ＳＳＣＰ法により stage Ⅱおよび stage Ⅳの各1例に移動度の異なるバンドを認めた。ただし，正常コントロールと同様の移動度を示すバンドも認め，正常な p53遺伝子のアレルの存在も示唆された。stage Ⅳの例では正常骨髄も検討したが，これには異常バンドは認めず，体細胞レベルで遺伝子変異の存在は否定的であった。シークエンスの結果，stage Ⅱの例ではコドン172のＧＴ<u>Ｔ</u>がＧＴ<u>Ｇ</u>（Val→Val）への transversion（silent mutation），stage Ⅳの例ではコドン259の<u>Ｇ</u>ＡＣ→<u>Ｔ</u>ＡＣ（Asp→ Tyr）への transversion（missense mutation）が確認された。N-myc 遺伝子の増幅は stage Ⅲの5例中1例に，stage Ⅳの11例中5例にみられた。p53遺伝子の変異がみられた2例のうち stage Ⅳの例では N-myc 遺伝子の増幅を4～5倍認めた（表1）。

表1

stage	codon	nucleotide change	amino acid change	N-myc copy number
II	172	GTT→GTG	silent	1
IV	259	GAC→TAC	Asp→Tyr	4-5

【総括】

今回検討した神経芽腫20例中2例にp53遺伝子の点突然変異が検出された。この2例では正常なアレルも存在しており，この変異はheterozygoteである可能性が高い。しかし，正常なアレルは腫瘍細胞中に含まれていた正常細胞由来である可能性も考えられる。stage IIの例では検出された変異ではアミノ酸の変化は起こらず腫瘍の発生になんら関与していないと考えられる。一方stage IVの例では検出された変異によりアミノ酸素がアスパラギン酸からチロシンに変化し，予想される変異型p53蛋白の電荷も野性型p53蛋白と異なる。p53遺伝子の変異はhomozygoteでもheterozygoteでも細胞の腫瘍化に働くことが報告されており，今回検出された変異は腫瘍の発生，進展に関与していたと考えられる。さらにこの例ではN-myc遺伝子の増幅やdiploid karyotypeが認められたが，p53遺伝子の変異の頻度が低いためにp53遺伝子の変異とこの疾患のstageやN-myc遺伝子の増幅との相関は不明である。

一般に小児の腫瘍ではp53遺伝子の変異の頻度は低いとされ，比較的高年齢の小児期に多い骨肉腫，横紋筋肉腫などで，成人がん同様に同遺伝子の変異が高頻度にみられると報告されているのみである。また，germlineにheterozygoteなp53遺伝子の変異をもつLi-Fraumeni症候群においても小児期の腫瘍の発生は希である。各種細胞株においても高頻度にp53遺伝子の変異が報告されているが，神経芽腫由来の細胞株での変異の報告はない。これらの事実は今回の我々の実験結果と一致しており，神経芽腫のように小児期のごく初期，あるいは胎生期に細胞が腫瘍化する小児悪性腫瘍では，p53の変異は細胞腫瘍化の主要な因子ではないと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は，小児悪性固形腫瘍として頻度が高く，進展例の予後はいまだに不良である神経芽腫の発症機序を明らかにするために行われた。

神経芽腫20例の腫瘍細胞より抽出したＤＮＡを用いp53遺伝子のエクソン５～９の領域をＰＣＲ-ＳＳＣＰ法にて検索し，２例に変異を認めた。ＳＳＣＰ法にて移動度に変化のあった検体では，direct sequencing法により塩基配列を決定した。神経芽腫ではp53遺伝子の変異の頻度は低く，神経芽腫の発症に同遺伝子の変異は主要な因子ではないと考えられた。

これにより神経芽腫のように小児期のごく初期，あるいは胎児期に細胞が腫瘍化する小児悪性腫瘍は，多くの成人がんと明らかに異なる発症機序を持つことが示唆された。小児がんの発症機序解明への足掛かりとなる本研究は，学位に値すると考えられる。