



Mx1l mutations in human neurofibrosarcoma

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 曉進 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1145

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 292号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏 名	李 曉 進		
論文題目	Mx11 mutations in human neurofibrosarcoma (ヒト神経線維肉腫における Mx11 の突然変異)		

博士(医学) 李 曉 進

論文題目

Mx11 mutations in human neurofibrosarcoma

(ヒト神経線維肉腫における Mx11 の突然変異)

[はじめに]

Mx11蛋白質はMaxと結合し、競合的にMycのMaxへの結合を妨げ、あるいはMyc/Maxの認識塩基配列、CACGTG への結合を障害することより、Myc の機能を制御する。その意味で、Mx11 は腫瘍抑制遺伝子の一群に属するとされる。最近、私たちは実験誘発のラット食道癌で Mx11 の変異を見出したが、現在まで、ヒト腫瘍における Mx11 の変異の報告は少なく、特殊な前立腺癌に少数変異の報告があるのみであった。本研究は間葉系腫瘍も含めた広範なヒト固形腫瘍におけるMx11の変異を検索した。

[対象ならび方法]

対象：

31例の胃癌、7例の食道癌、85例の各種の骨と軟部腫瘍および32例のヒト腫瘍細胞株を対象にした。これらのサンプルからDNAを取って、以下の実験に用いた。

方法：

Polymerase chain reaction (PCR)、single-strand conformation polymorphism (SSCP)：

ヒト Mx11 のイントロンの塩基配列よりエクソン1、2、4、5、6を増幅するプライマーを設計して、DNAサンプル1 μ lを24 μ lの反応液にいて、PCRを行った。5 μ lのloading buffer (95% formamide と dye) を5 μ lのPCR産物と混合して、96°C15分間変性して、5%のグリセロールの有無、4°C、室温計4条件で10%ポリアクリアミドゲルに泳動した。二本鎖および一本鎖 DNA バンドは銀染色で可視した。Taq ポリメラーゼの読み誤りによる人為的な変異を避けるために、異常バンドのある検体につき、PCRとSSCPは3回行った。

塩基配列決定：

SSCPで異常バンドが見出されたサンプルに対して、di-deoxy法で塩基配列を決定した。純化したPCR産物を pGEM-T Easy Vector™ (Promega) にライゲーションして、XL1-blue にトランスフォーメーションした。一検体に対して、6クローンの塩基配列を決定して、二つ以上のクローンで同じ変異が存在するとき、この症例の変異とした。また、放射性同位元素を用いたシーケンスの不鮮明な症例について ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA) を用い、直接塩基配列を決定した (direct sequence dye-terminator法による)。

ヘテロ接合性消去の検出：

Mx11 遺伝子のイントロン3の (TG) 反復配列と3非翻訳領域にある (AAAAC) 反復配列を利用して、胃癌と食道癌のMx11のヘテロ接合性の消失を検討した。

多型性：

Mx11 のイントロン5に TTC 反復配列を発見し、PCR-SSCP 法で日本人、中国人および Australian Caucasiansの多型について、その分布を検討した。

〔結果〕

SSCPと塩基配列の解析：

細胞株320、HT-1080と症例1神経線維肉腫のエクソン2で異常SSCPバンドがあった。塩基配列を決めるとHT-1080と細胞株320ではコドン29でGGCからGGTになったサイレンス変異であった。症例1神経線維肉腫ではコドン54でGCAからGTAになって、アミノ酸変化（AlaからVal）を伴っていた。細胞株DLD-1、U87、症例3神経線維肉腫と一例のchondrosarcomaのエクソン6で異常SSCPバンドが見つかった。塩基配列はDLD-1、U87MGと一例のchondrosarcomaのエクソン6上流21bpのところ（TTC）₃のかわりに（TTC）₂があり、これは多型だった（後述）。症例3神経線維肉腫では8コドンにわたり大きな変異が確認された。つまり、コドン169、171、176のところそれぞれGTGからGCG（ValからAla）、GTTからGCT（ValからAla）、TTCからCTC（PheからLeu）に変化していた。症例2神経線維肉腫のエクソン5で異常SSCPバンドがあり、コドン118と152でAAAからCAA（LysからGln）、GAAからGGA（GluからGly）にかわっていた。症例1、2の同一患者神経線維肉腫の組織のDNAに関してはMx1変異はなかった。

ヘテロ接合性の消失の解析：

31例の胃癌と7例の食道癌に対してヘテロ接合性の消失を調べた。15例の（TG）反復と11例の（AAAAC）反復についてinformativeであったが、いずれもヘテロ接合性の消失は認められなかった。

多型性解析：

イントロン5の中の（TTC）反復配列につき多型が見られた。44例のAustralian Caucasiansでの分布は（TTC）₃/（TTC）₂：（TTC）₃/（TTC）₁：（TTC）₂/（TTC）₁は26：17：1だった。50例の日本人と50例の中国人のDNAではほとんど（TTC）₃/（TTC）₃であった。

〔結論〕

Mx1変異は一般に頻度の高い胃癌、食道癌を含めるとヒト固形腫瘍ではまれであった。しかし、その中で神経線維肉腫に高頻度で、4例のうち、3例に変異が見出され、いずれも機能ドメインにあった。その中、2例はvon Recklinghausen's diseaseを背景としたものであり、同一患者の良性神経鞘腫や神経腫では変異がなかった。従って、Mx1のヒト腫瘍における意義はかなり特異的で、特に神経線維肉腫の発生や神経線維肉腫の悪性化に関与する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

本申請者の取り上げたタンパクMx1は転写活性化因子Maxと二量体を形成してその活性を抑制する効果をもつことが知られる。申請者らはすでにラット食道癌でMx1の変異を見出しているが、本研究ではヒトにおけるMx1の変異を見出すために広範な固形腫瘍を検索した。

方法としては胃癌、食道癌、骨腫瘍、軟部腫瘍、腫瘍細胞株を対象とし、これらから得たDNA試料についてPCR-SSCPを行った。異常が見出された試料についてさらに塩基配列を解析した。ヘテロ接合性の消失loss of heterozygosity（以下LOH）の検出にはイントロン3のTG反復配列と3'非翻訳領域のA₄C反復配列を利用した。

二つの細胞株（320とTH-1080）でエクソン2コドン29にGGC→GGTのサイレント変異が、神経線維肉腫の1例で同54にGCA→GTA（A54V）の顕性変異が見出された。神経線維肉腫の他の1例でGTG→GCG（V169A）、GTT→GCT（V171A）、TTC→CTC（F176L）が、同症例のさらに他の1例でAAA

→CAA (K118Q)、GAA→GGA (E152G) が見出された。31例の胃癌と7例の食道癌について検索したがLOHは検出されなかった。イントロン5のT₂C反復配列の多型性がオーストラリア白人には見られたが、50例ずつの日本人と中国人には見られなかった。

以上、申請者らは Mx11 の突然変異が普通頻度の高い固形腫瘍では少ないにかかわらず神経線維肉腫では4例中3例に変異がありいずれも機能ドメインにあることを明らかにした点が評価された。

本発表に際して以下のような質問を行った。

- 1) P2 (c-mycプロモーター)からの転写を抑える機構について
- 2) 神経線維肉腫以外の神経腫瘍についてはどうか
- 3) 病理組織は症例でどのように異なるか
- 4) TG反復配列とA₄C反復配列に多型性はみられなかったか
- 5) Madの突然変異の報告はあるか
- 6) 染色体10q24-25の欠失の例が知られているか
- 7) エキソン3領域については検索しなかった理由
- 8) 変異Mx11の機能アッセイはどうか
- 9) LOH検索におけるnon-informativeなデータについて

これらの試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 教授 藤 田 道 也

副査 教授 瀧 川 雅 浩 副査 助教授 永 田 年