

氏 名 喜 多 竜 一
 学位(専攻分野) 博士(医学)
 学位記番号 医博第2037号
 学位授与の日付 平成10年5月25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 INFREQUENT ALTERATIONS OF THE *p16^{INK4A}* GENE IN LIVER CANCER
 (肝癌における *p16^{INK4A}* 遺伝子の変異)
 (主査)
 論文調査委員 教授 藤田 潤 教授 湊 長博 教授 中尾 一和

論 文 内 容 の 要 旨

近年、細胞周期制御の分子機構は急速に解明されつつある。ヒト腫瘍において、細胞周期制御を担う分子の異常が報告され、多段階発癌の1ステップとして細胞周期の脱制御が注目されている。肝細胞癌(以下肝癌)においても、G1-S期の細胞周期制御に関わる癌抑制遺伝子Rbの構造異常や、Rb座位のヘテロ接合性の消失(以下LOH)が、肝癌の47%に存在する事、サイクリンD1遺伝子の遺伝子増幅が肝癌の22%に見られる事などが報告されている。一方、サイクリン依存性キナーゼ4(CDK4)やその制御分子p16についても、種々のヒト腫瘍で異常が報告されているが、ヒト肝癌におけるp16及びCDK4遺伝子変異の詳細は不明である。本研究では、ヒト肝癌におけるp16、CDK4遺伝子の異常を解析し、肝発癌における細胞周期脱制御の役割を検討した。

種々のヒト腫瘍におけるp16遺伝子の異常は、高頻度に相同欠失として認められるとの報告がある。そこで、p16遺伝子の相同欠失について検討する為、62例の肝細胞癌と5例の胆管癌、6種の肝癌由来細胞株を用い、ゲノムDNAよりp16遺伝子をPCR法にて増幅したが、p16遺伝子の相同欠失が認められた症例はなかった。さらに、正常細胞の混入による偽陰性を除外する為、サザン法を行なったが、相同欠失に相当するバンドの減弱は認められなかった。

さらに、p16遺伝子の点突然変異を検索する為、p16遺伝子のエクソン1とエクソン2をPCR-SSCP法にて解析し、肝癌62例中の3例、肝癌由来細胞株6例中1例について異常が検出された。これらの症例について、塩基配列の決定を行ない、ヒト肝癌2症例において、コドン94に点突然変異が(GCG→CAG)、1症例でコドン69-70にCTCTC→CTCの2塩基欠失が、細胞株1例でコドン104に点突然変異(CGT→GGT)が認められ、いずれもアミノ酸置換を伴っていた。各症例の非癌部では、これらの変異が認められなかった為、ポリモルフィズムの可能性は否定された。また、p16遺伝子の位置する第9染色体短腕の染色体欠失を評価するため、9p21に存在するIFNA座位のLOHについて検討した。評価し得た28例の肝癌、及び4例の胆管癌のうち肝病症例5例においてLOHが認められた。コドン94に変異が認められた2例は、両症例とも癌部において、IFNA座位にLOHが認められ、癌組織においてp16遺伝子が不活化されている可能性が示唆された。一方、5例の胆管癌においては、p16遺伝子異常は検出されなかった。

p16蛋白におけるアンキリンリピート内の保存されたアミノ酸が、p16蛋白とCDK4蛋白の結合に重要であることが報告されている。コドン94・104は共にアンキリンリピート内に存在し、特にコドン94は、種間でよく保存されたアミノ酸である。すなわち、これらの肝病症例では、p16蛋白の機能が喪失していた可能性が示唆された。

次に、p16蛋白により制御をうける分子であるCDK4の遺伝子増幅、構造異常について検討する為、CDK4遺伝子のcDNAを用い、サザン法を施行した。しかし、46例の肝癌、5例の胆管癌、6例の肝癌由来細胞株において遺伝子異常は検出されなかった。

以上、肝癌28例中5例(18%)にp16遺伝子座位近傍のLOHが認められ、肝癌62例中3例(5%)と肝癌細胞株6例中1例(17%)にp16遺伝子の異常が検出された。頻度は低いが、これら症例においては、p16遺伝子の失活が、肝発癌に直接

関わっている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

ヒトの肝発癌における細胞周期脱制御の役割を検討する目的で、62例の肝癌と5例の胆管癌、6種の肝癌由来細胞株を用い、p16、CDK4遺伝子の異常を解析した。

p16遺伝子の相同欠失の有無について、PCR法及びサザンブロット法にて検討したが、相同欠失が認められた例はなかった。しかし、p16遺伝子の突然変異を検索した結果、肝癌の2例においてコドン94に、肝癌由来細胞株の1種においてコドン104にアミノ酸置換を伴う点突然変異が検出され、他の肝癌の1例ではコドン69-70に2塩基の欠失が認められた。さらにp16遺伝子の存在する第9染色体短腕上でのヘテロ接合性の消失（LOH）を検討した結果、肝癌28例中、コドン94に変異が認められた2例を含む5例においてLOHが認められた。点突然変異が検出されたコドン94・104は、p16蛋白の機能上重要な領域に存在し、またコドン69-70の欠失は蛋白構造を変化させる変異である為、これらの症例では、p16蛋白の機能が喪失していた可能性が示唆された。

一方、肝臓癌、胆管癌、肝癌由来細胞株において、CDK4遺伝子の増幅・構造異常は検出されなかった。

以上の研究はヒト肝癌におけるp16遺伝子異常の意義の解明に貢献し、肝癌の成因と進展機構の解明に寄与するところが多い。

従って、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10年4月6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。