

# Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma

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: 武林, 悟 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1604">http://hdl.handle.net/10271/1604</a>

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 327号	学位授与年月日	平成12年12月22日
氏名	武林 悟		
論文題目	Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma (頭頸部扁平上皮癌の常染色体 18 番長腕における最小欠損部位の同定)		

博士(医学) 武林 悟

## 論文題目

Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma  
(頭頸部扁平上皮癌の常染色体18番長腕における最小欠損部位の同定)

## 論文の内容の要旨

### [目的]

これまでの研究により、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)においては、常染色体18番長腕(18q)が欠損していることが多いといわれている。今回HNSCCのcell lineを用いて18qのLOH(Loss of heterozygosity) studyを行い、HNSCCの18qにおけるminimally lost region (MLR)の部位を考察した。

### [方法]

#### 1) Cell lineとDNA抽出

The University of Michigan (USA)とTurku University (Finland)にて確立されたHNSCCのcell line中、正常DNAが利用可能な57cell lineを用いた。正常DNAとしては、cell line donorのfibroblastかEBV transformed B lymphocyteより抽出したDNAを使用した。DNAはNucleon II extraction kit (Scotlab, Shelton, CT)を用い、抽出した。

#### 2) LOHの検出

##### a) マイクロサテライトマーカー

マイクロサテライトマーカー (Research Genetics, Huntsville, AL)は、18q11.1 (D18S44)より18q23 (D18S1141)までの42種類を用いた。マイクロサテライト間の距離は5cM以内で平均1.87cMであった。常染色体18番短腕のLOHの確認にはD18S71 (18q11.21)を用いた。

##### b) PCR

PCRはT4 polynucleotide kinaseにより<sup>32</sup>Pをendlabelしたsense primerと、同量のunlabeled antisense primerを用い、hot start法にて施行した。Shadow bandを減少させるため1% DMSOを反応液に追加した。PCRの条件は、まず94℃で3分間denatureし、PCRを30 cycle (94℃を20秒間49-59℃を30秒間、72℃を40秒間)した後、72℃で5分間final extensionした。PCR産物にstopping solutionを加え94℃で3分間denatureした後、prewarmされた7M尿素を含んだ6% bis-acrylamide gelで1-5時間電気泳動(115W、47℃)した。ゲルをWhatman paperにtransferし80℃で1時間乾燥した後、intensifying screenを用いて撮影した。

### [結果]

それぞれのマイクロサテライトマーカーに対するLOH頻度は13% (D18S44, 18q11.1)から75% (D18S70, 18q23)であった。75% (43/57)のHNSCC cell lineが少なくとも1つの18qのlocusでLOHかAIを示した。8 cell lineは18qのwhole arm lossを示し(5 cell lineは18pにてもLOHがあり常染色体18番の全欠損が示唆された。)、35 cell lineは18qのpartial lossを示した。他の14 cell lineにはLOHを認めなかった。また、9 cell lineではAI (allelic imbalance)を示した。Partial lossを示したcell line中、63% (22/35)はbreak pointを、D18S480 (18q11.1)からD18S57 (18q12.3)の間に認めた。

LOH頻度が70%以上のMLRは3ヶ所であった。D18S39 (18q21.1)は74% (28/38 informative case)のLOH頻

度を示し、D18S61(18q22.2)は70%(28/40)で、D18S70(18q23)は75%(30/40)であった。D18S61は、UT-SCC-20A、-16AとUM-SCC-12におけるminimal lossを考えると、D18S50(18q23)までがMLRと考えられた。D18S70は、検査した43のマーカーで最高のLOH頻度を示した。このD18S70より0.34cM centromericのD18S461では、LOH頻度は53%(18/34)で0.57cM centromericのD18S871では52%(14/27)であった。また、D18S70よりtelomericのD18S1122とD18S1141では、LOH頻度はそれぞれ63%と66%であった。Minimal lossを示した6 cell lineでは、すべてのD18S70においてLOHかAIを示した。特に、UM-SCC-67ではLOHはこのlocusのみで、UM-SCC-91ではこのlocusのみAIを示した。同様に、UT-SCC-4はこのlocusでLOHと、他のMLRであるD18S39でAIを示すのみであった。MLRの距離は、D18S39では1.56cM、D18S61-D18S50では15.8cMで、D18S70では3.67cMであった。

#### [考察]

今回の実験ではcell lineより抽出されたDNAのみを用いた。tumor tissueより直接抽出されたDNAとは異なり、正常DNAのcontaminationがないため、AIはcell lineにおいて異なるclonal populationがあり、その1つのcloneのLOHを示していると考えられた。このためLOH頻度はAIも含め算出した。

我々の報告したこれら3つのMLRには、既知の癌関連遺伝子はmapされておらず、新たな癌関連遺伝子がある可能性もあると考えられる。

また、これらのMLRはすべてbreak pointよりtelomericのconsistent lossの部位に位置しており、18qにmapされているDCC, Smad2, Smad4, 等の遺伝子が頭頸部癌の発癌や進行に関与している可能性も考えられた。

#### [結論]

D18S39(18q12.1)、D18S61(18q22.2)-D18S50(18q23)とD18S70(18q23)の3ヶ所のMLRが18qで認められた。特に、D18S70では、隣接するマイクロサテライトマーカーよりLOH頻度が高く、このMLRがHNSCCに関係が深いと示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)では、常染色体の一部欠損がみられることが多いとの報告がある。申請者らは、その中で欠損の頻度が高いと言われている常染色体18番長腕(18q)に着目し、loss of heterozygosity (LOH) studyを行い、HNSCCの18qにおけるminimally lost region (MLR)を検討した。検索材料として、The University of Michigan (USA)とTurku University (Finland)にて確立されたHNSCCのcell line中で、正常細胞と腫瘍細胞が揃っているもの57検体を用いた。正常DNAとして、cell line donorのfibroblastかEBV transformed B lymphocyteより抽出したDNAを使用した。マイクロサテライトマーカーは、18q11.1 (D18S44)から18q23 (D18S1141)までの42種をもちい、マイクロサテライト間の距離は5cM以内(平均1.87cM)であった。常染色体18番短腕のLOHの確認にはD18S17(18p11.21)を用いた。

PCRは、T4 polynucleotide kinaseにより<sup>32</sup>Pをend-labelしたsense primerと、同量のunlabeled antisense primerを用い、shadow bandを減少させるため1%DMSOを反応液に追加し、hot startで行った。PCRの条件は、94℃で3分間denatureし、PCRを30 cycle(94℃・20秒間、49-59℃・30秒間、72℃・40秒間)した後、72℃で5分間final extensionした。PCR産物にstopping solutionを加え、94℃で3分間denatureした後、prewarm

された7M尿素を含んだ6%bis-acrylamide gelで1~5時間電気泳動(115W、47℃)した。ゲルをWhatman paperにtransferし80℃で1時間乾燥した後、intensifying screenを用いて撮影した。得られた主な結果は、以下のとおりである。

それぞれのマイクロサテライトマーカーに対するLOH頻度は13% (D18S44, 18q11.1)から75% (D18S70, 18q23)であった。75% (43/57)のHNSCC cell lineが少なくとも1つの18qのlocusでLOHかallelic imbalance (AI)を示した。8 cell lineは18qのwhole arm lossを示し(5 cell lineは18pのlocusにもLOHがあり、常染色体18番の全欠損が示唆された)、35 cell lineでは18qのpartial lossを示した。他の14 cell lineにはLOHを認めなかった。また、9 cell lineではAIを示した。partial lossを示したものの63% (22/35)では、D18S480 (18q11.1)からD18S57 (18q12.3)の間にbreak pointを認めた。LOH頻度が70%以上のminimally lost region (MLR)は3か所であり、D18S39 (18q21.1)は74% (28/38 informative case)、D18S61 (18q22.2)は70% (28/40)、D18S70 (18q23)は75%であった。D18S61は、UT-SCC-20A, -16AとUM-SCC-12におけるminimal lossを考えると、D18S50 (18q23)までがMLRと考えられる。D18S70は、検査した43のマーカーで最高のLOH頻度を示した。このD18S70より0.34cM centromericのD18S461では、LOH頻度は53% (18/34)で0.57cM centromericのD18S871では52% (14/27)であったが、D18S70よりtelomericのD18S1122とD18S1141では、LOH頻度はそれぞれ63%と66%であった。minimal lossを示した6 cell lineでは、すべてD18S70においてLOHかAIを示した。UM-SCC-67ではLOHはこのlocusのみに、UM-SCC-91ではこのlocusのみAIであった。UT-SCC-4はこのlocusでLOHと、他のMLRであるD18S39でAIのみであった。MLRの距離は、D18S39では1.56cM、D18S61-D18S50では15.79cM、D18S70では3.67cMであった。

今回申請者らは、cell lineより抽出されたDNAのみを使用したため、腫瘍組織より直接抽出されたDNAとは異なり、正常DNAの混入がなく、AIはcell lineにおいて異なるclonal populationがあり、その1つのcloneのLOHを示していると考えられたためLOH頻度はAIも含めて算出した。申請者らの報告したこれら3つのMLRには、既知の癌関連遺伝子はmapされておらず、新たな癌関連遺伝子の存在が考えられる。また、これらのMLRはすべてbreak pointよりtelomericのconsistent lossの部位に位置しており、18qにmapされているDCC, Smad2, Smad4等の遺伝子が、頭頸部癌の発癌や進行に関与していると考えられる。

結論として、18qでD18S39 (18q12.1), D18S61 (18q22.2)-D18S50 (18q23), D18S70 (18q23)の3か所のMLRが認められ、特にD18S70では、隣接するマイクロサテライトマーカーよりLOH頻度が高く、このMLRがHNSCCに関係深いことが示唆された。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) コントロールとしての正常DNAには、何を用いたのか
- 2) 57 cell lineのstageなどは、わかっていたのか
- 3) 濃度差がでるのを、どのように調整したか
- 4) denaturing gelには、何がはいっているのか
- 5) 1cMは何ベース位に相当するか
- 6) マイクロサテライトの染色体上の位置が変わることがあるか
- 7) セックス・アベレージとは、どのようなことか。
- 8) イントロンのところに、マイクロサテライトがあるのか
- 9) 黒と白の境界部分でクロモソームが切れていると考えて良いか
- 10) あるところから欠損が出てくるが、break pointと考えて良いか

- 11) これだけLOHがあれば、18qの欠損は染色体分析で分かるのではないか
- 12) LOHは、癌抑制遺伝子の存在する証拠と考えても良いか

これらの質問に対し申請者の解答はおおむね適切であり、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判定した。

論文審査担当者 主査 橋本賢二  
副査 梶村春彦 副査 三浦克敏