



Novel Mutations of Neurofibromatosis Type 1 Gene in Small Cell Lung Cancers

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 古川, 憲一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1057

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 204号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏名	古川 憲一		
論文題目	Novel Mutations of Neurofibromatosis Type 1 Gene in Small Cell Lung Cancers (肺小細胞癌における Neurofibromatosis 1 型遺伝子の新しい点突然変異)		

博士(医学) 古川 憲 一

論文題目

Novel Mutations of Neurofibromatosis Type 1 Gene in Small Cell Lung Cancers

(肺小細胞癌における Neurofibromatosis 1 型遺伝子の新しい点突然変異)

論文の内容の要旨

(目的)

肺癌における NF-1 遺伝子の FLR exon と k-ras 遺伝子の異常を調べ、発癌機序及び臨床データとの関係を考察する。

(方法)

肺癌37例(扁平上皮癌9例、腺癌17例、小細胞癌9例、大細胞癌2例)の腫瘍部と正常部よりDNAを抽出した。k-ras 遺伝子の exon 1 と NF-1 遺伝子の FLR exon を、全例にわたって PCR 法により増幅した。増幅された PCR 産物を SSCP 法により電気泳動し、遺伝子の突然変異をスクリーニングした。この際、見い出された異常なバンドを、電気泳動を行ったポリアクリルアミドゲルより切り出して DNA を抽出した。抽出した DNA を再び PCR 法により増幅した。増幅された DNA を精製し、ダイレクト・シーケンス法により、遺伝子の突然変異によるヌクレオチドの変異を調べた。

遺伝子の突然変異のみられた症例に対し、SSCP を行う以前の PCR 産物を、サブクローニング法にて増幅した。増幅された PCR 産物をシーケンシングし、再度、ヌクレオチドの変異を確認した。

(結果)

肺癌37例のうち、SSCP 法により泳動したゲルに異常なバンドを認めたものは、k-ras 遺伝子の exon 1 を含む PCR 産物では0例であり、他方、NF-1 遺伝子の FLR exon を含む PCR 産物では3例であった。この3例は、いずれも小細胞癌であり、また、いずれも縦隔リンパ節に癌細胞の転移を認めた。逆に、小細胞癌のうち、NF-1 遺伝子の FLR exon に異常を認めない残りの6例では、縦隔リンパ節への癌細胞の転移は認められなかった。

NF-1 遺伝子の FLR exon に異常のあった3例のうち、2例はコドン1415の2番目のヌクレオチドに点突然変異を認めた。どちらもアデニンからグアニンへの変異であった(GAA→GGA)。この結果、コードするアミノ酸はグルタミン酸からグリシンに変異した。残りの1例は、コドン1411の3番目のヌクレオチドにアデニンからグアニンへの変異を認めた(CCA→CCG)。しかしこの場合は、コードされるアミノ酸(プロリン)に変化はなかった。

NF-1 遺伝子の FLR exon に異常の認められた3例は、サブクローニング法でも同じ結果が得られた。

(結論及び考察)

NF-1 遺伝子の FLR exon での突然変異は、肺小細胞癌の9例中3例と高率に認められた。そのうち2例は、アミノ酸レベルに変異があった。また、突然変異のあった症例は、いずれも縦隔リンパ節への癌細胞の転移を認め、同部の突然変異が悪性度と関係がある可能性が考えられる。

k-ras 遺伝子の突然変異や増幅は種々の癌腫瘍で見られるが、肺癌、特に小細胞癌ではその頻度が少ないと言われる。また、k-ras 遺伝子の発現産物である p21^{ras} は GTP 結合蛋白であり、GTPase 活性化蛋白(GAP)により、これは GDP 結合状態に変化し、不活性化される。他方、NF-1 遺伝子の発現産物であるニューロフィブロミンには、GAP ドメインが内在している。ここで用いた FLR exon は、GAP にあたる部分のドメインをコードしている。そのため、FLR exon に異常があると

GAP 活性が低くなるか或いは失われ、p21^{ras}の不活性化が起こらなくなる。このような理由で、大腸癌、退形成星状細胞腫等で腫瘍化が起こるといふ説が、Li, Y.らにより提唱されている。今回の我々の実験結果から、肺小細胞癌における癌化の過程の一つとして、彼らの説があてはまると思われる。

論文審査の結果の要旨

細胞周期を調節している遺伝子の変異、転座、及び癌抑制遺伝子の欠失等により細胞増殖の調節が異常になり、癌細胞の特徴が表れるということが癌遺伝子の研究の進歩により明らかになりつつある。

このような研究の流れの中で、申請者は肺癌37例（扁平上皮癌9例、腺癌17例、小細胞癌9例、大細胞癌2例）の腫瘍部と正常部よりDNAを抽出し、k-ras 遺伝子の exon 1 と NF-1 遺伝子の FLR exon を PCR 法により増幅し、塩基配列解析により変異の有無を検索した。

申請者の論文内容、口頭発表について次の点が新しい内容として評価された。

1. NF-1 遺伝子の FLR exon を含む PCR 産物を SSCP 法により解析した時、肺癌37例の内3例の小細胞癌のみに異常なバンドを認めた。これら3例では縦隔リンパ節への癌細胞の転移が認められた。NF-1 遺伝子の FLR exon に異常を認めない残りの6例では縦隔リンパ節への転移は認められなかった。このことから、同部の突然変異が悪性度と関係することが示唆された。また、全37例の k-ras 遺伝子の exon 1 を含む PCR 産物では SSCP 法で異常なバンドは認められなかった。
 2. NF-1 遺伝子の FLR exon 異常3例の内2例は、コドン1415の2番目のヌクレオチドにアデニンからグアニンへの点突然変異 (GAA→GGA) があり、コードするアミノ酸に Glu1415Gly 変異が演繹されるものであった。残りの1例の変異は、コドン1411の3番目のヌクレオチドのアデニンからグアニンへの変換 (CCA→CCG) であり、コードされるアミノ酸（プロリン）に変化はなかった。
- 以上まとめると、肺小細胞癌では k-ras 遺伝子の突然変異がおこりにくいことを確かめ、更に NF-1 遺伝子の FLR exon に変異のあることを発見し、肺小細胞癌における癌化の過程と転移に関する機構に1つの新しい考え方をなげかけた点で本研究は評価される。

論文審査の過程で申請者に対し、次のような質疑がなされた。

- 1) 肺小細胞癌9例の内 NF-1 遺伝子 FLR exon に変異がみられた3症例の病理組織像に特徴があるのか
- 2) どうして NF-1 遺伝子の FLR exon 部を選んで検索を行ったのか
- 3) NF-1 遺伝子の FLR exon 部分の変異と発癌との推定上の因果関係、特に FLR exon は GAP (GTPase 活性化蛋白) ドメイン領域をコードしていることとの関係があるのか
- 4) NF-1 遺伝子の FLR exon 部分の変異と、縦隔リンパ節への転移との推定上の因果関係、因果関係があるとすれば、3例のうち1例の変異はアミノ酸転換を伴わないことについての解釈
- 5) ras 遺伝子の産物と NF-1 遺伝子の産物の機能を生化学的に説明せよ
- 6) 放射線照射、化学療法、喫煙などでこの変異はおこるのか
- 7) 肺小細胞癌に家族内発生はあるのか
- 8) 肺線維症の合併はみられたのか、また、肺線維症と遺伝子異常の関係はどのようなものであるか

以上の質疑に対し申請者の解答はおおむね適切であり、問題点も充分理解しており、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	教授	吉田孝人			
	副査	教授	市山新	副査	教授	梶村春彦
	副査	助教授	佐藤篤彦	副査	講師	鈴木一也