<短 報>

日本の HBs 抗原陽性肝癌における p53 遺伝子 hotspot の解析

金井 信行¹⁾ 須貝 吉樹²⁾ 赤羽 賢浩³⁾ 岡本 宏明⁴⁾

癌抑制遺伝子 p53 はその異常が種々の臓器の悪性腫瘍で高率にみついている。最近アフラトキシン B₁ と HBV (B 型肝炎ウイルス) が肝癌の危険因子となっている地域である中国の江蘇省啓東地方¹⁾ ならびに南アフリカ²⁾ における肝癌症例を対象として p53 遺伝子の解析が行われ、高率にコドン249の第3文字に点突然変異が認められ、しかもそのほとんどは AGG → AGT (Arg → Ser) への変異であることから、肝癌での p53 変異の hotspot であるとして注目されている。今回我々は日本の HBsAg 陽性肝癌症例についてこの hotspot の変異が認められるかどうかについて解析したので報告する。

対象および方法: HBsAg 陽性の肝細胞癌20検体について検討した。内訳は手術標本4検体、剖検組織12検体およびヌードマウス移植肝癌株^{3,4)} 4株 (Table) である。対照として HBsAg 陰性肝癌3検体、肝芽細胞腫1検体を用い、また陽性コントロール²⁾ として PLC/PRF/5⁵⁾ を用いた。PCR (polymerase chain reaction) は組織より抽出した0.2~1μg の DNA を鋳型とし、Hsu ら¹⁾ の oligonucleotide primer を用いて Saiki ら⁶⁾ の方法によりおこなった。コドン249での変異の有無を簡便に調べるため、得られた2nd PCR 産物を精製後、制限酵素 *Hae* III による消化²⁾ をおこなった。塩基配列の決定には1st PCR 産物を精製後、M13 mp18 ファージベクターの *Hinc* II site に挿入、各4~12クローンに付き Sanger 法 (dideoxychain termination method)⁷⁾ にておこなった。

結果: *Hae* III 消化では HBsAg 陽性肝癌20検体中1検体のみ (Case 12) に154bp, 92bp, 62bp の3つのバンドがみられ、*Hae* III site の消失している DNA (変異型) と消失していない DNA (野生型) の2種類があることが示された。この検体は塩基配列の決定では12クローンの内3クローンにコドン249に AGG →

Fig. Agarose gel electrophoresis of *Hae* III digestion of p53-exon7 PCR products. *Hae* III digestion of PCR-amplified DNA yielded 92-bp and 62-bp fragments in all cases except for case 12 (Lane 2) and PLC/PRF/5 (Lane 8). The enzyme digestion in case 12 yielded 154-bp, 92-bp and 62-bp fragments, indicating the existence of hotspot mutation in heterozygote (Lane 2), and that in PLC/PRF/5 yielded only 154-bp fragment (Lane 8). Lane M: 123-bp ladder size marker, Lane 1: Case 11, Lane 2: Case 12, Lane 3: Case 21, Lane 4: Case 22, Lane 5: Case 23, Lane 6: Case 24, Lane 7: Case 25, Lane 8: PLC/PRF/5.

AGT (Arg → Ser) への点突然変異がみとめられ、heterozygote として hotspot の変異があることが推測された。この症例のリンパ球にはコドン249での変異は認められなかった。PLC/PRF/5 には154bp (変異型) のバンドのみが認められた。その他の HBsAg 陽性肝癌19検体ならびに対照として用いた HBsAg 陰性肝癌、肝芽細胞腫にはコドン249の変異は認められなかった (Fig)。塩基配列の決定では HBsAg 陽性肝癌1検体 (KT740) はクローンすべてにコドン239での AAC → AAA (Asn → Lys) への点突然変異が認められた。その他に塩基配列の決定をおこなった HBsAg 陽性肝癌5検体、陰性3検体、肝芽細胞腫1検体には p53 exon7 (コドン225~261) の領域には点突然変異、欠失、挿入は認められなかった。

考案: 前述の中国¹⁾、南アフリカ²⁾ の報告の後、東南アジアおよびオーストラリアでの肝癌例の *Hae* III 消化の解析⁸⁾ では HBV 陽性8例、陰性8例すべてにコドン249の変異は認められないと報告された。さらに Hosono ら⁹⁾ は台湾の10例の肝癌の p53 exon5~8 に変

1) 自治医科大学病理

2) いわき市立総合磐城共立病院内科

3) 山梨医科大学第1内科

4) 自治医科大学予防生態

<受付日1992年1月28日>

Table Analyzed samples of HBsAg-positive hepatocellular carcinoma.

Case No.	Resource	Age	Sex	Edmondson classification	Cirrhosis	Hotspot mutation
10	operation	37	F	II	—	—*
11	operation	57	M	II	—	—*
24	operation	47	M	II-III	+	—
25	operation	43	F	II	—	—
12	autopsy	27	M	II	—	+***
13	autopsy	56	F	I	+	—
14	autopsy	59	M	II	+	—
15	autopsy	45	M	II-III	+	—
16	autopsy	43	M	III	+	—
17	autopsy	58	M	II	—	—
18	autopsy	66	M	II	+	—
19	autopsy	53	M	III	—	—
20	autopsy	50	M	II	+	—
21	autopsy	72	M	II	+	—
22	autopsy	73	M	II	+	—
23	autopsy	54	M	III	+	—
PLC/342 ^{*)}	nude mouse	65	M	II	+	—*
KT495 ^{*)}	nude mouse	53	M	III	—	—*
KT740 ^{*)}	nude mouse	47	M	I-II	NP	—****
KT778 ^{*)}	nude mouse	39	M	NP	—	—*

* : Sample sequenced for p53 exon 7 (Codons 225-261)

** : AGG → AGG/AGT mutation at codon 249

*** : AAC → AAA mutation at codon 239

NP : not prescribed

異はなかったと報告している。HBsAgが陽性か否かについて明示されていないが、日本ではMurakamiら¹⁰⁾が43例の肝癌のp53 exon2～11について解析し、点突然変異を6例に、欠失を2例に認めているが、このコドン249には変異はなかったとしている。以上よりこのhotspotの変異は中国やアフリカでのみ認められ、HBVよりはアフラトキシンB₁の影響による可能性が高いと考えられている^{8,10)}。今回の解析では1検体ではあるがheterozygoteにこのhotspotにおける変異、すなわちコドン249でのAGG → AGT (Arg → Ser)への変異が認められた。この症例は福島県在住の27歳男性であり、アフラトキシンB₁の関与は考えられなかった。我が国でもこのコドン249に変異がみられる

症例がまれではあるが認められたことよりこのhotspotの変異がアフラトキシンB₁の関与していない症例でもおこりうる可能性が示された。

索引用語：肝癌，HBV，p53

文 献：1) Hsu IC, et al: Nature 350: 427—428, 1991 2) Bressac B, et al: Nature 350: 429—431, 1991 3) Matsui T, et al: Gastroenterology 90: 135—142, 1986 4) Miyaki M, et al: J Gen Virol 67: 1449—1454, 1986 5) Alexander JJ, et al: S Afr Med J 50: 2124—2128, 1976 6) Saiki RK, et al: Science 239: 487—491, 1988 7) Sanger F, et al: Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463—5467, 1977 8) Hayward KN, et al: Nature 352: 764, 1991 9) Hosono S, et al: Oncogene 6: 237—243, 1991 10) Murakami Y, et al: Cancer Res 51: 5520—5525, 1991

Analysis of the p53 hotspot mutation in Japanese patients with HBsAg positive hepatocellular carcinoma

Nobuyuki KANAI¹⁾, Yoshiki SUGAI²⁾, Yoshihiro AKAHANE³⁾ and Hiroaki OKAMOTO⁴⁾

¹⁾ Department of Pathology, Jichi Medical School (Tochigi)

²⁾ Department of Internal Medicine, Iwaki Kyoritsu General Hospital (Fukushima)

³⁾ The First Department of Internal Medicine, Yamanashi Medical College (Yamanashi)

⁴⁾ Immunology Division, Jichi Medical School (Tochigi)