【216】

氏　名（本籍）	柏木浩暢（かしわぎひろのぶ）（神奈川県）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博甲第 2656 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	胆道癌の発生と進展に関わる新規がん遺伝子の網羅的解析
主　査	筑波大学教授　医学博士　田中直見
副　査	筑波大学教授　医学博士　赤座英之
副　査	筑波大学助教授　医学博士　有波忠雄
副　査	筑波大学講師　医学博士　岩川真由美

論文の内容の要旨

（目的）

癌細胞における遺伝子の欠損や増幅を見つけ出すことは，癌遺伝子や癌抑制遺伝子を同定する一つの重要な手がかりである。癌化の全体像を知るためには，ゲノムワイドに遺伝子増幅・欠失を網羅的に解析することが必要である。これまでのサザンブロット法やLOH解析のような方法は，通常限られた遺伝子，染色体領域で行われており，ゲノムワイドの網羅的な解析を行うには多大な労力を要した。本研究では胆道癌の発生と進展に関わる新規遺伝子を明らかにすることを目的として，腫瘍に生じた遺伝子の欠失，過剰の有無を全染色体を対象に解析を行った。

（対象と方法）

腫瘤形成型29例，管内発育型8例からなる肝内胆管癌37例の新鮮切除標本及び胆道癌細胞株7株よりDNAを抽出し，遺伝子増幅と欠失の解析の対象とした。従来のCGH法は検出感度や解像度に限界があるため，本研究では，変化を示す染色体領域を絞り込むためのスクリーニング法としてこれを利用し，CGH法で変化を示した領域に相当するsequence tagged site（STS）をゲノムプロジェクトにより作製されたgene mapの中から選び，高感度定量PCR法を用いて癌のゲノム異常の解析を行った。CGH法では，ニックトランスレーションにてFITC標識した腫瘍のDNAとRhodamine標識した正常ヒトDNAをプローブとして，正常ヒトリンパ球由来のメタフェーズに対しハイブリダイゼーションを行った。両者の蛍光強度の比をコンピュータ解析し，全染色体上のDNAコピー数の異常を検出した。正常ヒトDNAに対し，腫瘍DNAのコピー数が増加している領域をgain，コピー数が減少している領域をlossとした。胆道癌のうち胆嚢癌に頻発する染色体17qにおけるDNAコピー数の増加に関わる領域を同定するため，胆道癌細胞株を用いて同領域上にマップされたSTS，expressed sequence tag（EST）または既知遺伝子特異的プライマーを用いた網羅的な定量PCR法を行った。外部標準としてβ-globin遺伝子の定量PCRを同様に行い，蛍光強度から反応液中のサンプルDNA量を算出し，各サンプルDNA量と外部標準DNA量との比を算出した。これらの結果からそれぞれの癌におけるDNAコピー数変化を算出した。

（結果）

腫瘤形成型肝内胆管癌において高頻度に染色体7q21，3q24，8q21，1q43-qterのDNAコピー数増加，1pter-p36，21q13-qter，17pter-p13，22q13-qterのDNAコピー数減少が認められた。また，腫瘤形成型肝内胆管癌における17q13と21q22のコピー数減少はリンパ節転移を有す癌に多く認められた。18p11のコピー数増加は低分化癌に高頻度に認められた。管内発育型肝内胆管癌において，高頻度に8p，8qのとDNAコピー数の増加，及び17qのDNAコピー数減少を認めた。CGH解析の結果，胆道癌細胞株と肝内胆管癌の異常染色体領域のパターンはほぼ一致した。FISH法と定量PCR法を用いて17qにおけるDNAコピー数の遺伝子増幅単位（アンプリコン）のマッピングを行ったところ，*c-erbB-2*遺伝子の領域のほかに，新たに，テロメア側のshgc31983領域に新規アンプリコンがあることが明らかになった。

（考察）

染色体17p13領域には癌抑制遺伝子*p53*が存在するが，腫瘤形成型肝内胆管癌のCGH解析により，同領域にはリンパ節転移に関わる新規の癌関連遺伝子が存在することが示唆された。この遺伝子を同定することで，リンパ節転移の有無の指標となるマーカーが得られる可能性があると考えられる。18p11のコピー数の増加は悪性度の高い低分化癌に多く，同領域に文化度に関わる遺伝子の存在が示唆された。8p，8qのコピー数の増加，17qのコピー数の減少は管内発育型肝内胆管癌の発生・進展に関わる異常と考えられ，同領域の遺伝子を特定することにより，腫瘤形成型管内胆管癌と肉眼的に異なる所見を示す管内発育型肝内胆管癌の癌化のメカニズムの一端が明らかになると思われる。胆道癌細胞株のDNAコピー数の異常部位は蒸気の肝内胆管癌のものとほぼ同様であり，細胞株を用いて胆道癌の発生と進展に関わる遺伝子の道程ができると考えて，定量PCRを用いてどう部位のアンプリコンの詳細な解析を行った。その結果，従来より示唆されていた*c-erbB-2*遺伝子の増幅の他にテロメア側のshgc31983領域にDNAコピー数の増加があり癌化に関わる新たな遺伝子の存在が示唆された。

審査の結果の要旨

胆道癌はアジアで多いにもかかわらず欧米で少ないため分子生物学研究が立ち遅れており，その遺伝子異常についてはまだ報告が少ない。Comparative genomic hybridization（CGH）という比較的新しい方法論を駆使して予後の悪い腫瘤形成型肝内胆管癌に特異的な遺伝子異常，そして腫瘤形成型と管内発育型肝内胆管癌の分子生物学的差異を解析している。さらにはCGH法とSequence tagged site（STS）quantitativePCRを組み合わせた新しい癌関連遺伝子高感度同定法を駆使して胆道癌細胞株の癌化に関与する17番染色体上の新規の増幅単位を明らかにした。今回の解析で明らかになった染色体増幅及び欠失領域の責任遺伝子を同定することに関しては今後のさらなる解析が期待されるが，人体症例を多数集積して胆道癌のゲノム変化の大きな特徴を発見したことや新しい癌関連遺伝子高感度同定法を確立したことは評価される。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。