HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Analysis of c-Ki-ras Mutations in Human Multiple Colon Carcinoma by Allele-specific PCR

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: 照沼, 秀也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1003

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　１５０号	学位授与年月日	平成　５年　３月２６日
氏　　名	照　沼　秀　也		
論文題目	Analysis of c-Ki-ras Mutations in Human Multiple Colon Carcinoma by Allele-specific PCR (ヒト多重大腸癌における c-Ki-ras 遺伝子突然変異の対立遺伝子特異的 PCR による解析)		

医学博士　照沼秀也

論文題目

Analysis of c-Ki-ras Mutations in Human Multiple Colon Carcinoma by Allele-specific PCR

（ヒト多重大腸癌におけるc-Ki-ras遺伝子突然変異の対立遺伝子特異的PCRによる解析）

論文の内容の要旨

〔目的〕

大腸癌はヒト消化器癌発癌研究のよいモデであるとされる。最近の研究で、正常粘膜から腺腫、腺腫から腺癌への進行には複数の遺伝的変化の伴うことが明らかにされてきた。腫瘍の発生と悪性化には中でも二つの経路のあることがわかってきた。一つは癌遺伝子のホットスポットにおける点突然変異とその結果としてのトランスホーメーションの活性をもった生成物の発現である。他はAPCのような癌抑制遺伝子発現産物の欠損である。

c-Ki-ras は分子量21,000のGTPaseスーパーファミリーに属するタンパク質をコード（暗号化）している。その加水分解部位はコドン10-17にあり、突然変異の結果としてのこの部位のアミノ酸置換はGTPase活性の低下、ras発現産物関連系の活性化状態への固定などの結果を生むことが予想される。rasの突然変異が腫瘍の悪性化進行の早期に関与しているという証拠はふえつつある。

ポリポーシスを伴わない大腸腺腫が複数個同時に生じることがある。本研究では、家族性大腸ポリポーシスや癌家系の疑いがまったくない一人の患者に同時に発生した五つの大腸腫瘍について（個々の腫瘍）c-Ki-rasの突然変異を検索した。個々の腫瘍のc-Ki-ras の突然変異に相違があるのかないのか、また突然変異があった腫瘍についてその悪性進行の程度を知りたい、などの興味がもたれた。

〔材料と方法〕

大腸全摘・写真撮影後直ちに腫瘍を液体窒素で冷却した。通常の方法により各腫瘍および正常粘膜からDNA を抽出した。c-Ki-ras遺伝子エキソン1に対する PCR（polymerase chain reaction）のプライマーとして5種のオリゴヌクレオチド（PM 1,2）などを合成した。増幅反応は25ないし30サイクル行ったが、用いたプライマーにより多少の条件の変更を加えた。アニーリング温度は系に存在するプライマーのもつ最低のtmのさらに2℃下に設定した。PM 1とPM 2の比を1.5:50としてPGR増幅を行った。PCR産物についてさらにプライマーPM 6を用いシーケンシング反応を行った。予備的塩基配列解析は蛍光標識ターミネータを用い自動化DNA シーケンサによった。別に、α［^{35}S］- dCTPを用いサンガーの方法で塩基配列を確認した。またあるものについてはさらにallele-specific PCR（以下AS-PCR）を行うことにより同定の確実さを高めた。AS-PCR は本申請者らがすでに報告した方法によった。

〔結果〕

<u>肉眼および顕微鏡観察</u>　あらかじめ内視鏡で確認された5個の腫瘍は手術的に大腸とともに摘出され、口側から順にT 1［盲腸］、T 2［横行結腸］、T 3［下行結腸］、T 4［同左］、T 5［S状結腸］と命名された。それらのサイズは4.0cm×2.3cm［T 1］、5.3×3.5［T 2］、4.0×3.5［T 3］、3.0×4.0［T 4］、3.7×3.5［T 5］であり、組織病理学的にfocal cancerを伴った腺腫（adenoma with sever atypia）［T 1］進行癌（well differentiated adenocarcinoma）［T 2］、focal cancerを伴った腺腫（adenoma with moderate atypia）［T 3］、粘膜内癌（intramucosal cancer）［T 4］、腺腫（adenoma with moderate atypia）［T 5］と

診断された。

塩基配列解析　PCR増幅したDNAについて上記〔材料と方法〕に記した方法を用いて予備的塩基配列解析を行った。その結果、腫瘍T1、T2についてコドン12の第二塩基にG→Aの点突然変異がみつかった。また^{35}S-dCTPを用いた従来の方法（サンガー法）で塩基配列解析を行うことにより、予備的解析の結果が確認された。さらに、この方法により、T3由来のDNA試料に対しコドン13の第二塩基に点突然変異G→Aが見出された。

AS-PCR　コドン12の塩基がGではなくAでありかつそれを3'末端とするプライマー、PM10を合成し、PM2に対して相対的過剰量を用いてPGRを行った。対照には3'末端にG（正常塩基）をも同プライマーを用いた。その結果は、予想されたように、対照プライマーがすべての試料に対してPCRプライマーとして有効であったのに対し、PM10はT1、T2に由来する試料についてのみ有効であった。

〔考察〕

本研究は大腸に同時に多発した腫瘍のすべてがrasの点突然変異をもつとは限らす、また突然変異をもつ場合もそれが個々の腫瘍で同一であるとは限らないことを示した。これは、本症例が家族性大腸ポリポーシスでないことの確認にもなっている。

ある報告によれば、日本人の大腸腺腫の12%、大腸癌の36%にrasの点突然変異が見られる。また、家族性大腸ポリポーシスの場合も腺腫から癌への悪性進行のさいにras突然変異がふえるという報告がある。今回の、家族性大腸ポリポーシスでない患者の場合も癌組織を含む腫瘍の4例のうち3例にrasの点突然変異が見られた。ただし、その部分が腫瘍全体に対して占める体積の僅少さからfocal cancerの部分がDNAの解析に寄与している可能性は少ない。

今回のような研究において、組織の正確な病理診断はとくに重要である。また、腫瘍の悪性進行度との関連においてrasの突然変異を論じるさいに欧米とわが国における早期癌の病理的診断名の微妙な相違にも注意を払う必要がある。例えば、わが国におけるintramucosal carcinomaが欧米ではadenoma with severe dysolasiaと診断されている可能性がある。とくに早期癌、境界領域の癌の検索のさいにはこの点が重要だと考えられる。

大腸癌におけるKi-rasや白血病におけるN-rasの突然変異の研究からも推論されたように、rasの突然変異は腫瘍のイニシエーションそのものよりもむしろその悪性進行の初期段階に関係するもののようである。今回の知見もその推論に矛盾しないと思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は家族性大腸ポリポーシスや癌家系の疑いがまったくない一人の患者に同時期に発生した5つの異所性の大腸腫瘍（盲腸 T2：adenoma with severe atypia、横行結腸 T2：well differentiated adenocarcinoma、下行結腸 T3：adenoma with moderate atypia、下行結腸 T4：粘膜内癌、S状結腸 T5：adenoma with moderate atypia）についてc-Ki-rasの突然変異を検索したところ、T1、T2、T3に異なったコドンに突然変異のあること、T4、T5は突然変異が認められなかったという興味ある事実を観察した。この症例が家族性大腸ポリポーシスでないことの確認と同時に癌化の多様性を同一症例の中にい見い出しうる珍しい症例となった。

審査委員会で申請者より口頭発表された論文内容は次のように審査・評価された。

1．同一患者で同時期に発生した5つの異所性で異なった組織像を示す大腸腫瘍は非常に珍しい症例であり、

これらのc-Ki-rasの突然変異を検討したことは評価される。

2．c-Ki-rasのエキソン1のコドン12、13、62、63に対するPCR（polymerase chain reaction)を行うため数種のプライマーを作製し各腫瘍の複数の切片より抽出したDNAを用い、目的のDNA断片を増幅し、PCR産物についてさらにプライマーPM6を用いシーケンシング反応を行った。そして予備的塩基配列解析を蛍光標識ターミネータを用い自動化DNAシーケンサにより、別に、α［^{35}S］-dCTPを用いたサンガー法で確認している。また、ものによってはallele-specific PCRを実施して同定の精度を高めた。その結果腫瘍T1、T2はコドンの12の第二塩基がG→Aの点突然変異を、腫瘍T3にはコドン13の第二塩基に同様G→Aの点突然変異をおこしていたが、T4、T5には変化がおきていなかったことを明らかにした。

また、審査過程中発表に関連して次の点が質疑・応答された。

1．多発大腸癌について一般的に何個の癌が多いのか。5個の例はまれか。
2．ras遺伝子産物の局所と発癌のメカニズムについて、生化学的にどうなっているか。
3．ras遺伝子以外の癌遺伝について検討としたか
4．腫瘍T4、T5にはras遺伝子の変異がないのにどうした癌化がおきたのか。
5．低分子量G蛋白としてのras蛋白の正常細胞での機能について
6．ras癌遺伝子の種類と癌種との関係について
7．ras遺伝子の生物界での分布は
8．ras蛋白質だけで癌化はおきるか。
9．多重癌や若年癌についてras遺伝子の検索をしたことがあるか

以上の質問に対する申請者のいは概ね適切であり、研究内容も博士（医学）の学位授与に相応しいものと審査委員全員一致で判定した。

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　寺尾俊彦
副査　教授　村上　彰　副査　助教授　寺田　護