

牛白血病におけるp53遺伝子変異の解析

熊谷 光

宮城県塩釜保健所黒川支所

I. はじめに

と畜検査で全部廃棄対象となる腫瘍病変の中で、牛白血病は発見される頻度が高い疾病である。地方病性牛白血病については、牛白血病ウイルス（以下、BLV）遺伝子やBLV抗体の検出が診断に有効であるが、BLV感染に由来しない牛白血病も存在するため、確定診断には病理組織学的検査を行う。しかしながら、この検査は腫瘍細胞や組織の特徴を熟知する必要があるため、経験が浅いと畜検査員にとっては判断が難しい。そのため、比較的判別しやすい検査方法が望まれる。

医学領域においては多くの腫瘍について、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の解析が行われ、遺伝子突然変異の結果を基にした腫瘍の悪性度診断も研究されている¹⁾。なかでも、がん抑制遺伝子のp53遺伝子については、多くの腫瘍で突然変異が起きていることが確認されており^{2,3)}、ゲノム解析を含めて数多くの研究が報告され全世界的にデータベース化されている^{4~8)}。

p53遺伝子のゲノム解析は多くの動物種においても行われ、哺乳動物はヒトと相同性が高いことが知られている^{9,10)}。そのため、医学領域の手法を応用し、遺伝子学的に牛白血病を診断できることも期待される。しかしながら、哺乳動物におけるp53遺伝子を解析した報告は少ないため、基礎となるデータを蓄積する必要がある。このようなことから、過去に発見された牛白血病のp53遺伝子を解析し、その傾向を確認した。

II. 方法

宮城県食肉衛生検査所で平成9年から25年に発見された、10症例の牛白血病のホルマリン固定・パラフィン包埋（以下、FFPE）組織切片を解析対象とした（表1）。FFPE組織のDNAは断片化していることが多く、p53遺伝子の全領域解析は困難なため、解析領域はヒトの事例を参考にして検討した。

表1 被検対象

サンプルNo.	症例No.	とちく (FFPE作成) 年月日	品種	性別	年齢 または 月齢
BL2	1358	H9.10.20	黒毛和種	♀	4才
BL3	1395	H10.3.4	黒毛和種	♀	102ヶ月
BL4	1423	H10.7.10	ホルスタイン	♀	不明(成畜)
BL5	1431	H10.9.1	黒毛和種	♀	9才
BL6	1438	H10.10.12	ホルスタイン	♀	2才
BL7	1647	H15.6.25	F1	去勢	26ヶ月
BL8	19-005	H19.6.19	ホルスタイン	♀	112ヶ月
BL9	24-002	H24.5.8	黒毛和種	♀	119ヶ月
BL10	24-035	H24.12.17	黒毛和種	♀	4才
BL11	25-003	H25.5.17	黒毛和種	♀	31ヶ月

ヒトp53遺伝子突然変異はDNA結合ドメイン（以下、DBD）に集中し、なかでも特に変異発生頻度の高いアミノ酸部位6カ所（以下、ホットスポット）が存在する^{4,8,11)}（図1）。牛p53遺伝子のDBDはヒトとの相同性が高く、ホットスポットも同様のアミノ酸からなることが報告されている^{12~14)}。これらのことから、今回の研究ではヒトのホットスポットに該当する領域、即ちexon 5 のコドン167（以下、R167）、exon 7 のコドン241（以下、R241）、exon 8

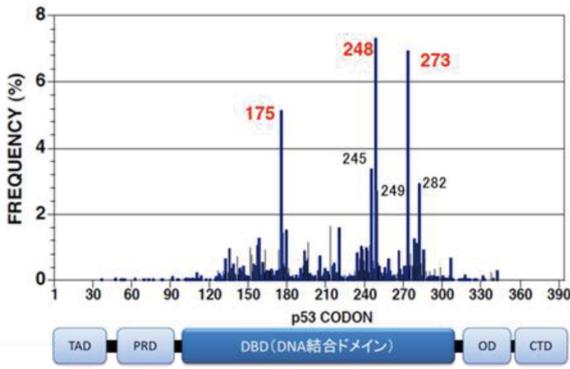


図1 ヒトのがんにおけるp53遺伝子のコドン別変異発生率。数字は6つのホットスポットを示す (<http://p53.free.fr/>より引用、一部加筆)。

対象領域	プライマー	増幅産物
R167	FORWARD: 5'-CATGGCCATCTACAAGAA-3' REVERSE: 5'-CATCGCTATAGTCAGAGGA-3'	86bp
R241	FORWARD: 5'-TTCATGTGTAAACAGCTCCT-3' REVERSE: 5'-AGGGTGGTGTGTGGTCCCTAC-3'	96bp
R266	FORWARD: 5'-CTGCTGGGACGGAAC-3' REVERSE: 5'-TGCGAAGATTTTCTCCT-3'	82bp

(PCR反応条件)			
熱変性	95°C 30秒	30サイクル	
↓	熱変性		95°C 10秒
↓	アニーリング		R167 56°C 30秒
			R241 59°C 30秒
			R266 57°C 30秒
			伸展 72°C 30秒
↓	伸展	72°C 10分	

図2 牛p53遺伝子解析のPCR条件

のコドン266 (以下、R266) の各周辺領域を解析対象とした。

各FFPE組織は壊死の少ない組織を用い、ミクロトームで6~10μmに薄切した後、なるべく腫瘍組織のみとなるよう25~100mm²の大きさにトリミングした。これらをキシレン、エタノールによる脱パラフィン操作後、DNeasy[®] Blood&Tissue Kit (キアゲン社) を用いてDNAを抽出した。DNA溶液はエタノール沈殿で10倍に濃縮し、これを鋳型に図2に示すPCR法を新たに設計し、R167、R241、R266の各領域を特異的に増幅した。PCR産物をアガロースゲルで電気泳動し、特異的な増幅産物のバンドを確認した。増幅産物をMinElute[™] Gel Extraction Kit (キアゲン社) で精製した後、プラスミドベクターにTAライゲーションクローンを作成した (TOPO TA Cloning[®] KIT、並びに、One SHOT[®] TOP10、いずれもライフテクノロジー社)。このクローンをローリングサイクル型増幅法 (TempliPhi DNA Amplification KIT、GEヘルスケア社) で増幅し、ダイターミネーター法によるサイクルシーケンシング反応 (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing KIT、ライフテクノロジー社)、ゲル濾過 (SephadexG-50、GEヘルスケア社) を実施した後、シーケンサー (Applied Biosystems 3500 ジェネティックアナライザ、ライフテクノロジー社) により塩基配列を決定した。得られた結果を、BLAST解析により既知の牛野生型p53遺伝子と比較し、突然変異の有無や、変異の詳細を確認した。

III. 結果

変異は10検体中4検体、30領域中6ヶ所で確認された。変異の内訳は5ヶ所が1塩基置換によるアミノ酸配列変異 (以下、ミスセンス変異)、1ヶ所がアミノ酸配列変異を伴わない、サイレント変異であった。ヒトのホットスポットに該当するコドンでの変異は、コドン167、238、275の3ヶ所で認められた (表2、3)。

表2 牛白血病p53遺伝子突然変異の有無

サンプルNo.	領域		
	R167	R241	R266
BL2	-	+	-
BL3	-	-	NT
BL4	-	-	NT
BL5	+	+	-
BL6	-	+	-
BL7	-	NT	-
BL8	-	-	-
BL9	-	-	-
BL10	-	-	-
BL11	NT	-	+

NT:PCRによる増幅を認めず

表3 突然変異の詳細

サンプルNo.	変異			
	コドン	ヌクレオチド	アミノ酸変異	ヒトの対応コドン
BL2	238	GGC → GAC	Gly → Asp	245
BL5	167	CGT → CAT	Arg → His	175
	253	AGA → AAA	Arg → Lys	260
BL6	249	ACA → GCA	Thr → Ala	256
BL11	263	TTT → TTC	Silent	270
	275	CGC → CAC	Arg → His	282

IV. 考 察

過去に牛白血病のp53遺伝子変異を調査した報告では、変異割合は約50%であり、ヒトのホットスポットであるコドン248に該当する、コドン241で高頻度に変異が確認されている^{14~17)}。今回の研究では変異発生率は40%で、コドン241の変異は確認されなかったがコドン167、238、275と他のホットスポットに該当するコドンで変異が観察されており、過去の報告と同様の結果と考えられた。また、ヒトの腫瘍ではp53遺伝子変異の75%以上がミスセンス変異であり、このことがp53変異の特徴といわれている¹⁸⁾。今回の研究では、ミスセンス変異は83.3%と高い割合で認められ、ヒトと同様であった。以上のことから、牛白血病におけるp53遺伝子突然変異の検査に、ヒトの方法を応用可能であることが示唆された。

FFPE組織は主に組織学的検査で使用されるものであるが、GoelzらによってDNAを抽出できることが報告され¹⁹⁾、近年は分子生物学研究のサンプルとしても利用されている。ただし、FFPE組織から抽出されたDNAは、ホルマリン固定により断片化されていることが多く、PCRを行う場合は増幅産物のサイズを100~200bp程度に設定することが推奨されている²⁰⁾。このため、今回の研究では増幅産物が100bp弱となるようPCR条件を新たに設計したが、特異的増幅産物が認められない検体が10検体30領域中、4検体4領域と高率で認められた。増幅産物が認められない領域に偏りはなく、また、検体保存年限とも関係性が認められなかったことから、この原因としてはFFPE組織切片を作成する際、既にDNAが断片化したためと推察された。

稿を終えるにあたり、本研究のご指導をいただきました、石巻専修大学理工学部の阿部知顕教授、柴田清孝教授、並びに、同大学の諸兄に深謝いたします。

引用文献

- 1) Yamasaki M, Takeshima Y, Fujii S, et al. (2000) Correlation between genetic alterations and histopathological subtypes in bronchiolo-alveolar carcinoma and atypical adenomatous hyperplasia of the lung, *Pathol Int*, 50, 778-785
- 2) Bérout C, Soussi T (2003) The UMD-p53 database : new mutations and analysis tool, *Hum Mutat*, 21(3), 176-181
- 3) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. (1991) p53 mutations in human cancers, *Science*, Vol.253 no.5015, 49-53
- 4) 石岡 千加史 (2004) p53とヒトのがん, *加齢研誌*, 56(1), 1-34
- 5) Leroy B, Fournier JL, Ishioka C, et al. (2013) The TP53 website : an integrative resource center for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis, *Nucleic Acids Research*, Vol.41, 962-969
- 6) Olivier M, Eeles R, Hollstein M, et al. (2002) The IARC TP53 database : new online mutation analysis and recommendations to users, *Hum Mutat*, 19, 607-614
- 7) Soussi T, Dehouche K, Bérout C (2000) p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer : forging a link between epidemiology and carcinogenesis, *Hum Mutat*, 15(1), 105-113
- 8) Freed-Pastor WA, Prives C (2012) Mutant p53 : one name, many proteins, *Genes Dev*, 26, 1268-1286
- 9) Soussi T, Caron FC, May P (1990) Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution, *Oncogene*, 5, 945-952
- 10) Soussi T, Caron FC, May P (1990) Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution, *Oncogene*, 5, 945-952
- 11) Ko LJ, Prives C (1996) Puzzle and paradigm, *Gene Dev*, 10, 1054-1072
- 12) Childers CP, Reese JT, Sundaram JP (2011) Bovine genome database : integrated tools for genome annotation and discovery, *Nucleic Acids*, 39, 830-834
- 13) Reese JT, Childers CP, Sundaram JP (2010) Bovine genome database : supporting community annotation and analysis of the *Bos taurus* genome, *BMC Genomics*, 11, 645
- 14) 田島 茂, 間 陽子 (1999) 牛白血病ウイルス誘発性Bリンパ腫におけるウシp53遺伝子の変異, *J Anim Genet*, 27(2), 45-54
- 15) Dequiedt F, Kettmann R, Burny A, et al. (1995) Mutations in the p53 tumor-suppressor gene are frequently associated with bovine leukemia virus- induced leukemogenesis in cattle but not in sheep, *Virology*, 209(2), 676-683
- 16) Ishiguro N, Furuoka H, Matsui T, et al. (1997) p53 mutation as a potential cellular factor or tumor development in enzootic bovine leucosis, *Vet Immunol Immunopathol*, 55(4), 351-358
- 17) Tajima S, Zhuang WZ, Kato MV, et al. (1998) Function and conformation of wide-type p53 protein are influenced by mutations in bovine leukemia virus-induced B-Cell

- lymphosarcoma, Virology, 243, 235-246
- 18) Kato S, Han SY, Liu W, et al. (2003) Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis, Proc Natl Acad Sci USA, 100, 8424-8429
- 19) Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B (1985) Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue, Biochem Biophys Res Commun, 130(1), 118-126
- 20) 大藤 道衛 編 (2008) バイオ実験誰もがつまづく失敗&ナットク解決法, 羊土社, 117-118

平成27年度 小動物臨床講習会

日 時：平成28年1月17日（日）14時00分～17時00分

場 所：仙台市シルバーセンター（第2研修室）

演 題：「敗血症の診断・治療」

講 師：村田佳輝 先生（むらた動物病院長）

主 催：公益社団法人 宮城県獣医師会