

氏 名	あか お とし や 赤 尾 利 弥
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1713 号
学位授与の日付	平 成 12 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	A High Prevalence of Functional Inactivation by Methylation Modification of p16 ^{INK4A} / CDKN2 / MTS1 Gene in Primary Urothelial Cancers (尿路上皮癌における p16 ^{INK4A} / CDKN2 / MTS1 遺伝子のメチル化による機能不活化に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 丹 羽 太 貫 教 授 小 川 修

論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

尿路上皮癌では癌抑制遺伝子の RB 遺伝子や p53 遺伝子の変異が報告されており、これらは多段階発癌の後期に起こり、癌の進展に関与するとされている。

染色体 9 番の異常は尿路上皮発癌の早期に起こるとされ、特に 9p21-22 領域には高頻度に欠失がみられ、新たな癌抑制遺伝子が存在する可能性がある。細胞周期の調節因子である p16 遺伝子と p15 遺伝子はこの領域に存在し、膀胱癌を含む多くの癌細胞株でホモ接合性欠失が報告され、癌抑制遺伝子として注目されている。また新たな遺伝子不活化機構として p16 遺伝子のプロモーター部位のメチル化が関与していることが明らかにされた。

今回の論文では、尿路上皮癌における p16, p15 遺伝子の構造異常 (genetic alterations) およびメチル化 (epigenetic alterations) を解析し、尿路上皮発癌への関与について考察した。

【方法】

原発性尿路上皮癌 38 例より抽出した DNA を用いて、9p21-22 領域のマイクロサテライトマーカーで LOH を、PCR-SSCP 法および sequence 法で p16, p15 遺伝子の突然変異を、Southern blot 法でホモ接合性欠失を解析した。p16 遺伝子のメチル化は、メチル化感受性酵素 HhaI, HpaII を用いた PCR-based methylation assay で解析した。また、p16 遺伝子の発現を免疫組織染色で解析した。

【結果】

9p21-22 領域の LOH は IFNA 領域で 50% に認めたが、突然変異は p16 遺伝子 exon 2 における塩基置換の 1 例 (2.6%) のみであった。この症例は grade 2 の表在性腫瘍で、IFNA および D9 S171 領域で LOH も認めた。ホモ接合性欠失は、p16 遺伝子で 6 例 (16.2%), p15 遺伝子で 5 例 (13.5%) にみられ、5 例は p16, p15 遺伝子両方のホモ接合性欠失を示した。これらの genetic alterations は悪性度、進達度の病理学的所見と有意な相関を認めなかった。epigenetic alterations として p16 遺伝子のメチル化は、12 例 (37.5%) で認めたが、やはり病理学的所見とは有意な相関を認めなかった。また LOH を示した 11 例中 4 例でメチル化がみられた。

免疫組織染色では 23 例 (60.5%) で p16 遺伝子の発現が消失していた。genetic alterations を認めた症例では全例が、メチル化を認めた症例では 12 例中 9 例で発現が消失していた。また、遺伝子変異を検出しえなかった 7 例でも発現が消失していた。

【考察】

尿路上皮癌における p16 遺伝子の変異は、epigenetic alterations であるメチル化の頻度が最も高く (37.5%), 尿路上皮発癌に重要な役割を果たしていると考えられる。genetic alterations であるホモ接合性欠失の頻度は 16.2%, 突然変異は 2.6% と低いものであった。これらの変異はいずれも病理学的所見と相関を認めず、p16 遺伝子の変異は尿路上皮発癌の早

期に起こると考えられる。免疫組織染色における p16 遺伝子の発現消失の頻度は、検出しえたすべての遺伝子変異を越えるものであった。プロモーター部位のメチル化による転写抑制はメチル化の密度に相関すると考えられるが、今回の実験法では使用したメチル化感受性酵素 Hha I, Hpa II の切断部位のみでメチル化を解析しており、詳細なメチル化の mapping によりメチル化の頻度はさらに高くなると考えられる。

論文審査の結果の要旨

尿路上皮癌における第 9 染色体の異常、特に 9p21-22 領域の欠失は高頻度にみられ、この領域にある細胞周期調節因子、p16 遺伝子（以下 p16）は多くの癌細胞株で変異が報告され、癌抑制遺伝子として注目されている。p16 は従来の癌抑制遺伝子と異なり、プロモーター領域のメチル化という epigenetic な変異が遺伝子の不活化に関与することが示唆されている。本研究では、尿路上皮癌における p16 のメチル化を中心とした変異とその遺伝子発現について解析し、発癌過程での役割について考察した。

膀胱癌細胞株では p16 のメチル化と発現消失に一定の相関を認め、続いて行った原発性尿路上皮癌 38 例における p16 の解析では、塩基置換 1 例（2.6%）、ホモ接合性欠失 6 例（16.2%）、メチル化 12 例（37.5%）の計 19 例（50%）に変異が認められ、メチル化の頻度が最も高い結果となった。これらの変異は癌の悪性度や深達度と相関せず、発癌の早期におこる変異であることを示唆する。免疫組織染色における p16 の発現消失の頻度は 23 例（60.5%）で、検出しえたすべての遺伝子変異を越えるものであった。これは、メチル化による転写抑制はその部位、程度、密度が関与し、詳細なメチル化の mapping の必要性を示唆する。以上、p16 の遺伝子変異、特にプロモーター領域のメチル化は尿路上皮発癌に一定の役割を果たす可能性が示された。

以上の研究は尿路上皮発癌における遺伝子変異の解明に貢献し、今後の尿路上皮癌の診断、治療に寄与するところが多い。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 12 年 4 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。