

氏名・(本籍)	小玉 浩弥 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1013 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	GENETIC AND MOLECULAR ANALYSES OF P53 IN A JAPANESE FAMILY WITH LI-FRAUMENI SYNDROME (リ・フラウメニ症候群を呈した日本人 1 家系の P53 分子の遺伝的および分子学的解析)
論文審査委員	(主査) 高橋 直人 教授 (副査) 柴田 浩行 教授 廣川 誠 教授

学 位 論 文 内 容 要 旨

GENETIC AND MOLECULAR ANALYSES OF P53 IN A JAPANESE FAMILY WITH LI-FRAUMENI SYNDROME

(リ・フラウメニ症候群を呈した日本人 1 家系の P53 分子の遺伝的および
分子学的解析)

申請者氏名 小玉 浩弥

研 究 目 的

リ・フラウメニ症候群 (Li-Fraumeni syndrome、以下 LFS) は若年時より骨・軟部腫瘍を主とする多彩な悪性腫瘍を形成しやすい常染色体性優性遺伝を示す遺伝性腫瘍素因症候群、いわゆる cancer predisposition syndrome のひとつである。LFS はその多くががん抑制遺伝子である P53 遺伝子の変異を持っていることが明らかとなっており、発がんメカニズムの研究において変異 P53 遺伝子の機能解析は重要な意味を持つ。

今回、横紋筋肉腫を発症した 2 歳児を契機に母方家系に若年性悪性腫瘍の存在が明らかとなり、古典的 LFS 基準を満たしていた。発端患者および母親の生殖細胞系列に同じ P53 遺伝子変異が確認され、この変異部位は LFS の原因として過去未報告のものであった。そこでこの変異遺伝子を COS-7 細胞に導入し、そこに生じる変化を解析してこの遺伝子変異がもたらす特徴を検討した。

研 究 方 法

発端者は 2 歳男児で、右胸壁に生じた皮下腫瘍の精査により退形成成分を伴う紡錘細胞型横紋筋肉腫と診断された。母親は 11 歳時に左上肢に骨肉腫を発症したが治療により寛解し、30 歳で発端者を出産した。また母方祖父は 12 歳時に左下肢に骨肉腫を発症したが寛解した。3 世代にわたる若年性悪性腫瘍が認められ古典的 LFS の診断基準を満たしており、発端者とその両親の 3 人の生殖細胞系列の網羅的遺伝子検索を両親からの同意のもとに実施した。その結果、発端者と母親に後述するような P53 遺伝子の変異が確認された。なおそれぞれの転帰は、発端者は各種集学的治療の甲斐なく発症から 43 週で腫瘍死し、それから間もなくして母親に初めての癌腫 (肺腺がん) が出現し治療中である。母方祖父は異なるタイプの胃がん (腺

がん、印環細胞がん) を発症し 42 歳で腫瘍死している。

ここで認められた変異は LFS の原因として未報告のもので、P53 が機能する上で重要な四量体形成に関連する部位に存在する変異であり、生体上で何らかの影響を及ぼすことが考えられた。その臨床的意義を検討するために COS-7 細胞に変異型 P53 を強制発現させ、野生型 P53 遺伝子を導入した COS-7 細胞と以下の点について比較観察を行った。

- 1、細胞内の局在性を蛍光顕微鏡下で観察
- 2、細胞溶解液を immunoblotting 法で展開し比較

研 究 成 績

発端者および両親から得た末梢血白血球より得たゲノム DNA を次世代シーケンサーにより網羅的に解析し P53 遺伝子の変異を認めた。サンガー法によるダイレクトシーケンスの結果、P53 遺伝子のエクソン 10 において c. 997delC が発端者と母親において認められた。これによりコドン 333 でフレームシフトが生じ、その後終了コドンが生じることが判明した (p. R333Vfs*12)。

今回の変異 P53 遺伝子と野生型 P53 遺伝子の局在性を蛍光顕微鏡で観察すると両者においては違いが無く、核内に同様に局在していた。これらから得た細胞溶解液を immunoblotting 法で展開すると、変異 P53 遺伝子において野生型にみられるバンドは消失し、それよりも分子量の小さい蛋白のバンドが複数認められた。

結 論

3 世代にわたる若年性悪性腫瘍が確認された LFS 家系において、P53 遺伝子に c. 997delC (p. R333Vfs*12) という新しい変異が発見された。P53 の四量体形成に影響を及ぼすと考えられ、野生型との比較から細胞内での局在性は変わらないものの、蛋白としての不安定性の存在が考えられ、そのため P53 本来の機能を発揮できず発がんに繋がり得るものと推測された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：高橋 直人

申請者：小玉 浩弥

論文題名：Genetic and molecular analyses of P53 in a Japanese family with Li-Fraumeni syndrome
(リ・フラウメニ症候群を呈した日本人1家系のP53分子の遺伝的および分子学的解析)

要旨

著者の研究は論文内容要旨に示すように、3世代にわたり若年性悪性腫瘍を認め古典的Li-Fraumeni syndrome (LFS)と診断された発端者とその両親の3人の生殖細胞系列の網羅的遺伝子検索を次世代シーケンスにより行い、発端者と母親にLFSの原因としては未報告のP53遺伝子のエクソン10においてc.997delC変異を認め、その結果コドン333でフレームシフトが生じ終止コドンとなる(p.R333Vfs*12)ことを報告した。この変異P53遺伝子をCOS-7に導入し翻訳されるP53タンパクを蛍光顕微鏡で観察したところ、野生型P53タンパクと変異P53遺伝子との間に局在性には違いがなく同様に核内に存在するものの、immunoblotting法で展開すると変異P53タンパクは野生型P53タンパクよりも分子量が小さいバンドとして認められた。これは変異P53タンパク(p.R333Vfs*12)では4量体形成に影響を及ぼしタンパクの不安定性を示していると考えられた。この結果がん抑制としてのP53タンパクの機能が低下し発がんにつながると推測している。

1) 斬新さ

臨床的にLFSと診断された家系において古典的サンガー法によるダイレクトシーケンスで遺伝子異常を検出されないことがあるが、本研究では次世代シーケンスにより発端者とその両親の生殖細胞系列の網羅的に遺伝子検索を行い、LFSに未報告のP53遺伝子変異(c.997delC変異)を初めて見出したことにある。

2) 重要性

P53遺伝子変異(c.997delC変異)により変異P53タンパク(p.R333Vfs*12)が生じることを明らかにし、P53の4量体形成に影響するためタンパクとしての不安定性を示した。LFSの新たなP53遺伝子変異のタンパク機能不全のメカニズムを明らかにしたことは、P53異常を示す他の腫瘍の発がんメカニズムを検討するためにも重要であると考えられる。また、若年または成人発症のがん患者において、明らかな遺伝素因がなくても個発性に同様のP53異常を示す可能性があり、がんの予防を考える上でも重要である。

3) 研究方法の正確性

3世代にわたる若年性悪性腫瘍の家系の臨床的探索と生殖細胞系列の遺伝子検索に関しては倫理委員会の承認を得たのち、両親の同意を得て実施されている。次世代シーケンス法による全エクソン解析はIllumina MiSeq platformにて行われている。変異P53遺伝子および野生型P53遺伝子をCOS-7細胞に導入し、P53タンパクの局在診断とimmunoblottingによる検討を行い、いずれも客観的な評価方法で正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

3世代にわたり若年性悪性腫瘍を認め古典的LFSと診断された患者の生殖細胞系列の網羅的遺伝子検索とそこからスクリーニングで明らかにされたP53遺伝子変異とその機能異常のメカニズムを確定するための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。