

氏名	近藤 雅彦
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2764 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Diverse p53 gene aberration in hepatocellular carcinoma detected by dual-color fluorescence <i>in situ</i> hybridization に関する研究 (Dual-color FISH 法を用いた肝癌における p53 遺伝子多様性の解析)
論文調査委員	(主査) 教授 藤田 潤 教授 日合 弘 教授 千葉 勉

論文内容の要旨

原発性肝細胞癌（以下肝癌）の約90%はウイルス感染に起因する慢性肝疾患を基礎病変として発生する。肝癌の発生では多段階での遺伝子異常が蓄積するが、癌抑制遺伝子 p53 は特に重要な役割を果たしていることが報告されている。一方肝癌では一つの結節内に異なるパターンの染色体異数性を示す細胞が混在することが報告されている。p53 は第17染色体上に存在するが、肝癌細胞ではこの第17染色体数の異常と共に p53 遺伝子自体の数的異常を伴っていることが予想される。これまでの肝癌における p53 数異常の検討は、p53 の欠失を表す loss of heterozygosity (LOH) の有無で検討されてきたが、LOH はひとつの「mass」として肝癌結節から抽出した DNA や RNA を用いているため、染色体の異数性に伴う影響や、癌細胞の heterogeneity は全く考慮されていない。

そこで本研究では第17染色体のセントロメアと p53 の2つの領域に対するプローブを同時に用いた dual-color fluorescence *in situ* hybridization (dual-color FISH) を用いることにより、ヒト肝癌細胞における p53 遺伝子の数的異常を検討することを目的とした。

対象は1999年3月から2001年2月の間当院第2外科にて肝切除術を施行された肝癌43症例である。LOH は癌部と非癌部より DNA を抽出し、p53 の4つの領域 (ex4, int7, VNTR, TP53) に対する特異的なプライマーを用いた PCR 法で解析した。dual-color FISH 法は癌部および非癌部の検体を用い、第17染色体の α -satellite 領域および p53 領域に対する特異的なプローブを用いて蛍光染色を行い、少なくとも100個以上の癌細胞を解析し、セントロメアと p53 のシグナル数別に分類した。カウントした細胞の内、p53 のシグナルの数が第17染色体のセントロメアよりも数の少ない細胞、すなわち p53 の欠損した細胞の割合 (%) を FISH score と定義した。

正常肝細胞を用いた p53 に対する dual-color FISH 法の解析から正常肝細胞の FISH score は12.2であった。この正常肝細胞の結果をもとに FISH score が27.2 (12.2+3SD) より大きいものを FISH score 陽性と定義した。肝癌症例での癌部、非癌部で検討したところ、非癌部の FISH 陽性は認めなかったが、癌部では58.8%で陽性となり有意な高値を示した。一方 LOH 陽性は34.8%であり、7例では p53 遺伝子の数的異常は dual-color FISH 法では検出されたが LOH を用いた解析では陰性であった。FISH score は肝癌の分化度が低くなるにつれ有意に増加したが、LOH では分化度との相関は認められなかった。更に肝癌では1つの癌結節内において第17染色体と p53 遺伝子の数的異常の組合せの多様性が存在しており、肝癌細胞の分化度が低くなるにつれてこの多様性が有意に増加する傾向を示した。このように肝癌では多様な染色体数の異常を示す癌細胞が混在するため、従来法による LOH を用いた解析では腫瘍細胞の heterogeneity や染色体異数性の検出・評価を充分行うことが出来ないことが明らかとなった。これに対し、dual-color FISH 法では個々の癌細胞の染色体数異常を検討するため、heterogeneous な癌細胞の集積によって功績された癌組織においても遺伝子の欠失や数的異常を判定することができ、発癌過程の詳細な検討が可能である事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、肝発癌において癌抑制遺伝子 p53 の異常が着目されている。特にそのヘテロ接合性の消失 (LOH) は肝発癌の早期から関与している可能性がある。一方では肝癌は脱分化に伴い染色体に異数性が生じ、一結節内の腫瘍細胞も多様化してくる。しかし従来の LOH の判定方法では結節をひとつの mass として扱うため多様性の影響は無視されてきた。

本研究において申請者は、第17染色体と p53 の遺伝子に対する dual-color fluorescence in situ hybridization 法 (dual-color FISH 法) を用いることで腫瘍細胞を個々に分析可能なことに着目し、heterogeneous な癌細胞の集積によって構成された肝癌組織において、第17染色体と p53 遺伝子の数的異常の組み合わせの多様性が高率に存在していることを見出した。dual-color FISH 法によって検出される p53 遺伝子の欠失した癌細胞の割合は肝癌の分化度が低下するにつれ有意に増加したが、従来の PCR 法を用いた p53 の LOH と肝癌の分化度との間に相関関係は認められなかった。さらに従来の方法では p53 遺伝子の欠失があるにも関わらず LOH を見逃している場合がある事を見出した。

以上の研究は、肝癌における p53 遺伝子異常出現機構の解析に貢献し、肝発癌メカニズムの解明に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年2月23日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。