The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Alterations of the p53 Gene in Human Primary Cervical Carcinoma with and without Human Papillomavirus Infection.
Author(s)	藤田, 征巳
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39548
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

【 43 】

氏　　名	藤田征巳（ふじたまさみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12103　号
学位授与年月日	平成7年10月4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	Alterations of the *p53* Gene in Human Primary Cervical Carcinoma with and without Human Papillomavirus Infection. （ヒトパピローマウイルス陽性及び陰性の子宮頚癌における *p53* 癌抑制遺伝子の異常の検討）
論文審査委員	（主査） 教授　岡田伸太郎 （副査） 教授　羽倉　明　　教授　野村　大成

論文内容の要旨

【目　的】

子宮頚癌組織において悪性型 Human papillomavirus (HPV) が高頻度に検出され，なかでも悪性型のHPV16型，18型は子宮頚癌の発生に重要な役割を果たしていると考えられている。HPVのゲノム中にはE6, E7の2つの癌遺伝子が存在し，悪性型HPVのE6 蛋白は，SV 40 large T antigenやadenovirus E1Bと同様p53蛋白と結合し複合体を形成することが報告されており，HPVの癌遺伝子産物による癌抑制遺伝子産物の不活化がHPVによる癌化において重要なステップと考えられている。一方，癌抑制遺伝子p53は，その突然変異がヒトのさまざまな癌において普遍的に高頻度に認められ，その機能の突然変異による不活化が，発癌に関与すると考えられている。子宮頚癌由来の細胞株において，HPV陽性のものにはp53の突然変異が認められずHPV陰性のものにのみp53の突然変異が認められることが報告され，子宮頚癌の発癌に，HPVの癌遺伝子蛋白によるp53遺伝子の不活化もしくはp53の突然変異によるp53遺伝子の不活化のいずれかの経路が重要であることが提唱された。本研究ではHPV陽性及び陰性の子宮頚癌組織におけるp53遺伝子の異常を分子生物学的手法を用いて検索し，HPVの感染とp53の突然変異との関連性について検討した。

【方　法】

1. 子宮頚癌組織36例（扁平上皮癌30例，腺癌6例）を対象とし手術摘出標本及び患者白血球よりDNAを抽出し以下の検索に用いた。
2. Southern blot 法により主要な悪性型HPV（16, 18, 31, 33, 52, 56, 58型）の検出を行った。さらに高感度なPCR法を用いてHPV16型及び18型の検出を行った。
3. p53遺伝子のexon 5－8領域の突然変異を，各exonをそれぞれPCR法にて増幅後 Singie Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 法にて検出し，突然変異の疑われた症例についてはさらにdirect sequence 法により変異の種類を同定した。
4. p53遺伝子のヘテロ接合性の消失（LOH）を，p53遺伝子の codon 72の多型性を利用したPCR－Restriction Flagment Length Polymorphism (RFLP) 解析にて検出した。

【成　績】

1. Southern blot法により，HPV DNAは53％（19／36）に検出された。さらに Southern blot法で陰性であった17例中10例にPCR法によりHPV 16 型または18型が追加して検出され，総計でのHPV DNAの検出は81％（29／36）で，その内訳は16型が18例，18型が3例，58型が3例，56型が2例，52型が1例，16型及び18型が2例であった。また Southern blot法及びPCR法のHPV検出感度限界は，それぞれ10細胞中ウイルスゲノムが1コピー及び10^5 細胞中ウイルスゲノムが1コピーであった。
2. p53遺伝子の突然変異は36例中で2例にのみ検出され，その変異は，それぞれ codon 133 のATG→CTG（Met→Leu）及びcodon 248 のCGG→TGG（Arg→Trp）のいずれもmissense point mutation であった。
3. p53のヘテロ接合性の消失（LOH）は患者白血球のDNAにcodon 72のヘテロ接合性を認めた10例中で全例認めなかった。
4. Southern blot法によりHPV陽性であった19例中全例にp53遺伝子の突然変異は検出されなかった。同様にSouthern blot法，PCR法のいずれにおいてもHPV陰性であった7例中全例でもp53遺伝子の突然変異は検出されなかった。p52遺伝子の点突然変異の検出された2例はいずれも，HPVはSouthern blot法では検出感度以下でPCR法でのみ検出可能であった10例中に認められた。

【総　括】

1. 子宮頚癌においては，p53遺伝子の突然変異及びヘテロ接合性の消失は，他のヒト癌に比して希であった。
2. 子宮頚癌由来の細胞株での報告とは異なり，HPV陰性の子宮頚癌症例は必ずしもp53遺伝子の突然変異は伴っておらず，p53遺伝子の突然変異の認められた症例においてもHPVが検出された。これらのことより，子宮頚癌の発癌に，HPVの癌遺伝子蛋白による，またはp53遺伝子のヘテロ接合性の消失および点突然変異によるp53遺伝子の不活化が必須ではなく，他の癌化の過程が存在することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

子宮頚部の癌化にヒトパピローマウイルス（HPV）が，重要な役割を果たすと考えられている。悪性型HPVの癌遺伝子産物であるE6蛋白は，p53蛋白と結合しp53を不活化することが報告されており，p53のp53の不活化がHPVによる癌化において重要なステップと考えられている。一方，癌抑制遺伝子p53は，その突然変異がさまざまなヒト癌で高頻度に認められ，突然変異によるその機能の不活化が，発癌に関与すると考えられている。子宮頚癌由来の細胞株8株を用いた研究では，HPV陽性のものにはp53の突然変異が認められずHPV陰性のものにのみp53の突然変異が認められることが示され，子宮頚癌の発癌に，HPVの癌遺伝子蛋白によるp53の不活化もしくはp53の突然変異によるp53の不活化のいずれかの経路が必須であるというモデルが提唱された。しかしこの報告は in vitro での検出の結果で，in vivo 即ち子宮頚癌組織でのHPVの感染とp53の突然変異との関連について臨床材料を用いた検討は未だなされていなかった。本研究ではHPV陽性及び陰性の子宮頚癌組織におけるp53遺伝子の異常を分子生物学的手法を用いて系統的に検索した初めての報告であり，以下の新しい知見を得た。

1. 子宮頚癌においては，p53遺伝子の突然変異及びヘテロ接合性の消失は，他のヒト癌に比して極めて希であること。
2. 子宮頚癌由来の細胞株での報告とは異なり，HPV陰性の子宮頚癌症例は必ずしもp53遺伝子の突然変異は伴っておらず，p53遺伝子の突然変異の認められた症例においてもHPVが検出されること。

これらの知見より，従来の仮設とは異なり子宮頚癌の発癌に，HPVの癌遺伝子蛋白による，またはp53遺伝子のヘテロ接合性の消失および点突然変異によるp53遺伝子の不活化が必須ではないことが示された。

以上，本研究は，子宮頚癌組織におけるHPVの感染とp53の突然変異との関連について初めて明らかにした点において学位に値すると考えられる。