



Microsatellite instability in Japanese hereditary non-polyposis colorectal cancer does not induce mutation of a simple repeat sequence of the bax gene

榊原, 孝至

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1968

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001968>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	さかき ぼら たか し 榊 原 孝 至	（大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1212号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成11年3月31日	
学位論文題目	Microsatellite instability in Japanese hereditary non-polyposis colorectal cancer does not induce mutation of a simple repeat sequence of the bax gene （日本人の遺伝性非腺腫性大腸癌における Microsatellite instability は bax 遺伝子の単純な繰り返し配列の突然変異を引き起こさなかった）	
審査委員	主査 教授 松 尾 雅 文 教授 岡 田 正 義 教授 黒 田 嘉 和	

論文内容の要旨

1. 緒言

遺伝性非腺腫性大腸癌（HNPCC）において Microsatellite instability（MI）と呼ばれる特殊な体性の突然変異が報告されている。MI は DNA ミスマッチ修復遺伝子の異常が原因となって起こり、house-keeping 遺伝子や TGF- β （transforming growth factor- β ）type II receptor 遺伝子などの遺伝子内に存在する短い繰り返し配列の異常として検出される。近年、p53を介したアポトーシスを導く癌抑制遺伝子のひとつである bax 遺伝子のエクソン3に存在する8つのG塩基の繰り返し配列の異常が、MI陽性大腸癌の50%以上に起こっていることを Rampino らは報告した。

今回、我々は日本人の HNPCC における bax 遺伝子異常の役割を明らかにするため bax 遺伝子の8つのG塩基の繰り返し配列部位を検索した。その結果 bax 遺伝子のこの繰り返し配列には異常はなかった。このことは、MI陽性であっても日本人の大腸癌の発癌において bax 遺伝子の異常は重要な因子ではないと考えられた。

2. 材料と方法

2.1 DNA サンプルの用意

1981年1月より1997年1月に神戸大学第一外科で手術された601例中、第2回 International Collaborative Group on HNPCC で定義された HNPCC（Amsterdam HNPCC）に合致するものはなかった。一方、日本では、より多くの HNPCC 患者の発見のため HNPCC 臨床診断基準（Japanese HNPCC）が設けられていて、25例は以上これに合致した。そのうち23例はホルマリン固定後のパラフィンブロックが腫瘍及び正常組織とも使用可能であり、HE染色用1枚（5 μ m）とDNA抽出用4枚（7 μ m）の合計5枚の連続パラフィン切片を用意した。腫瘍組織と正常組織を顕鏡後分別し、それぞれからゲノムDNAを、DEXPAT（Takara Shuzo, Japan）を使用して抽出した。

2.2 MI と bax 遺伝子の解析

MIの解析にD2S123, D18S58のCA repeat およびBAT26, BAT40のA repeatの4つのマイクロサテライトマーカーを使用した。これらを蛍光プライマーを使用してPCR増幅した。bax 遺伝子エクソ

ン3の8つのG塩基の繰り返し配列から1塩基のG欠失や挿入を検出するために、この部位を標的とした全長94bpの断片を蛍光プライマーを使用してPCR増幅した。

増幅産物をインターナルサイズマーカーとともに自動DNAシーケンサー（Pharmacia Biotech, Sweden）に充填し、電気泳動の結果はFragment Manager（Pharmacia）で解析し、長さを計算した。腫瘍DNAの増幅パターンが正常DNAのそれとの間に差があるとき、MIと診断した。腫瘍と正常組織のゲノムDNAにおける8つのG塩基の繰り返し配列の数的変化を比べるために、増幅産物を隣接して流した。

3. 結果

601例の大腸癌の中からJapaneseHNPCCに合致したのは25例であり、そのうち23例のMIを解析した。D2S123では12例、D18S58では7例がそれぞれMI陽性であった。BAT26、BAT40ではともに7例でMI陽性を示した。全体では、15例（65.2%）が少なくとも1つのローカスでMI陽性を示した。その中で8例は1つのローカスで残り7例は半数以上のローカスでMI陽性を示した。またMI陽性を示したのは、癌が粘膜下層以上に及んでいるもの（6例）あるいはリンパ節転移または肝臓転移のあるもの（9例）だけであり、上皮内癌は含まれなかった。さらに4つのローカスですべてMIを示したのは、リンパ節転移のある腫瘍だけであり、MIと癌の進展との関係が深いと考えられた。

MI陽性Japanese HNPCCにおいて、bax遺伝子異常の重要性を明らかにするために、エクソン3の8つのG塩基の繰り返し配列の数的異常を解析した。正常DNAサンプルを増幅し自動DNAシーケンサーで解析すると、増幅産物のきれいなピーク見られ、サイズは計算上94.3–94.5bpであり、予想サイズの94bpに近く、この方法は1塩基の差を示すのに十分正確であると考えられた。4つのローカスでMI陽性の症例はbax遺伝子の異常を持つ可能性が一番高いため始めに解析を行うと、正常、腫瘍とも94bpであり8つのG塩基の繰り返し配列に1塩基の欠失や挿入は認められなかった。また、双方のピークの形状は全く酷似しており腫瘍でのモザイクの可能性は低いと考えられた。

MI陽性の他の14例についても腫瘍及び正常組織ともにピークのシフトは認められなかった。なおMI陰性腫瘍もbax遺伝子の検索を行ったが異常は見られなかった。以上より、MI陽性のJapanese HNPCC患者の発癌においてbax遺伝子の8つのG塩基の繰り返し配列部位の異常は主要な因子ではないと思われた。

4. 考察

この研究では、23例のJapanese HNPCC症例についてMIを解析した。15例（65.2%）で4つのマイクロサテライトマーカーの内少なくとも1つのローカスでMIを認めた。Amsterdam HNPCCの腫瘍組織では90%近くMIを認めるが、非家族性大腸癌ではわずか10–16%にMIが認められるに過ぎないとされている。我々の研究ではMIの割合（35%）は、過去に報告されているものより高率で、Amsterdam HNPCCにおけるMIの割合により近いものであった。

Amsterdam HNPCCにおいてはhMSH2、hMLH1、PMS2などのDNAミスマッチ修復遺伝子の異常が同定され、その異常は、癌の発癌過程や進展に関係していると考えられている。突然変異の指標となるhprtを指標に計算した結果では、突然変異率はHNPCCでは他の癌より100倍高いので、これらの腫瘍における不安定性はマイクロサテライト部位以外にも広がっていると思われる。またゲノム不安定性が癌遺伝子や癌抑制遺伝子を異常にするという新しいメカニズムも提唱されている。実際、TGF- β type II receptor遺伝子における短い繰り返し配列のフレームシフト突然変異がMI陽性の大腸癌の数パーセントに報告されている。

特にMIが直接癌抑制遺伝子の突然変異を引き起こすことは、MI陽性大腸癌の50%以上に（41例

中21例) bax 遺伝子の8つのG塩基の繰り返し配列の異常を認めたという報告より予想できる。このため我々はMI陽性日本人の大腸癌におけるbax遺伝子の異常を解析した。しかし我々の研究において、15例のMI陽性Japanese HNPCCにその異常は認められなかった。bax遺伝子に関してMI陽性Japanese HNPCCと西洋のHNPCCとは異なった分子の特長を持つと我々のデータは示唆している。日本人患者で診断されたHNPCCで1人もAmsterdam HNPCCに合致していなかったため遺伝的、臨床的に明らかに病気の違いがあるのかもしれない。実際、ヨーロッパのHNPCCの家系でもAmsterdam HNPCCに含まなければAmsterdam HNPCCに比べてDNAミスマッチ修復遺伝子の突然変異が極端に低いということが最近報告されている。このことは家族性大腸癌の発癌の多様性を示唆している。MI陽性Japanese HNPCCにおける発癌の分子メカニズムを明らかにするためにより一層の研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

遺伝性非腺腫性大腸(癌 Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC))では、DNAミスマッチ修復遺伝子の異常のためMicrosatellite instability (MI)が認められる。最近、がん抑制遺伝子のひとつであるbax遺伝子のエクソン3に存在するG塩基の8回の繰り返し配列に異常があることが、MI陽性大腸癌の50%以上に起こっていることが報告され、がん抑制遺伝子の異常と発がんを関連づけるものとして注目されている。

研究者は、日本人のHNPCCにおけるbax遺伝子異常の役割を明らかにするためbax遺伝子のG塩基の8回の繰り返し配列部位を検索した。

対象は、1981年1月より1997年1月に神戸大学第一外科で手術された601例中、日本のHNPCCの診断基準に合致する25例である。そのうち、ホルマリン固定後のパラフィンブロックが腫瘍組織と正常組織に分別でき、それぞれからゲノムDNAの抽出の可能であった23例についてMIとbax遺伝子のG塩基の8回繰り返しを解析した。

MIは、D2S123, D18S58のCA repeatおよびBAT26, BAT40のA repeatの4つのマイクロサテライトを蛍光プライマーを使用してPCR増幅し、解析した。23例中D2S123では12例、D18S58では7例がそれぞれMI陽性であった。BAT26, BAT40ではともに7例でMI陽性を示した。全体では、15例(65.2%)が少なくとも1つのローカスでMI陽性を示した。MI陽性者中8例は1つのローカスで、また、7例は半数以上のローカスでMI陽性を示した。またMI陽性を示したのは、がんが粘膜下層以上に及んでいたもの6例とリンパ節転移または肝臓転移のあったもの9例で、上皮内がんにはMI陽性例はなかった。さらに4つのローカスですべてMIを示したのは、リンパ節転移のある腫瘍だけであり、MIとがんの進展との関係が深いと考えられた。

MI陽性Japanese HNPCCにおいて、bax遺伝子異常の有無を明らかにするために、検索した4つのローカスですべてがMI陽性の症例についてbax遺伝子の異常を解析した。bax遺伝子エクソン3のG塩基の8回の繰り返し配列で1塩基のG欠失や挿入を検出するために、この部位を標的とした全長94bpの断片を蛍光プライマーを使用してPCR増幅し、自動塩基配列解析装置を用いてそのサイズを測定した。正常、腫瘍とも94bpでありG塩基の8回繰り返し配列に1塩基の欠失や挿入は認められなかった。

さらに、MIの陽性であった他の14例についても繰り返して配列に異常は検出されなかった。以上より、MI陽性のJapanese HNPCC患者においては、bax遺伝子の8つのG塩基の繰り返し配列の異常

は主要な発がん因子ではないと考えられた。

この結果は、がん抑制遺伝子の bax 遺伝子の異常と発がんに関して、MI 陽性でも日本の HNPCC と西洋の HNPCC とは異なった分子的特徴を持つことを示唆した。

本研究は、遺伝性非腺腫性大腸がん（HNPCC）について、その癌抑制遺伝の異常を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった bax 遺伝子の異常について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。