

Identification and characterization of a novel germ line p53 mutation in familial gastric cancer in the Japanese population

著者	山田 英孝
発行年	2008-03-17
URL	http://hdl.handle.net/10271/86

doi: 10.1093/carcin/bgm175

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 510号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏名	山田英孝		
論文題目	Identification and characterization of a novel germline <i>p53</i> mutation in familial gastric cancer in the Japanese population (日本人家族性胃がんにおける <i>p53</i> 遺伝子の新規生殖細胞系列変異の同定および機能解析)		

博士(医学) 山田英孝

論文題目

Identification and characterization of a novel germline *p53* mutation in familial gastric cancer in the Japanese population

(日本人家族性胃がんにおける*p53*遺伝子の新規生殖細胞系列変異の同定および機能解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

日本において、胃がんは、近年減少傾向であるが、それでもまだ死亡率が高い疾患である。多くの胃がんは孤発性であるが、家族性の胃がんも少なくない。そして、家族性胃がん家系の人は、胃がんの家族歴がない人よりも胃がんのリスクが高くなる。現在まで、様々な研究グループが家族性胃がんの原因としてE-カドヘリン(*CDH1*) 遺伝子の生殖細胞系列変異を報告しているが、その頻度は低く、*CDH1* 遺伝子のほかに別の遺伝子の生殖細胞系列変異が家族性胃がんに関与していると考えられる。

腫瘍抑制タンパク質である*p53*は、DNA損傷のような細胞ストレスに応答して細胞周期の停止やアポトーシスを誘導する。*p53*の機能の失活は、変異によって引き起こされ、がんの発症に重要な役割をす。 *p53* 遺伝子の生殖細胞系列変異はリー・フラウメニ症候群の原因となることが知られており、最近では、ヨーロッパ人と韓国人の家族性胃がんでは *p53* 遺伝子の生殖細胞系列変異が同定されている。そこで、日本人の家族性胃がんにおける *p53* 遺伝子の生殖細胞系列変異を同定するために、家族性胃がん35家系の発端者およびその親族80例について *p53* 遺伝子の生殖細胞系列変異を調べた。さらに、同定した変異の *p53* の機能的影響について検討した。

[材料ならびに方法]

家族性胃がん35家系の発端者およびその親族80例の血液から抽出したDNAを用い、PCR直接塩基配列決定法によって *p53* 遺伝子の翻訳領域の生殖細胞系列変異を調べた。

同定した変異の一つである p.Val31Ile 変異が *p53* の転写活性化能への影響をレポーターアッセイによって検討するために、Ile31型の *p53* 発現ベクターと *p53* 標的遺伝子である *p21*、*Bax*、*MDM2* 遺伝子のプロモータ領域を挿入したレポータープラスミドを作成した。H1299細胞株に *p53* 発現ベクターとレポータープラスミドを同時に形質導入し、24時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、野生型とIle31型とを比較した。

Ile31型の細胞増殖抑制活性を調べるために、*p53* テトラサイクリン調節性発現プラスミド(ネオマイシン耐性)を作成し、H1299細胞株に形質導入後、G418で *p53* テトラサイクリン調節性発現プラスミドが導入された細胞を選択し、*p53* テトラサイクリン調節性プラスミドのH1299安定発現細胞株を樹立した。この細胞株をテトラサイクリンの誘導體であるドキシサイクリンを含む培地に蒔いてから72時間後に生存細胞の数をテトラゾリウムナトリウム塩WST-8の還元を測定することによって数え、野生型とIle31型との細胞増殖抑制の活性を比較した。

[結果]

家族性胃がん35家系の発端者およびその親族80例について *p53* 遺伝子の生殖細胞系列変異を調べた結果、1つのミスセンス変異(c.91G>A: p.Val31Ile)と2つのイントロン内の変異が見出された。

同定したミスセンス変異p.Val31Ileの変異型であるIle31型のp53標的遺伝子に対する転写活性化能をレポーターアッセイによって調べた結果、BAXに対するIle31型の転写活性化能は野生型との間に有意な差はなかったが、p21とMDM2に対するIle31型の転写活性化能は野生型よりも有意に減少していた。さらに、Ile31型の細胞増殖抑制の活性を調べた結果、Ile31型は野生型よりも有意に低下していた。

[考察]

日本人の家族性胃がん35家系について生殖細胞系列p53変異を塩基配列決定法によって調べ、1つのミスセンス変異(c.91G>A: p.Val31Ile)と2つのイントロン内の変異が見出された。p.Val31Ileのミスセンス変異は新規の生殖細胞系列p53変異であり、1家系で発端者のみのヘテロ接合として検出された。家族集積性の胃がんにおけるこの変異の機能的影響を調べた。レポーターアッセイでは、BAXにおける転写活性化能は野生型との間に有意な差はなかったが、p21とMDM2における転写活性化能は野生型よりも有意に低いことを示した。細胞増殖アッセイでは野生型よりも細胞増殖抑制能が有意に低いことを示した。これらの結果から、Ile31型は野生型と比較して低い転写活性化能と低い細胞増殖抑制能により家族性胃がんに関与するかもしれないということが示唆された。

[結論]

日本人の家族性胃がんにおいてp53遺伝子の新規生殖細胞系列変異がはじめて同定され、この変異がp53の機能の低下を引き起こし、家族性胃がんの少なくとも一部である程度寄与することが示唆された。今後、家族性胃がんにおいてはCDHI遺伝子のほかにこのp53変異についても遺伝子検査を行う必要であり、なぜ、一定年齢以上で発がんが起るのかといった問題を明らかにする必要があると考える。

論文審査の結果の要旨

胃がんは日本ではまだ死亡率が高い疾患である。多くの胃がんは孤発性であるが、家族性の胃がんも少なくない。現在までに、家族性胃がんの原因遺伝子としてE-カドヘリン遺伝子(CDHI)の生殖細胞系列変異が報告されている。CDHI以外の遺伝子の生殖細胞系列変異が家族性胃がんに関与することが考えられる。癌抑制タンパクp53はDNA損傷に反応して細胞周期の停止、修復機能の促進、アポトーシスなどを誘導する。p53機能の失活は変異によって引き起こされ、がんの発症に重要な役割をする。p53の生殖細胞系列変異はリ・フラウメニ症候群の原因遺伝子となることが知られており、最近では、ヨーロッパ人と韓国人の家族性胃がんでのp53の生殖細胞系列変異が同定されている。申請者は、日本人の家族性胃がんにおける生殖細胞系列変異を検討するため、35家系の家族性胃がんの発端者およびその親族80例についてp53の変異を調べた。

80例についてPCRとその塩基配列決定の結果、11種の異なる変異を同定した。そのうちc.91G>A変異はエキソン3にあり、p.V31Iというミスセンス変異をおこす日本で初めての家族性胃がん家系の生殖細胞系列変異であることを見出した。そこで、この変異の機能について検討した。p53をもたないH1299細胞にTet-on遺伝子発現システム下にp.V31I変異をもつp53 cDNAを挿入したDNAを遺伝子導入し、永久株を樹立した。その際、DNA結合能がないp.V143AをもつcDNAおよび野生型p53 cDNAも同じシステムにて永久株を樹立した。

p53タンパクの転写活性を知るために、標的としてp21, BAX, MDM2プロモーターを選んだ。3つの標的

に対し、野生型p53では強い活性化が、V143Aではほとんど活性化能がなかった。一方、p.V31I変異タンパクはBAX遺伝子を野生型p53と同じくらい活性化したが、p21遺伝子とMDM2遺伝子に対しては野生型の半分の活性化能しかなかった。次に、細胞の増殖に与える効果について検討した。野生型p53は強い細胞増殖抑制がかかるが、p.V31I変異タンパクはp.V143A変異タンパクと同じくらい弱い増殖抑制が見出された。

審査委員会は、日本人家族性胃がん家系から、胃がんでは初めてp53のp.V31Iミスセンス変異を発見し、その変異によりp53タンパクがもつ標的遺伝子の活性化および細胞増殖抑制作用が部分的に失われることを証明した点を大きく評価した。

審査会では、以下のことについて質問がなされた。

- 1) WST-8アッセイ法の原理について
- 2) 腫瘍部でのp53変異は何か
- 3) 野生型p53と変異型p53の共存実験はしたか
- 4) p.V31I変異タンパクの転写活性能が標的により異なるのはなぜか
- 5) この症例のがんの特徴は何か
- 6) 大きなゲノムの変化の検出法は何か
- 7) イントロンに見出された変異の意味は何か
- 8) ドキシサイクリン非存在下のTet-on システムで単なるベクターと変異p53タンパク誘導遺伝子をもつ永久株の間に差異がある理由は何か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三浦直行
副査 前川真人 副査 蓑島伸生