The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Low grade amplification of MDM2 gene in a subset of human breast cancers without p53 alterations
Author(s)	高見, 康二
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39379
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

【 68 】

氏　　名	高見康二（たかみこうじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11661　号
学位授与年月日	平成7年2月2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	Low grade amplification of MDM2 gene in a subset of human breast cancers without p53 alterations （ヒト乳癌における MDM2遺伝子増幅と p53遺伝子変異に関する研究）
論文審査委員	（主査） 教授 門田 守人 （副査） 教授 高井新一郎　教授 辻本 賀英

論文内容の要旨

（目　的）

腫瘍の発生進展には様々な遺伝子異常が関与していることが明らかとなっているが，p53遺伝子はその不活化が広範なヒト腫瘍の発生に関与していると考えられる癌抑制遺伝子である。乳癌においても p53遺伝子の点突然変異や一方のアレルの消失などの遺伝子変異が高頻度に生じており，p53遺伝子の異常は乳癌の発生進展に不可欠なものと考えられている。しかし p53遺伝子そのものの変異が認められない乳癌も存在しており，p53遺伝子を不活化する別の機構の存在が予想される。ヒト肉腫においては MDM2遺伝子が増幅し，高度に発現した MDM2蛋白が p53蛋白と結合し不活化させることが知られている。乳癌組織において p53遺伝子変異と MDM2遺伝子の増幅の関連を解析し，MDM2の乳癌の発生進展への関与と p53の不活化機構を明らかにすることを目的とした。

（方法ならびに成績）

32例の乳癌患者から外科手術により得られた乳癌組織と転移リンパ節および末梢血リンパ球を入手し高分子 DNAを抽出した。

まず，MDM2の遺伝子増幅をサザン法で解析した。それぞれの組織から得られた5μg の DNAを制限酵素 EcoRIで切断し，アガロースゲル電気泳動後，ナイロンメンブレンにサザントランスファーし，^{32}Pで標識した MDM2 cDNAをプローブとしてハイブリダイズさせ，シグナル強度をデンシトメトリーで測定した。末梢血リンパ球と乳癌組織，転移リンパ節でのシグナル強度を比較することで遺伝子増幅を解析した。コントロールプローブとして pL5.71－3と pEKZ19.3を用いて，DNA量とトランスファーの均一性の補正を行った。2倍以上の遺伝子増幅を示したものについては MDM2遺伝子と同じく12番染色体上にある2種のプローブをそれぞれ同様にハイブリダイズし，染色体の非特異的なポリソミーを否定した。その結果，32例中4例において2－6倍の遺伝子増幅を検出した。しかもそのうちの3例では乳癌組織よりも転移リンパ節に増幅の程度が高くなる傾向を認めた。

次に p53遺伝子変異の検討を行った。p53遺伝子の変異好発部位であるエクソン4から9を4領域に分割し32例の DNAを鋳型とし PCR法にて増幅し RNase プロテクション解析を施行した。RNase プロテクション解析で変異を認

めた PCR 断片をプラスミドベクターにクローニングし Dideoxy 法により ^{35}Sを用いてシークエンス解析を行った。先に MDM2遺伝子増幅を示した4例については，4領域すべてでシークエンス解析を行い p53遺伝子変異の有無を確認した。32例中6例で p53遺伝子の変異を検出し，MDM2遺伝子増幅を示した4例には p53変異は認めなかった。

さらに17番染色体短腕のヘテロ接合性の消失（LOH : loss of heterozygosity）の有無をサザン法にて解析した。5μg の DNA を制限酵素 TaqI または BamHI で切断し，1.0％アガロースゲル電気泳動の後ナイロンメンブレンにトランスファーし，^{32}Pで標識した pYNZ22または pBHP53をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。ヘテロ接合性を示した27例のうち7例で LOH を認めたが、MDM2遺伝子増幅を示した4例ではヘテロ接合性は保たれていた。

（総　括）

乳癌において MDM2遺伝子の増幅している症例が確認され，さらにこれらの症例では明らかな p53遺伝子の異常は認められず，乳癌においても MDM2遺伝子増幅を介した p53の機能消失を生じる経路の存在が示唆された。また MDM2遺伝子増幅とリンパ節転移の関連性も示唆された。これらの知見は今後，p53の作用機序や乳癌の発生進展の機構を解明する上で有用な知見であると考える。

論文審査の結果の要旨

本研究は，乳癌組織において MDM2遺伝子増幅と p53遺伝子変異の関連を解析し，MDM2遺伝子の乳癌の発生進展への関与と p53の不活化機構を明らかにすることを目的としたものである。その結果，一部の乳癌組織では MDM2遺伝子が増幅していることが明らかとなり，さらにこれらの腫瘍では p53遺伝子の異常は認められず，乳癌においても MDM2遺伝子を介した p53の機能消失を生じる経路の存在が示唆された。また MDM2遺伝子増幅を認める乳癌組織では，乳癌組織よりも転移リンパ節で増幅の程度が高くなる傾向を認め，MDM2遺伝子増幅の程度がリンパ節転移と関連していることも示唆された。本研究は，今後，p53抑制遺伝子の作用機序を解明する上で重要な示唆を与えており，乳癌のみならず広く一般の腫瘍の発生進展機構の解明にも大いに寄与するものであり，学位に値するものと考えられる。