

氏名(本籍)	よしだ 真夫 (茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第1,728号		
学位授与年月日	平成9年3月24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	Mutation of $p16^{ink4}/CDKN2$ and $p15^{ink4B}/MTS2$ genes in biliary tract cancers (胆道癌における $p16^{ink4}/CDKN2$ および $p15^{ink4B}/MTS2$ 遺伝子の突然変異)		
主査	筑波大学教授	医学博士	野口雅之
副査	筑波大学客員教授	理学博士	石井俊輔
	(理化学研究所)		
副査	筑波大学教授	医学博士	岡戸信男
副査	筑波大学教授	医学博士	田中直見
副査	筑波大学助教授	医学博士	赤座英之

論文の内容の要旨

(目的)

胆道癌は、早期発見がきわめて困難なため、臨床的な診断、治療技術の進歩にもかかわらず、その予後はきわめて不良である。胆道癌の予後改善のためには、診断、治療技術の開発、および、臨床病理学的な特徴の把握、のみならず、その発生や進展のメカニズムに関わる遺伝子の異常を明らかにしていくことが重要である。一方細胞周期の調節に関与する遺伝子群の中でも $p16^{ink4}/CDKN2$ や $p15^{ink4B}/MTS2$ はサイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4) によるRb蛋白質のリン酸化を阻害することでG1からS期において細胞周期の調節に関与しており、これらの遺伝子異常は癌細胞における無制限な増殖機構に関与している可能性が高い。そこで本研究では胆道癌の発生、進展に関する遺伝子変化を明らかにするために、これら二つの遺伝子に注目し、さらに多くの臓器癌において、最も高頻度に異常が報告されている癌抑制遺伝子である $p53$ 遺伝子や、膀胱癌で高頻度にその異常が報告されているがん遺伝子である $k-ras$ 遺伝子とともに、これらの異常を解析した。

(対象と方法)

ヒト胆道癌新鮮標本25例(胆道癌10例、肝門部胆管癌8例、肝内胆管癌3例、中下部胆管癌、乳頭部癌、各2例)および細胞株4株(胆管癌2株、胆嚢癌2株)を用いた。これらの組織や細胞からDNAを抽出し、 $p16^{ink4}/CDKN2$ および $p15^{ink4B}/MTS2$ 遺伝子の欠失をポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法を用いて検索し、欠失の認められなかった症例については、その点突然変異をダイレクトシーケンス法を用いて検索した。 $k-ras$ および $p53$ 遺伝子の点突然変異の検索には、PCR-シングルストランドコンフォメーションポリモルフィズム(SSCP)法とダイレクトシーケンス法を組み合わせ用いた。また $p16^{ink4}/CDKN2$ および $p15^{ink4B}/MTS2$ 遺伝子の近傍のマイクロサテライト $INF\alpha$ と D9S171を用いて、9p21-22領域におけるヘテロ接合性の喪失(loss of heterozygosity, LOH)の検索を行った。

(結果と考察)

$p16^{ink4}/CDKN2$ 遺伝子の点突然変異は胆道癌切除例25例中16例(64%)と効率に認められた。特に胆嚢癌においては10例中8例(80%)と高頻度に点突然変異が検出され、これは食道癌、膀胱癌、脳腫瘍などで報告されて

いる $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子の点突然変異頻度と比較しても、さらに高い頻度であった。また、肝門部胆管癌では8例中5例、肝内胆管癌3例中1例、中下部胆管癌、乳頭部癌、それぞれ2例中1例ずつに点突然変異が検出された。 $p15^{Ink4B}/MTS2$ 遺伝子の点突然変異はすべての症例で検出されず、 $k-ras$, $p53$ 遺伝子の点突然変異はそれぞれ25例中1例ずつしか認められなかったことから、胆道癌の発癌においては $p15^{Ink4B}/MTS2$ および $k-ras$, $p53$ 遺伝子よりも、むしろ $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子の不活化が関与していることが示唆された。今回検出された $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子の点突然変異はすべて片側のアレルのみであったため、突然変異のないアレルの欠失を検索するため、 $INF\alpha$ と D9S171 のローカスでマイクロサテライト LOH の解析を行ったが、コドン66に点突然変異を有する1例で LOH が認められただけだった。この結果は、点突然変異のないアレルでは、メチル化などの別のメカニズムによる遺伝子の不活化機構が存在することを示唆している。一方、胆道癌、胆嚢癌の細胞株を用いた検索では $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子は4株中3株で、 $p15^{Ink4B}/MTS2$ 遺伝子はすべての株で欠失していた。 $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子の欠失していなかった細胞株では、 $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子の点突然変異も検出されないが、 $p53$ 遺伝子の点突然変異が検出され、4株の細胞株すべてにいずれかの遺伝子変異が認められた。

本研究により、胆道癌の発癌増悪に深く関与する癌抑制遺伝子の候補として新たに $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子が提示された。 $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子や $p15^{Ink4B}/MTS2$ 遺伝子は胆道癌ばかりでなく卵巣癌などでも欠失を主とした不活化が報告されており、これらの癌抑制遺伝子の不活化のメカニズムを解析していくことによって、これらの難治性癌における発癌悪性化の分子機構が明らかになると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

$p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子や $p15^{Ink4B}/MTS2$ 遺伝子は細胞周期の制御にかかわる重要な遺伝子としての位置づけのみならず、ヒト癌の癌抑制遺伝子としての評価もされてきている。本論文ではこれらの細胞周期制御遺伝子の異常を、最新の遺伝子異常の解析法を駆使して、早期発見の難しい、かつ悪性度が高く予後の悪い癌である胆道癌において解析した。この結果、特に $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子異常が、解析したほとんどの胆道癌、胆嚢癌の細胞株に、また半分以上のヒト胆道癌症例においても発見された。50%を超える点突然変異の頻度はこの遺伝子異常が胆道癌の発癌悪性化に何らかの役割を果たしていることを予測させる。これらの成果は、 $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子が胆道癌の発癌増悪機構に関わる癌抑制遺伝子の重要な候補の一つであることを示している。今後、胆道癌発癌、悪性化における $p16^{Ink4}/CDKN2$ 遺伝子産物の機能を、蛋白レベルでも研究していくことが望まれる。なおこの研究は1995年の *Cancer Research* 55: 2756-2760に発表されている。

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。