

氏名(本籍)	い <sup>いち</sup> かわ <sup>かわ</sup> よし <sup>よし</sup> ひと <sup>ひと</sup> 市川喜仁(埼玉県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,565 号		
学位授与年月日	平 成 8 年 3 月 25 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	Alteration of Protooncogenes and Tumor Suppressor Genes in Association with Pathogenesis of Human Ovarian Tumors (ヒト卵巣腫瘍における癌原遺伝子と癌抑制遺伝子の変化)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	坂 内 四 郎
副 査	筑波大学客員教授	理学博士	石 井 俊 輔
副 査	筑波大学教授	医学博士	深 尾 立
副 査	筑波大学教授	医学博士	渡 邊 照 男
副 査	筑波大学助教授	理学博士	石 井 哲 郎

## 論 文 の 要 旨

### (目的)

卵巣は人体で最も多彩な組織型の腫瘍が発生する臓器である。そこから発生する卵巣癌は、我が国において発生率、死亡数が増加している代表的な癌の一つであり、生活全体の西欧化とともに女性の癌に占める割合が増しており、欧米の数値に近づいている。また、卵巣癌は進行した状態で発見される例が多いことから、予後改善の点からも有効な診断法の確立が望まれている。しかし、早期診断につながるような卵巣の発癌メカニズムはよくわかっていない。

以上のような背景から卵巣腫瘍が多様な組織型をとる背景にどのような分子レベルでのメカニズムが関与しているか、またそのメカニズムは腫瘍の進展度と関連しているかを解明すべく、本論文では以下の3点に着目し、卵巣腫瘍における癌関連遺伝子(癌原遺伝子、癌抑制遺伝子)の変異について検討した。

- 1) *K-ras* 遺伝子変異が、卵巣の腫瘍化過程のどの段階で認められるか、また発生母地の組織型と関連しているか。
- 2) 疫学研究および実験腫瘍の研究から、卵巣癌の発生、増殖へのゴナドトロピンの関与が示唆されているが、ゴナドトロピンのシグナル伝達系に含まれるゴナドトロピン受容体と、これと共役する3量体型G蛋白質の遺伝子に変異があるか。
- 3) G1/S移行期において細胞周期を負に制御している *p16/CDKN2*, *p15/MTS2* 遺伝子の変異が、卵巣腫瘍においてどのくらいの頻度で、またどのようなメカニズムで腫瘍化に関わっているか、さらに腫瘍の組織型や進展度と関連しているか。

### (対象と方法)

#### 1) *K-ras* 遺伝子変異について

同一組織型で adenoma (良性群), borderline tumor (中間群), carcinoma (悪性群) の検体が入手しやすい漿液性腫瘍47例と粘液性腫瘍57例を対象とした。各サンプルからDNAを抽出後、*K-ras* 遺伝子変異の hot spots である Codon 12, 13, 61を含む Exon 1, 2 の領域をPCRで増幅し、次いでSSCP (Single Strand Conformation

Polymorphism) 法で遺伝子変異を検出した。正常と移動度の異なるバンドを SSCP ゲルから切り出し、再度 PCR で増幅した後、直接シーケンス法で塩基配列を決定した。

### 2) ゴナドトロピン受容体遺伝子 (*LH-R*, *FSH-R*), 3量体型 G 蛋白質遺伝子 (*gsp*, *gip2*) 変異について

原発性の卵巣腫瘍37例 (common epithelial tumor, germ cell tumor, sex cord-stromal tumor を含む) と卵巣癌細胞株 5 例を対象とした。各サンプルから DNA を抽出後、内分泌腫瘍で遺伝子変異が報告されている, *LH-R*, *FSH-R* 第 3 cytoplasmic loop と第 6 transmembrane domain を含む領域, *gsp* の Codon 201, 227 を含む Exon 8, 9 の領域, *gip2* の Codon 179, 205 を含む Exon 5, 6 の領域を PCR で増幅し, SSCP 法で遺伝子変異の有無を調べた後, 直接シーケンス法で上記領域の塩基配列を決定した。

### 3) *p16/CDKN2*, *p15/MTS2* 遺伝子変異について

原発性の卵巣腫瘍49例 (common epithelial tumor, germ cell tumor, sex cord-stromal tumor を含む) と卵巣癌細胞株 6 例を対象とした。各サンプルから DNA を抽出後, *p16/CDKN2* 遺伝子の Exon 1, 2, *p15/MTS2* 遺伝子の Exon 2 を含む領域を PCR で増幅し, 遺伝子欠失の有無を調べた。遺伝子欠失のないサンプルについては, 直接シーケンス法で塩基配列を決定した。更に, *p16/CDKN2*, *p15/MTS2* 遺伝子が位置する染色体 9 P 21 の領域に広範囲の欠失がある可能性を調べるため, 両遺伝子の近傍に位置するマイクロサテライト・マーカー (*IFNA*, *D9S171*) を用いてヘテロ接合性の消失を検討した。

(結果と考察)

#### 1) *K-ras* 遺伝子変異について

検討した104例中16例に *K-ras* 遺伝子変異 (Codon 12の点突然変異) を認め, 全例で第 2 塩基が置換していた。Codon 13, 61の変異は 1 例も認めなかった。漿液性腫瘍47例中 1 例 (2%) に対し, 粘液性腫瘍では57例中15例 (26%) に *K-ras* 遺伝子変異が認められ, 後者で有意に高率であった。また, 粘液性腫瘍では良性の段階 (adenoma) でも30例中 4 例 (13%) に *K-ras* 遺伝子変異が検出された。更に, この 4 例の adenoma は全て腸上皮型の adenoma であり, 粘液性腫瘍において腸上皮型の adenoma の発生に *K-ras* 遺伝子 Codon 12の点突然変異が関与している可能性が示唆された。

#### 2) ゴナドトロピン受容体遺伝子, 3量体型 G 蛋白質遺伝子変異について

*LH-R*, *FSH-R*, *gsp*, *gip2* 遺伝子変異は, 検討した全例で 1 例も検出されなかった。ゴナドトロピン受容体と 3量体型 G 蛋白質を介してシグナル伝達系の遺伝子変異が, 卵巣の腫瘍形式に関与していないことが示唆された。

#### 3) *p16/CDKN2*, *p15/MTS2* 遺伝子変異について

*p16/CDKN2*, *p15/MTS2* 遺伝子変異は, 原発性の卵巣腫瘍で 6 例 (12%) と 5 例 (10%) に, 卵巣癌細胞株で 3 例 (50%) と 2 例 (33%) に認め, 卵巣癌細胞株で原発性腫瘍よりも変異の頻度が高率であった。変異陽性例については, *p16/CDKN2* の点突然変異を 1 例認めた以外, 他は全て遺伝子欠失の症例であり, 両遺伝子変異の主なメカニズムは遺伝子欠失であることが判明した。*IFNA* のヘテロ接合性の消失は20例中 2 例 (10%) に認めたが, *D9S171* のヘテロ接合性の消失は 1 例も認めなかったことより, 染色体 9 P21 上の欠失は *p16/CDKN2*, *p15/MTS2* の領域に限局した現象であることが示唆された。

また, 遺伝子欠失を主とした上記の変異は, 漿液性腫瘍 (12例中 3 例; 25%) と類内膜腫瘍 (9 例中 3 例; 33%) で高率に認められ, 原発性腫瘍の組織型特異的な現象であることが示唆された。*K-ras* 遺伝子変異を高率に認めた粘液性腫瘍では, 両遺伝子の変異は 1 例も検出されなかった。更に, *p16/CDKN2* 遺伝子変異と原発性腫瘍の臨床進行期との関係を調べたところ, 変異陽性例は全て進行癌であり, *p16/CDKN2* 遺伝子変異が腫瘍の進展度と関連した現象であることが示唆された。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、癌関連遺伝子が卵巣腫瘍の組織型、悪性度、臨床上での進行段階との関連でどのように変化しているかを調べたものであり、卵巣腫瘍の多様な発現を分子レベルで解明しようとする研究の一端と位置付けられる。結果として、卵巣腫瘍において adenoma の段階で *K-ras* 遺伝子の変異を初めて見つけ、その組織型の解析から、粘液性の adenoma において *K-ras* 遺伝子変異と腫瘍の組織学的由来が密接に関連していることを明らかにした。また、細胞周期の制御に関わる癌抑制遺伝子の変異が、腫瘍の進展度と関連する可能性を示した。これらの成果は卵巣癌の分子レベルでの理解に資すると共に、癌関連遺伝子について行われている他の多くの研究成果と相まって、卵巣癌の診断、治療に有意義な情報を提供するものである。

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。