



Title	Analysis of Clonality, Genetic and Epi-genetic Alteration in Precancerous Lesion of Hepatocellular Carcinoma
Author(s)	相原, 智彦
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41710
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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

氏名	相原智彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14520号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Analysis of Clonality, Genetic and Epi-genetic Alteration in Precancerous Lesion of Hepatocellular Carcinoma (肝細胞癌の前癌病変のクロナリティおよび遺伝子変異の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 門田 守人 (副査) 教授 野口眞三郎 教授 青笹 克之

論文内容の要旨

【目的】

肝細胞癌は肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎・肝硬変からその大部分が発生する。進行肝細胞癌でc-mycの遺伝子増幅やP53遺伝子の変異などが報告されているが、発癌早期の機構はほとんど解明されていない。そのため、本研究は前癌病変の性格を明らかにすることにより、発癌早期の機構の一端を解明することを目的とした。具体的には、前癌病変である dysplastic nodule のクロナリティ、遺伝子変異の有無および成長因子 insulin-like growth factor II (IGF II) 遺伝子の発現とインプリンティングについて検討を行った。

【方法ならびに成績】

1. クロナリティ解析

クロナリティ解析にはX染色体上の phosphoglycerokinase 遺伝子の制限酵素多型と女性のX染色体のメチル化によるランダムな不活化に基づいた方法を用いた。この方法は、女性でかつ Bst VI の多型がある症例でのみ適応できる。まず、手術で得た組織から抽出したゲノム DNA を制限酵素 Hpa II で消化する。Hpa II はメチル化により不活化されたアリルを消化しないので、これにより活性化型と不活性化型のアリルの鑑別を行う。次に Hpa II と Bst VI の制限酵素切断部位をはさむように設定されたプライマーを用いて PCR 法で増幅した後に多型である Bst VI で消化し、電気泳動により結果を判定する。正常肝組織はポリクローナルなメチレーションのパターンを示したが、dysplastic nodule 5 結節と対照とした肝細胞癌 7 結節の全てがモノクローナルなメチレーションのパターンを示した。これにより、dysplastic nodule は肝細胞のモノクローナルな増殖より生じることが明らかになった。

2. DNA フィンガープリント法による遺伝子変異の検討

次に dysplastic nodule が遺伝子変異を伴った病変であるかどうかを、サザン法による DNA フィンガープリント法およびヘテロ接合性の消失 (LOH) により検討した。DNA フィンガープリント法は以下のように施行した。まず、腫瘍部組織およびコントロールとして非腫瘍部組織もしくは末梢血より抽出したゲノム DNA を制限酵素 Hinf I で消化し、アガロースゲルで電気泳動を行った後、メンブレンに転写した。ハイブリダイゼーションは、ゲノム上に散在するミニサテライトを同時に検出する 33.6 と 33.15 の 2 種類のマルチローカスプローブを用いた。フィンガープリントパターンを腫瘍部とコントロール間で比較し、腫瘍部でのバンドのインテンシティーの増加あるいは

減少により遺伝子変異を判定した。さらに、1 P, 5 Q, 7 P, 7 Q, 12 Qの各染色体上の5種類のシングルローカスプローブでリハイブリダイゼーションを行い、LOHを判定した。結果は、検討した dysplastic nodule 10結節中6結節に少なくとも一つのバンドでフィンガープリントパターンの異常を認めた。また、1結節に7 Pの欠失を認め、10結節中7結節が遺伝子変異を伴うと判定された。対照とした肝細胞癌では、フィンガープリントの異常を9結節中6結節に認め、うち2結節で1 Pと12 Qに欠失を認めた。フィンガープリントの異常を認める頻度が dysplastic nodule と肝細胞癌で近似しているため、dysplastic nodule は何らかの遺伝子変異を伴った病変であると結論した。

3. IGF II 遺伝子の発現アレルの検討

さらに、dysplastic nodule でおこっている遺伝子異常を調べるために、発現異常が肝細胞癌で報告されている IGF II 遺伝子の発現を検討した。IGF II 遺伝子は、胎児肝ではインプリンティングにより父方のアレルのみ発現するが、出産後の肝臓では両アレルとも発現することが知られている。dysplastic nodule (n = 7), 高分化癌 (n = 9), 中分化癌 (n = 10) の分化度の異なる肝腫瘍を対象とした。まず、この遺伝子が存在する11 P15で肝細胞癌にLOHの集積が報告されているため、エクソン9の制限酵素 Apa I の多型を利用してゲノムDNAをテンプレートとしたPCR-RFLP法によりLOHを検討したところ、中分化癌の1例にLOHを認めたのみで、この遺伝子はLOHの標的ではなかった。この1例は以下の検討から除いた。発現アレルの検討をエクソン9の多型を利用してRT-PCR-RFLP法により行ったところ、dysplastic nodule では7例中3例、高分化癌では9例中7例、中分化癌では9例中8例にインプリンティングによると思われる発現アレルの不均衡を認めたため、この変化が発癌の早期におこり、癌の進展とともにその頻度を増すことが明らかになった。正常肝をコントロールとして、IGF II 遺伝子の発現レベルを半定量的RT-PCR法により検討したところ、高分化および中分化癌では発現は有意に低下していた。一方、dysplastic nodule では発現アレルの不均衡と相関して、コントロールより3.6倍と有意に増加していた。

【総括】

肝硬変の再生結節の多くが肝細胞のモノクローナルな増殖からなることをすでに明らかにしてきたが、dysplastic nodule はモノクローナルな腫瘍性の病変であり、すでに何らかの遺伝子異常をきたしているという今回の知見とあわせると、再生結節から dysplastic nodule を経て肝細胞癌へ至る肝細胞のモノクローナルな増殖が、肝発癌に重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。また、IGF II 遺伝子の発現アレルの不均衡が発現レベルの上昇と相関して発癌の早期段階で観察された。

論文審査の結果の要旨

肝細胞癌は肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎・肝硬変からその大部分が発生する。進行肝細胞癌ではc-mycの遺伝子増幅やp53遺伝子の変異などが報告されているが、発癌早期の機構はほとんど解明されていない。本研究により、肝細胞癌の前癌病変である dysplastic nodule がモノクローナルな腫瘍性の病変であり、何らかの遺伝子異常をきたしていること、ならびに成長因子である IGF II 遺伝子の発現アレルの不均衡が発現レベルの上昇と相関して発癌の早期段階でみられることが明らかになった。肝細胞癌の組織発生の一端を解明することに寄与した価値あるものと評価され、博士(医学)の学位に値するものと認める。