



Title	小児悪性固形腫瘍におけるサイクリン依存性キナーゼ インヒビター遺伝子の解析：特にp16、p57について
Author(s)	河本，陽介
Citation	大阪大学，1999，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41800
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

氏 名	河 本 陽 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 2 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 5 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 外科系研究科 医学系専攻
学 位 論 文 名	小児悪性固形腫瘍におけるサイクリン依存性キナーゼインヒビター 遺伝子の解析 —特に p16、p57について—
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡 田 正 (副査) 教 授 岡 田 伸 太 郎 教 授 野 村 大 成

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

近年、癌化と細胞周期調節との関わりが注目されている。細胞周期の進行を担う酵素の 1 つにサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase: Cdk) があり、一方そのキナーゼ活性を阻害する蛋白質として Cdk インヒビターが存在し、細胞周期を負に制御している。Cdk インヒビターには大きく分けて p16ファミリーと p21ファミリーの 2 つのファミリーが存在する。p16遺伝子は、Cdk4に特異的に結合することによりその活性を阻害し、細胞周期の進行を阻止する分子量16 kD の蛋白 (P16) をコードしている。種々の成人悪性腫瘍において、p16遺伝子部位の LOH や変異が高頻度に検出され、この p16遺伝子が新たな癌抑制遺伝子と考えられている。一方 p57は p21ファミリーのメンバーであり、これが小児悪性固形腫瘍である肝芽腫、Wilms 腫瘍、横紋筋肉腫において欠失を認める染色体11p15.5に存在することが確認され、癌化に関与する遺伝子として注目されている。そこで私は種々の小児悪性固形腫瘍を対象として p16遺伝子および p57遺伝子の関与の有無を調べる目的で、① p16遺伝子の変異、および② p16、p57遺伝子の発現を解析し、各腫瘍の病期、生命予後など臨床的悪性度と比較検討した。

【対象】

1985年より1996年まで当科および関連施設にて経験した神経芽腫33例、Wilms 腫瘍28例、肝芽腫14例、横紋筋肉腫11例、その他の腫瘍27例の計113例を対象とした。

【方法】

1. PCR-SSCP、直接塩基配列法による p16遺伝子変異の解析：

新鮮凍結標本あるいはホルマリン固定-パラフィン包埋切片より抽出した DNA をテンプレートとし、まず第一に p16遺伝子の exon2 をはさむ primer ① (sense)、② (antisense) を作成し PCR 法にて増幅した。次に exon2 領域において primer ③ (sense)、④ (antisense) を作成し、①と④ (244 bp)、③と② (242 bp) にて exon2 領域を 2 つに分けて PCR-SSCP を行った。

検出された異常バンドはゲルより切りだし、溶解したものを template とし、DyeDeoxy™ Terminator 法にて直接

塩基配列を決定した。

2. 定量的 PCR 法による p16、p57 遺伝子発現の解析：

主な小児悪性固形腫瘍である神経芽腫、肝芽腫、Wilms 腫瘍、横紋筋肉腫を対象とした。新鮮凍結標本より RNA を抽出し、RT および DNase 処理にて得られた cDNA をテンプレートとし、Hatada (1996) らの方法に従い、house keeping gene である s14 をコントロールとし、定量的 PCR 法にて解析し、Southern blotting 法にて検出した。

【結果】

1. p16 遺伝子変異：

DNA を抽出し得た 111 例中 Wilms 腫瘍 1 例、肝芽腫 1 例の計 2 例において、SSCP にて異常バンドを認めた。シーケンスにて変異はいずれもコドン 127 GGG → GGA であったが、code するアミノ酸にて変化がみられなかった。

2. p16 遺伝子発現：

肝芽腫 13 例中 5 例に発現の低下を認め、内 1 例では発現を認めなかった。Wilms 腫瘍 12 例中 7 例に発現の低下を認め、内 4 例では発現を認めなかった。横紋筋肉腫 10 例中 5 例に発現の低下を認め、内 1 例では発現を認めなかった。神経芽腫 14 例では全例で発現を認めた。

3. p57 遺伝子発現：

神経芽腫 15 例中 3 例に発現の低下を認め、うち 1 例では発現を認めなかった。肝芽腫 14 例中 5 例に発現の低下を認め、内 1 例では発現を認めなかった。Wilms 腫瘍 12 例中 5 例に発現の低下を認め、内 2 例では発現を認めなかった。横紋筋肉腫 10 例中 3 例に発現の低下を認めた。

4. p16、p57 遺伝子発現と組織型、あるいは各腫瘍の病期、生命予後など臨床的悪性度との間には有意な相関は認められなかった。

【総括】

小児悪性固形腫瘍を対象として Cdk インヒビター遺伝子である p16 遺伝子の変異、および p16 遺伝子、p57 遺伝子の発現を検討し、以下の点が明らかとなった。

① p16 遺伝子変異の関与は認められなかった。

② p16 あるいは p57 遺伝子の発現低下を一部の神経芽腫、肝芽腫、Wilms 腫瘍、横紋筋肉腫に認め、各腫瘍における臨床的悪性度との間には有意な相関は認められなかったが、その悪性化のメカニズムに複数の Cdk インヒビターが関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

当該論文では、近年注目されている癌化と細胞周期調節との関わりについて、種々の小児悪性固形腫瘍に関して検索を行った。特に、細胞周期を負に制御しているサイクリン依存性キナーゼインヒビターをコードする遺伝子の中で、p16 遺伝子、並びに p57 遺伝子について詳細に検討を行った。p16 遺伝子は、種々の成人悪性腫瘍において、ヘテロ接合性消失や変異が高頻度に検出され、癌抑制遺伝子と考えられており、また p57 遺伝子は、小児悪性固形腫瘍である肝芽腫、Wilms 腫瘍、横紋筋肉腫において、しばしば欠失が報告されている染色体 11p15.5 領域に存在し癌化に関与する遺伝子として考えられている。本研究では、小児悪性固形腫瘍では、成人悪性腫瘍とは異なり p16 遺伝子の変異はほとんど認められないことを明らかにした。また、定量的 PCR 法を用いた遺伝子発現の解析から、種々の小児悪性固形腫瘍において、それらの一部に p16 あるいは p57 の発現低下がみられることを明らかにし、このことが腫瘍発生あるいは増殖に関連しうることを示した。

小児悪性固形腫瘍に関しては、いまだ癌化と細胞周期との関係は不明な部分が多く、この点において当該論文はその一端を明らかにしたものであり、学位の授与に値するものとする。