

氏 名	にし じょう こう いち 西 庄 功 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2874 号
学位授与の日付	平 成 17 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 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Mutation analysis of the <i>RECQL4</i> gene in sporadic osteosarcomas (骨肉腫における RECQL4 遺伝子の変異解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 小 杉 眞 司 教 授 清 水 章

論 文 内 容 の 要 旨

骨肉腫は最も頻度の高い悪性骨腫瘍であり、間葉系組織における骨芽細胞系統の細胞を起源とするとされている。骨肉腫細胞は高度の染色体不安定性を示し、がん抑制遺伝子である p53 および Rb 遺伝子の変異を高率に有する。しかしながらこれらの遺伝子変異が認められない骨肉腫も少なからず存在することから、他の遺伝子異常が骨肉腫の発生に寄与している可能性が想定される。RECQL4 遺伝子は、ゲノム安定性の維持に寄与する RecQ ヘリカーゼ遺伝子群に属し、骨肉腫の高率発生を特徴とする遺伝病である Rothmund-Thomson 症候群 (RTS) の原因遺伝子として単離された。特に機能喪失型変異を有する家系では骨肉腫が高率に発生することが報告されており、RECQL4 遺伝子の機能喪失が骨肉腫発生と密接に関連している可能性が伺える。本研究では、RTS に該当しない孤発性の骨肉腫の発生における RECQL4 遺伝子の関与を明らかにするために、その変異解析を行った。

まず骨肉腫細胞株 9 種および骨肉腫手術時切除サンプル 26 例における RECQL4 遺伝子の発現をそれぞれ Northern blot 法および RT-PCR 法により解析した。細胞株および臨床サンプル全例において RECQL4 遺伝子の発現が認められた。

次に骨肉腫手術時切除サンプル 71 例において RECQL4 遺伝子の全 21 エクソンおよび 16 のイントロン領域、計 5,231 塩基について配列解析をおこなった。その結果、2 ヶ所の 1 塩基置換 (G1814A 及び C2474T) と 1 ヶ所の 6 塩基欠失 (4837-42delTGCACC) が検出された。G1814A は 355 番目のアミノ酸をアルギニンからグルタミンへ、C2474T は 441 番目のアミノ酸をプロリンからセリンへのアミノ酸置換を生じるものであり、4837delTGCACC は 855 番目のシステインと 856 番目のスレオニンを含む in frame で欠失させるものであった。G1814A は 3 例 (1 例で homozygous, 2 例で heterozygous), C2474T は 1 例 (heterozygous), そして 4837delTGCACC は 1 例 (heterozygous) で検出され、いずれも患者の白血球 DNA において同一変異が同一遺伝子型で存在していた。次に骨肉腫群と非骨肉腫群の間でこれら 3 種類の変異アレルの存在頻度が異なるかについて、健常人 82 人の白血球より採取した DNA を用いて PCR-RFLP 法及び PCR-SSCP 法により解析した。その結果、1814A が 82 例中 1 例、2474T が 82 例中 4 例で、すべて heterozygous に認められ、骨肉腫群との間でアレル頻度に差は認められなかった。4837delTGCACC に関しては 1 例も検出されなかったため、骨肉腫群 42 例、対照群 38 例を追加解析したところ、骨肉腫群で更に 2 例で検出 (heterozygous) されたのに対し、対照群ではやはり検出されなかった。しかしながらアレル頻度に関して両群間で統計学的に有意な差は認められなかった ($p=0.1442$)。

以上より、今回検出された配偶子性変異のうち、2 種類の変異は遺伝子多型であると考えられ、6 塩基欠失も、対照群では認められなかったものの、その頻度に有意差はなく、明らかな体細胞性変異は検出できなかったことも含めて、RTS に該当しない骨肉腫において RECQL4 遺伝子の変異が腫瘍発生に寄与している可能性は低いと考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

RECQL4 遺伝子は、骨肉腫の高率発生を特徴とする Rothmund-Thomson 症候群 (RTS) の原因遺伝子として同定され、

その機能喪失が本症候群における骨肉腫発生と密接に関連していることが報告されている。本研究では、RTS に該当しない孤発性の骨肉腫の発生における RECQL4 遺伝子の関与を明らかにするために、その変異解析を行った。

RT-PCR 法による解析では細胞株 9 種および手術時切除組織 26 例、金例において RECQL4 遺伝子の発現が認められた。次に手術時切除組織 71 例において RECQL4 遺伝子の全 21 エクソンおよび 16 のイントロン領域について塩基配列解析を行い、2 ヶ所のアミノ酸置換を伴う 1 塩基置換 (G1814A 及び C2474T) と 1 ヶ所の 2 アミノ酸を in frame で欠損させる 6 塩基欠失 (4837-42deITGCACC) を検出した。これらはいずれも患者の白血球 DNA において同一変異が同一遺伝子型で存在していた。しかし 2 種類の 1 塩基置換は対照群においても検出され、遺伝子多型であると考えられた。また 6 塩基欠失は対照群では検出されなかったものの、その頻度に有意差は認めなかった。

以上より RTS に該当しない骨肉腫において RECQL4 遺伝子の変異が腫瘍発生に寄与している可能性は低いと考えられた。

孤発性の骨肉腫と RECQL4 遺伝子との関連について解析した報告は過去になく、本研究は骨肉腫の発生機構を解明する上で意義あるものと考えられる。

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 17 年 3 月 4 日実施の論文内容とそれに関連する試問を受け、合格と認められたものである。