



Detection of 12 Germ-Line Mutation in the Adenomatous Polyposis Coli Gene by Polymerase Chain Reaction

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安藤, 浩 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1463

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	医博論第 186号	学位授与年月日	平成 6年 9月16日
氏名	安藤 浩		
論文題目	Detection of 12 Germ-Line Mutation in the Adenomatous Polyposis Coli Gene by Polymerase Chain Reaction (PCR法を利用した家族性大腸腺腫症患者における APC 遺伝子変異の検出)		

博士(医学) 安藤 浩

論文題目

Detection of 12 Germ-Line Mutation in the Adenomatous Polyposis Coli Gene by Polymerase Chain Reaction

(PCR法を利用した家族性大腸腺腫症患者におけるAPC遺伝子変異の検出)

論文の内容の要旨

家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis ; FAP) は、常染色体優性の遺伝性疾患で、大腸に数百から数千の腺腫を形成する。この腺腫を放置すれば、ほぼ100%大腸癌が発生してくるといわれている。最近我々は、FAPの原因遺伝子 (APC遺伝子) を単離することに成功した。そしてFAP患者におけるAPC遺伝子のgerm-line変異を解析し、APC遺伝子変異の中でPCR (polymerase chain reaction) 法のみまたは、PCR法と制限酵素処理を組合せることで検出可能な変異を検索した。

そのために、FAP 79家系の各家系の患者1名を選び、末梢血よりDNAを抽出し、APC遺伝子を31の領域に分けてPCRにより増幅した。PCR産物にRNase protection assayを行い、変異の有無をスクリーニングした。その結果変異のあると思われるPCR産物の、DNA塩基配列を決定し変異を同定した。これらの変異の内、PCR法のみまたはPCR法と制限酵素処理との組合せで検出可能な変異を検索した。

その結果、PCR産物をポリアクリルアミドゲルで、電気泳動することにより検出可能な5塩基の欠失を3種類、4塩基の欠失を1種類認めた。また、PCR産物を特定の制限酵素により処理し、電気泳動することで検出可能な変異は8種類あり、それぞれの制限酵素はMaeI、AflIII、MseI、TaqI、AccI、MspI、NdeI、NlaIIIであった。

FAP患者におけるAPC遺伝子のgerm-line変異には、hot spotは認められない。そのため、FAP患者のgerm-line変異を検索するには、約10 kbあるAPC遺伝子の全体について調べる必要がある。しかし、その方法は時間と費用がかかり困難な方法である。この研究で得られたPCRで検出可能な12種類の変異はAPC遺伝子変異の約40% (40/95) を占め、FAP患者の発症前診断のスクリーニングに有用と考えられる。また、一般大腸腺腫や大腸癌でのAPC遺伝子変異のスクリーニングにも利用できると思われる。従来APC遺伝子近傍のRFLP (restriction fragments length polymorphism) マーカーを用いたリンケージ解析によるFAPの発症前診断と比べて、この方法を使った発症前診断では、遺伝子間の組み替えの問題が全くないため正確で、簡便である。

これらの方法で、FAPの保因可能者が発症前診断され、非保因者と診断されれば、大腸腺腫の発生や高率に発症する大腸癌に対する不安や、頻回の臨床検査からも解放される。一方、不幸にも保因者と診断されれば、慎重なfollow upにより大腸癌やその他の合併症の早期発見、早期治療が可能である。

論文審査の結果の要旨

APCはFAP (familial adenomatous polyposis) の原因遺伝子として第五染色体長腕 (5 q 21) に見出された。FAPは日本人の約20,000人に一人が罹患する遺伝病である。

APCは15のエキソンを含む大きいタンパク(2843アミノ酸残基)をコードしている。このうちエキソン15だけで全体の3/4をしめるという特殊性をも示している。全体としては親水性のタンパクである。その他ロイシンジッパー類似構造、ral-2ホモロジー、ムスカリン受容体-Gタンパク共役ドメインホモロジー、くり返し20アミノ酸配列などの構造的特徴をもつ。

APCの転写産物は単一ではなく、それは転写開始部位のちがひ、二者択一式エキソン使用(9/9A、7/-)などの結果である。スプライシングは組織によって特異性があると想像される。シグナル認識顆粒のSRP19タンパクをコードする配列を含むエキソン14も二者択一的スプライシングの対象となる。また、APCタンパクには α -と β -カテニンというE-カドヘリン結合タンパクが会合していることもわかった。このように、APCは複雑なタンパクであり、その全容はまだ解明されていない。

申請者らは遺伝的変異を異にするFAPの12家系から調製したゲノミックDNAからAPC遺伝子の11種の異なる断片をPCR増幅した。これらについて、あらかじめ日英米の95のFAP家系に見出された遺伝的変異の40%をしめる12種の変異を4種の未処理の断片、8種の異なった制限酵素処理した断片(PCR断片のうち一つ[コドン622、625を含む]については二つの異なった制限酵素で処理した)のサイズを電気泳動法で特定するという方法を考案した。

それら変異の内訳は、大きくわけて1塩基欠失(コドン1211)、2塩基欠失(コドン806)、4塩基欠失(コドン1156)、5塩基欠失(コドン1061、1309、1546)、ナンセンス突然変異(コドン232、302、577、622、625、932)の4形式12種であり、あらかじめ選んだ12家系にあてはまるものであり、例外なく検出することができた。

以上の方法を用いることにより、これらの頻度の高い遺伝子変異をもつFAP家系構成員について簡単に予備診断を下すことができる点が評価された。

また、本研究について以下の事項について質疑がなされた。

1. APC(ゲノミックDNA)のサイズ
2. エキソン15の塩基数
3. 今回の12種より多くの変異があるのではないか
4. PCRプライマーの選択について
5. 電気泳動のゲルの濃度
6. APCはどんなタンパクか
7. FAPの発症率と死亡年齢について
8. FAPにおける悪性化の年齢と遺伝的変異のタイプは関係するか
9. APCの変異だけで悪性化がおこらない理由
10. 大腸以外の臓器におけるAPCの発現について
11. APCと細胞内信号系について
12. FAPの治療法
13. この診断法の意味、とくに疾患のフォローアップとの関連について

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、以上から本論文は博士(医学)の学位を授与する内容をもつことを論文審査委員会委員全員が一致して判定した。

論文審査担当者 主査 教授 藤田 道也
副査 教授 金子 榮藏 副査 教授 菅野 剛史
副査 助教授 梶村 春彦 副査 講師 今野 弘之