

## 病理領域における新しい解析方法の導入

## 包埋材料からの遺伝子診断

## —主として腫瘍診断への貢献—

香川医科大学 病理学

オオ モリ マサ キ  
大 森 正 樹

(受付 平成8年3月2日)

**Molecular Detection of Genetic Alterations from Paraffin-Embedded  
Pathology Specimens: An Application in Diagnostic  
Pathology of Neoplastic Diseases****Masaki OHMORI**

Department of Pathology, Kagawa Medical School

Recent advances in research on neoplastic diseases particularly as they relate to the pathogenesis of human neoplasm demonstrated that neoplasms are diseases of the genetic alterations.

The neoplastic phenotype arises from a single cell of origin as a result of the accumulation of genetic mutations in two classes of cellular genes, proto-oncogenes and tumor suppressor genes, and other genes affecting neoplastic development.

The molecular basis of genetic abnormality in neoplasm enables us to apply them in a useful adjunct to the diagnostic pathology by use of genetic markers.

This paper describes the outline of the usefulness of genetic analysis in neoplastic diseases for diagnostic pathology from paraffin-embedded specimens as follows.

1. A useful guideline for the detection of genetic alterations from paraffin-embedded pathology specimens.
2. Some technical problems for the detection of genetic alterations by PCR and dye primer sequencing methods from paraffin-embedded pathology specimens.
3. Diagnostic significance of amplification of *c-myc* and point mutation of *c-ras* codon 61 genes for differential diagnosis of nevocellular nevus and malignant melanoma.
4. Gene amplification of matrix metalloproteinases in relation to the spreading mode of bronchiolo-alveolar carcinoma and acinar or papillary adenocarcinoma of the lung.
5. The detection of *c-Ki-ras* codon 12 point mutation in gastric epithelial tumors in Japanese.
6. The detection of *c-Ki-ras* codon 12 point mutation from pancreatic juice. A useful diagnostic approach for pancreatic carcinoma.
7. The detection of *c-Ki-ras* codon 12 point mutation from necrotic tissue. A useful adjunct to the diagnosis of pancreatic carcinoma.
8. A useful diagnostic approach for differentiating complete hydatidiform mole from partial hydatidiform mole by the detection of Kogan segment from a human Y-chromosome specific

repeat sequence.

9. Diagnostic approach for differentiating metastatic lesion from double cancer using a method based on restriction fragment length polymorphism of the X-chromosome-linked phosphoglycerokinase gene and on random inactivation of the gene by methylation.

## 1. はじめに

腫瘍診断において病理組織診断が最も重要であることは論ずるまでもない。形態学を基本として「経験的除外の法則」に基づく永年にわたる診断基準の集積は重要なものに違いない。しかし borderline malignancy を始めとし良悪性の判断、浸潤性の有無、悪性度、組織型などいずれをとっても客観的診断に苦しむことはしばしばある。

今日本態が解明されていない腫瘍も、少なくとも「遺伝子の病気」であることが明らかになり、特に「腫瘍遺伝子」、「腫瘍抑制遺伝子」および「腫瘍進展に連なるその他の遺伝子」の変異との関連が次第に明らかになってきた<sup>1)</sup>。それには単一細胞起源である腫瘍細胞の増殖、分化、異型、不安定性、死の制御、血管増生や浸潤性格などに関係のある腫瘍遺伝子群との対応がある。

腫瘍遺伝子や抑制遺伝子が分離されプロモーター、エンハンサー領域構造も明らかとなり、正常細胞から発癌への過程には腫瘍遺伝子を始めとする腫瘍関連遺伝子の複数の遺伝子が関与しており、単一の遺伝子の異常だけでは遺伝子病としての癌を説明することはできない。点突然変異、増幅、欠損、挿入、再構成、転座等というような形での「多段階的構造変化の蓄積」<sup>2)3)</sup>が必要であることが明らかになってきた。

従って一つの遺伝子の異常を検出することがそのまま癌（腫瘍）としての診断に有用であるとは限らない。しかし一定の遺伝子の異常をマーカーと考え、癌の診断や悪性度の判定の補助手段として利用することができるわけである。技術的にもサザン法が主体であったものが polymerase chain reaction (PCR) 法の開発により微量の検体からも遺伝子異常を容易に検出できるようになった。遺伝子組換えクローニングも容易に行えるようになったし、目的によってはパラフィン包埋検

体も用いることができ、またアイソトープを用いなくとも標識 luminol 化学発光法による増幅の検出や、ダイプライマーシーケンシング法による塩基配列構造解析も可能となった。

しかしこのような DNA (遺伝子) の解析技術の開発が先行し、これを生かした病理学的診断への応用が十分に行われているとはいえないのが実情ではないかと思われる。これらの技術を応用して材料は病理組織診断により確かめられた保存材料パラフィン包埋組織を用いて病理診断に実用可能な DNA 診断に限定し検出方法とその問題点、遺伝子異常の解析結果と病理診断、良性腫瘍、悪性腫瘍、浸潤性との接点および整合性について、最近の我々の研究室においての成果をもとに概説する。

## 2. パラフィン包埋材料使用上の注意

### 1) 検索可能な genome size

#### (1) Dot blot hybridization

24, 39, 39, 39, 39, 39, 47, 108, 109, 263, 380, 467, 576, 800, 1,000bp 以上すべてで検索可能であった。不完全に hybridize した状態での検出も含まれていると考えられる。

#### (2) PCR (polymerase chain reaction)

108, 109, 157bp では結果が良好であるが<sup>263, 380, 576bp</sup>では出来、不出来があり<sup>700, 1,000, 1,400bp</sup>では結果は不良であった。通常行えるのは<sup>200bp</sup>以下と考えられる。

### 2) 包埋用パラフィンの種類

M 社, P 社, W 社製の 3 種類を使用した。各社の製品は企業秘密があり組成は明らかにされていない。高級のパラフィン炭化水素類  $C_n H_{2n+2}$  で長鎖で薄切にさくさくしたものはいいが、比較的短鎖のものが混合し、ねばりのあるタイプの製品は PCR の結果がよくない。側鎖を有する異性体の混合とも関係があると考えられる。M 社製パラフィン包埋材量では 27 年間保存のものでも検出

可能であった。

### 3. 検体の固定方法と問題点

通常 PBS 10%ホルマリン pH 7.2を使用しているが、特に長期間保存した後のパラフィン包埋検体では結果が不良である。DNA の断片化によると考えられるが特に PCR での増幅効率が悪い。また制限酵素に対する不消化現象があるので PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法などの結果については注意を要する。

### 4. 検出方法と問題点

#### 1) Dot blot hybridization

#### 2) Southern blot hybridization

1), 2)はいずれも probe は非放射性標識による。例えば3'-oligolabelling and chemiluminescence detection system<sup>4)</sup>で充分目的を達することができアイソトープ標識のように場所や時間的制約がなくてよい (図1)。

#### 3) PCR

##### (1) c-Ki-ras codon 12点突然変異の検出

c-Ki-ras codon 12の点突然変異の検出には高感度の nested PCR または two-step (RFLP) PCR 法<sup>5)</sup>の出現により検出率は非常に高くなった (図2, 3)。3'となる codon 11の GCT を CCT に modify した primer を人工的に作り、制限酵素 Bst N1の認識部位と一致するようにする。塩基一つが異なっても mismatch する。増幅産物が正常で5 bases recognition cutter である Bst N1の認識配列と一致し CCTGG ならば Bst N1に消化され切れる。codon 12GGT の第一、第二塩基 GG のいずれかが変異をきたした6通り CGT, TGT, AGT, GCT, GAT, GTT の配列の場合は切れない。Bst N1の認識部位は codon 12と intron の2カ所ある。PCR に際しては最初の反応が最も大切なので primer の mismatch が起こらないように PCR 反応液をワックス (Ampli Wax<sup>TM</sup> PCR Gem 100)により二層に分け、高温度になってワックスが融解し PCR 反応液が混合して反応がスタートし、融解したワックスは最上層で層をなし反応液の蒸発を防ぐ Hot start 法を用いた。PCR 2回目は intron の側はより内側の primer を用い

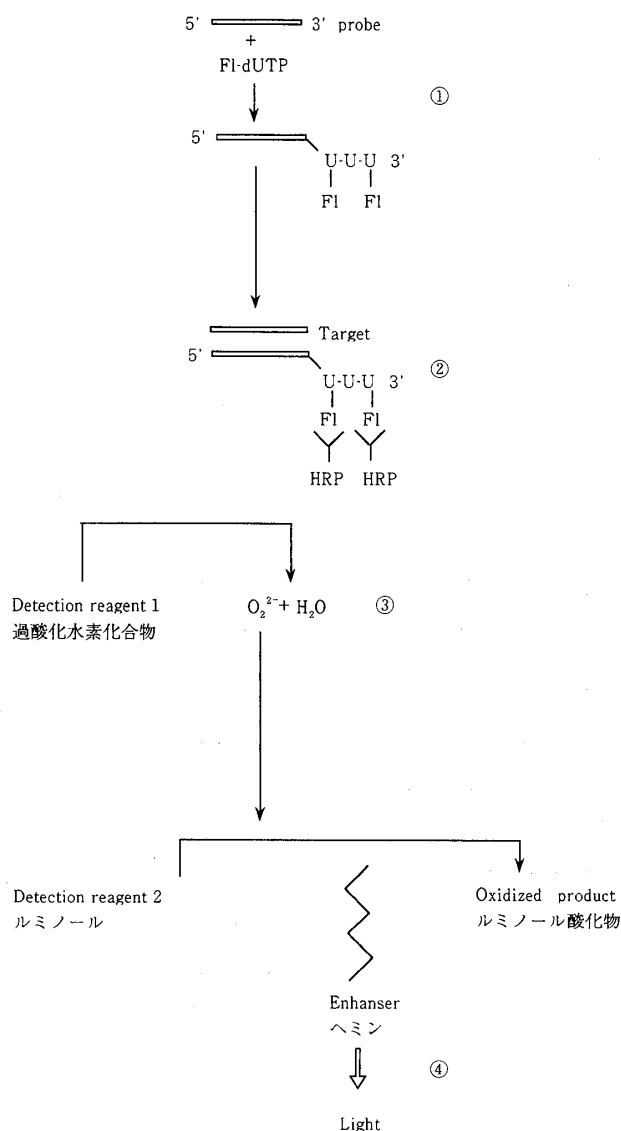


図1 Enhanced chemiluminescence ECL 3'-oligo-labelling and detection system の原理

① Oligonucleotide と fluorescence (FI) を標識した dUTP, FI-dUTP を terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) の存在下で probe の3'端に結合させる。37°C, 120分間で tailed oligonucleotide ができる。

② Target DNA に hybridization 90分

抗 FI 抗体に horse radish peroxidase, HRP を結合させたものを FI と抗原抗体反応させる。以後は classical な法医学で用いる血痕検出反応と原理的には同じである。

③ HRP の基質、過酸化水素化合物と反応すると発生の酸素を発生する。

④  $O_2^{2-}$  がルミノールを酸化し、酸化反応の触媒としてヘミンを用いその存在下で光エネルギー量 (photon 数) が増強される。

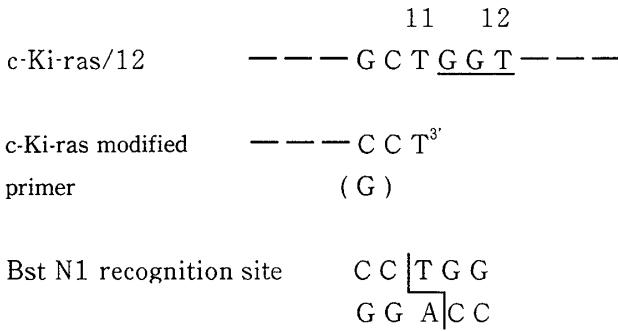


図2 RFLP法の原理

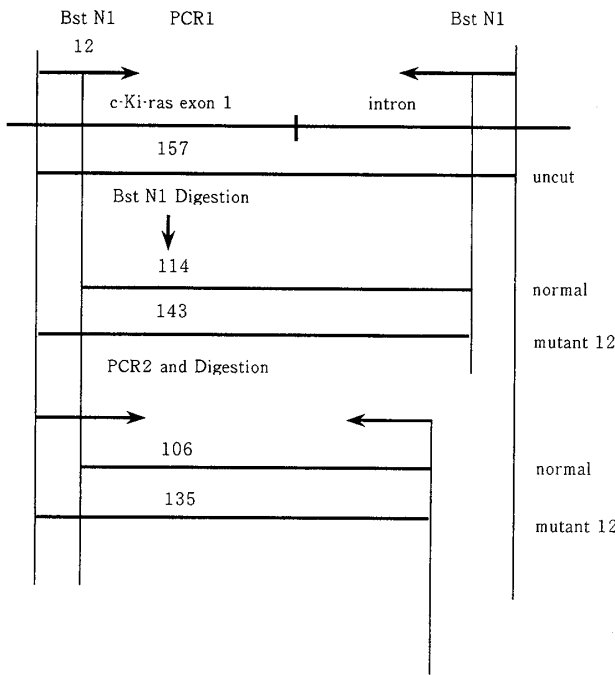


図3 Nested (RFLP) PCR法

て行う。

増幅産物は Bst N1消化により正常ならば codon 11-12の認識部位で切れ codon 12の変異があれば切れないで長い DNA のままとなる。しかし uncut の band は false positive のことがあるので気をつけなければならない。PCR の時 Ampli Taq DNA polymerase を用いれば反応は efficient であるが、時として base misincorporation があり変異と間違えることがある<sup>6)</sup>。それはプリンまたはピリミジン同士の T ⇌ C または A ⇌ G の置換というような multiple base transition で uncut band については必ず sequencing を行い確かめる必要がある。また前述のようにホルマリン

固定による制限酵素に対する不消化現象があるので注意を要する。

(2) DNA 修復と遺伝子不安定性についての検出法<sup>7)~9)</sup>

最近 PCR 法関連の検出法として microsatellite instability の検査が注目されている。正常細胞が癌化するにあたり、必要な遺伝子の多段階の変異の蓄積が microsatellite 領域の修復エラー mismatch repair と関連が深いとして説明されている。

ヒトの遺伝子の上には数万カ所存在する microsatellite 領域 (CA)<sub>n</sub> または (CT)<sub>n</sub> repeats の繰り返し数の異常がみられるもの、つまり遺伝子の不安定性 genomic instability のあるものでは変異の蓄積が起こりやすく、種々の癌や特に多重癌となる high risk がある。癌が一つあり microsatellite instability のある患者では第二の発癌の可能性の遺伝子診断上、有用なスクリーニングマーカーとなる。実際には遺伝子の種々の部位に存在する (CA)<sub>n</sub> または (CT)<sub>n</sub> repeats を含む配列を種々の primer を用い PCR 法で増幅し、repeats の繰り返し数によって異なる産物の大きさをゲル電気泳動で正常組織と癌組織で比較する。各個体により正常の繰り返し回数は異なるので、同一個体のコントロールをとる必要がある。それにはキャピラリー電気泳動法 (capillary electrophoresis) が検体が微量で短時間で行え、特にメチルセルロースを含む緩衝液を用いる方法が分離に優れる。

4) In situ hybridization

発癌性ウイルス遺伝子、ガン遺伝子、ガン抑制遺伝子などの組織構築上の局在部位を知る上では大切な方法であるが、positive と negative の判定の境界が不明確であることと pseudopositive のことや局在部位が微細な場合は pseudonegative となるので注意が必要である。種々の方法があるが、我々は非放射線性的の方法を用いている。

5) Dye primer sequencing

c-Ki-ras codon 12の PCR 産物についての塩基配列確認のための実例をあげる。

nested PCR 産物はアガロースゲルで電気泳動

し、エチジウムブロマイド (Et-Br) 染色で検出した uncut の band を切り取り DNA cell で DNA を電気的に抽出する。次いで phenol-chloroform 抽出により純化する。同じ primer を用いて PCR で増幅し、産物は polyethylen glycol を加え遠沈し primer や dNTP を除去する。EtOH 沈殿し乾燥状態として試料とする。135塩基の産物を熱変性により一本鎖 DNA とし、これを鋳型としそれに相補的な codon 12より30b 下流の長さ20b の3'端に水酸基をもったオリゴヌクレオチドプライマー (sequence primer, reverse) を合成し、5'末端に蛍光体 Texas red を蛍光標識させる。これをもとに DNA を5'→3'方向へ伸長させる direct sequencing 法である。

以下は Sanger らの dideoxy 法であるが、反応の基質には4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸 (deoxynucleoside triphosphate, dNTP) に1種類のジデオキシヌクレオチド三リン酸 (dideoxynucleotide triphosphate, ddNTP) を加える。ddNTP には ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP の4種類があり各々を用いる。polymerase は  $\Delta$ Taq DNA polymerase を用いる。それぞれの塩基の部では dNTP と ddNTP が競合し、いずれかが取込まれる。dNTP が取込まれば相補鎖は伸長するが、ddNTP が取込まれた場合は DNA 合成阻害剤であるから伸長はそこで停止する。各々の塩基に対応して伸長が停止し3'末端がそれぞれ A.C.G.T. で終わった鎖長の異なった相補鎖が合成される。その種々の長さの蛍光標識された DNA 断片群試料を熱変性により鋳型と離し一本鎖とし、Adenine, Cytosine, Guanine, Thymine, A.C.G.T. の塩基種別に蛍光式シークエンサーのポリアクリルアミドゲルサンプル溝にアプライし電気泳動を行う。長さの短い DNA 断片が速く、順次長いものが泳動され泳動始点から一定距離をレーザーで照射し DNA 断片がそこを通過する時、発する蛍光を検出する。検出されたデータはディスプレイ上に輝度データとして波形で塩基種により色を異にして表示される。アプライした泳動路の違いから A.C.G.T. の塩基種を判定し配列を読み取り決定する。DNA の標識に蛍光体を用いる

ので被爆の心配がなく RI 法に比べ安全である。場所や時間的な制約もない。

問題点としては PCR 増幅産物では cloning material に比べ波形の基底線が不安定で塩基の自動読み取り解析ができないものが時にある。波形が間延びし、不規則な場合、自動解読のピッチと一致せず読み違いが出ることがある。c-Ki-ras codon 12の点突然変異では前記の制限酵素に対する不消化現象のために混入している正常の塩基と波形が大小重なった場合、自動解読では、大型波形のみを読み、一方は消去されるので見過ごさないように必ず波形を直接確かめる必要がある。

表1 Nevocellular nevus と悪性黒色腫の codon 61 c-H-ras, c-Ki-ras, c-N-ras の点突然変異および c-myc の増幅

Nevocellular nevus				
Case No.	Age	Sex	DNA 検索結果	
			ras	c-myc
1	14	M	6	
2	7	F	4	1
3	6	F	3	1
4	1	F	2	1
5	4	F	5	1
6	5	M	5	
7	36	F		1
8	14	F	2	
9	6	F	3	1
10	18	F	1	1
11	20	F	3	
12	31	F	2	
13	14	M	3	
14	24	F	1	
15	25	F	2	

Malignant melanoma				
Case No.	Age	Sex	DNA 検索結果	
			ras	c-myc
1	66	F	7	2
2	57	M		1
3	66	M		
4	69	M		
5	84	F	7	2
6	69	M		
7	57	M		
8	78	M	1	
9	64	F	13	2
10	53	M		

1)~7)の検出方法の詳細については技術書に譲る。

### 5. 遺伝子診断の病理診断への応用

#### 1) Nevocellular nevus と悪性黒色腫の鑑別診断における c-H-ras, c-Ki-ras, c-N-ras codon 61の点突然変異および c-myc の増幅に関する検討<sup>10)</sup>

悪性黒色腫(M.M)における c-H-ras, c-Ki-ras, c-N-ras codon 61の点突然変異と c-myc の増幅の腫瘍発生および悪性化との関連性を明らかにする目的で、発生起源が近縁である母斑細胞性母斑(NCN)30例のパラフィン包埋材料を用い、癌遺伝子の点突然変異の有無と増幅について ECL 3'-oligolabelling and detection system (Amersham) を用い dot blot hybridization 法により検討した。各点突然変異に対応する ras probe は ras Muta Probe Set (Oncogene Science) を、human c-myc に対しては exon-1, exon-2に対応する antisense probe (Oncogene Science) を使用した。

その結果(表1) M.M 10例と比較して NCN に

は非常に高率に c-Ki-ras, c-N-ras, c-H-ras codon 61の点突然変異が認められ、さらに c-myc の増幅異常の合併が認められた。M.M では点突然変異が認められるか認められないかのいずれかで、認められるものでは非常に高い重複性を示し、しかも c-myc の増幅との完全な一致を認める。

以上により次の仮説が推定される。① NCN は良性腫瘍と考えられているが、悪性化に必要な遺伝子の多段階的変化の内の初期変化は進行しており、悪性腫瘍への準備状態にある。しかし② ras 遺伝子の活性化は腫瘍化との関係は深い、悪性化には他の遺伝子の変化を必要とすると考えられる。

#### 2) 肺腺癌の進展予測と MMP の遺伝子増幅<sup>11)</sup>

基底膜や結合組織といった細胞外マトリックスを分解する matrix metalloproteinase (MMP) の癌細胞での発現と転移能との相関性が示唆されている。肺胞壁を間質とし、基底膜を保持した状態で置換進展する肺胞上皮癌と浸潤破壊性増殖を示す腺癌をモデル対象として、主として基底膜の分解に関与する MMP-3と間質のコラーゲンの分解

表2 細気管支肺胞上皮癌における MMP-3と MMP-1遺伝子の増幅と臨床病理学的所見

No.	Age	Sex	Size (mm)	Type	Diff	p	v	ly	brs	n	Gene amplification	
											MMP-3	MMP-1
1	67	F	16	b	well	0	0	0	-	-	-	-
2	65	F	18	b	well	0	0	0	-	-	+	+
3	56	F	13	b	well	0	0	0	-	-	+	+
4	65	M	22	b	well	0	0	0	-	-	+	+
5	63	F	20	b	well	1	0	0	-	-	-	+
6	71	M	70	b	well	0	0	0	-	-	-	+
7	69	F	23	b	well	0	0	0	-	-	-	+
8	46	F	10	b	well	0	0	0	-	-	-	+
9	35	F	17	b	well	0	0	0	-	-	+	-
10	39	F	13	b	well	1	0	0	-	-	+	+
11	47	F	23	b	well	0	0	0	-	-	-	-
12	62	F	21	b	well	0	0	0	-	-	-	+
13	80	M	20	b	well	0	0	0	-	-	-	+
14	70	F	29	b	well	0	0	0	-	-	-	+
15	60	M	22	b	well	0	0	0	-	-	+	+
16	46	F	20	b	well	0	0	0	-	-	+	+

No.: case number of bronchiolo-alveolar carcinoma, Type: histological type, b: bronchiolo-alveolar carcinoma, Diff: type of differentiation, well: well differentiated, p: pleural invasion, 0: negative, 1: invasion of pleural elastic membrane, v: vessel involvement, 0: negative, ly: lymphatic involvement, 0: negative, brs: invasion of bronchial surgical margin, -: negative, +: positive.

に關与する MMP-1の遺伝子増幅の差異に關して検討した。

肺胞上皮癌16例と浸潤性の腺癌24例のパラフィン包埋材料から DNA を抽出し、47塩基の MMP-3および24塩基の MMP-1の合成 oligonucleotide を probe として、非放射性標識 luminol 化学発光法により検出した。肺胞上皮癌では16例中7例43.8%に MMP-3の、16例中13例81.3%に MMP-1の遺伝子増幅が認められた。浸潤性の腺癌では24例中22例91.7%に MMP-3の、24例中21例87.5%に MMP-1の遺伝子増幅が認められた。また、MMP-3や MMP-1の遺伝子増幅がみられた症例では、高率に胸膜浸潤、血管、リンパ管侵襲、リンパ節転移を認めた (表2, 3)。

肺腺癌の浸潤・転移には、基底膜を破壊可能な

MMP-3の産生が重要と考えられた。また、MMP-3の遺伝子増幅は、胸膜浸潤、血管、リンパ管侵襲、リンパ節転移と有意の関連性がみられ、浸潤・転移の予測に重要な因子であることが判明した。

### 3) 胃癌での c-Ki-ras codon 12変異の検出<sup>12)</sup>

c-Ki-ras 遺伝子の点突然変異には多くの消化器系腫瘍において報告されている。胃癌および胃腺腫について c-Ki-ras codon 12の点突然変異をパラフィン包埋組織から DNA を抽出し、RFLP-PCR法と dot blot hybridization 法により検索したところ、大腸癌あるいは腺腫に類似した組織像を示すもの、すなわち腸型に分類されるもののうち、4/20例20%に点突然変異が検出された (表4)。

Direct sequencing により変異を確認したところ GGT → GAT 3例, GGT → GTT 1例であつ

表3 肺腺癌における MMP-3と MMP-1遺伝子の増幅と臨床病理学的所見

No.	Age	Sex	Size (mm)	Type	Diff	p	v	ly	brs	n	Gene amplification	
											MMP-3	MMP-1
17	43	M	50	p	mod	2	0	1	-	-	+	+
18	70	M	37	a	well	2	0	2	+	+(3)	+	+
19	80	F	22	a	mod	2	1	1	-	+(4, 10)	+	+
20	75	F	27	p	mod	0	0	1	-	-	+	+
21	69	M	21	a	mod	1	0	1	-	-	+	+
22	77	M	29	a	mod	1	2	2	-	+(1, 2, 3, 11)	+	+
23	66	M	22	a	mod	0	0	1	-	+(12)	+	+
24	73	M	23	a	mod	1	3	3	-	+(2, 5)	+	+
25	68	F	14	p	mod	1	0	0	-	-	+	+
26	74	F	41	p	well	3	1	1	-	+(4, 7, 11)	+	+
27	57	F	20	p	well	2	2	1	-	-	-	-
28	67	M	37	p	mod	1	0	1	-	-	+	+
29	74	F	31	p	well	1	1	2	+	+(1-4, 7, 11)	+	+
30	54	M	23	p	well	1	1	2	-	+(1-3, 5, 14)	+	+
31	62	F	22	a	mod	0	0	0	-	-	+	+
32	57	F	23	p	mod	2	1	2	-	+(10, 11)	+	-
33	61	F	29	p	mod	0	2	1	-	-	+	+
34	60	M	64	a	poor	1	1	2	-	-	+	+
35	57	M	25	p	mod	3	0	1	-	-	+	+
36	70	F	23	a	mod	2	1	2	+	-	+	+
37	70	F	24	p	well	0	1	3	-	+(1-4, 7, 11, 14)	+	+
38	62	F	18	p	well	0	0	0	-	-	-	+
39	47	F	19	p	well	0	0	0	-	-	+	+
40	64	M	28	p	well	0	0	0	-	-	+	-

No.: case number of acinar or papillary adenocarcinoma, Type: histological type, a: acinar adenocarcinoma, p: papillary adenocarcinoma, Diff: type of differentiation, well: well differentiated, mod: moderately differentiated, poor: poorly differentiated, p: pleural invasion. 0: negative, 1: invasion of pleural elastic membrane, 2: invasion of pleural surface. 3: invasion of chest wall or mediastinum, v: vessel involvement, ly: lymphatic involvement, 0: negative, 1: slight, 2: moderate, 3: marked, brs: invasion of bronchial surgical margin, n: lymph node metastasis, -: negative, +: positive.

表4 胃上皮性腫瘍の組織型と K-ras 点突然変異陽性例

Histology	No. of cases	Ki-ras point mutation positive cases
Adenoma	3	0
Adenoma + Intestinal type Ca.	1	1 (GGT → GAT)
Intestinal type Ca.	16	3 (GGT → GAT2) (GGT → GTT1)
Diffuse type Ca.	11	0
Total	31	4

た。このうち、1例は良性腺腫の一部に癌化がみられたもので、c-Ki-ras の点突然変異は癌化部分のみならず腺腫部分にも認められた。同じ現象が癌化を伴った大腸腺腫においても報告されており、c-Ki-ras 癌遺伝子の点突然変異は発癌過程の比較的早期に起こっている現象と推定された。また腸型の組織像を示す胃癌は疫学的にその発生に環境因子の関与が示唆されているが、このタイプの胃癌に限って点突然変異がみられたことはc-Ki-ras 癌遺伝子の点突然変異にも環境因子の関与が推定される。

#### 4) 膵液からの c-Ki-ras codon 12 点突然変異の検出による膵癌の診断<sup>13)</sup>

膵液細胞診は膵腫瘍診断のための重要な方法であるが、採取される細胞数は一般に少ない上、高分化で異型に乏しく再生異型との鑑別が困難な例も少なくない。一方、膵癌では90%以上の高率でc-Ki-ras codon 12における点突然変異が起こっていることが知られている。従って膵液から点突然変異が検出可能であれば、膵癌の診断に非常に有用であると考えられる。

内視鏡的に採取された膵液41検体を用い、modified primer による RFLP-PCR を行った。PCR 産物は BstN I による消化を行いアガロースゲル電気泳動、Et-Br 染色で点突然変異の有無を検討した(図4)。PCR は約70%の症例に可能であり、膵癌6例中4例に点突然変異が検出された。また intraductal papillary neoplasm の1例にも検出された。しかし正常コントロールを含め、非腫瘍性疾患の症例からは1例も点突然変異は検出

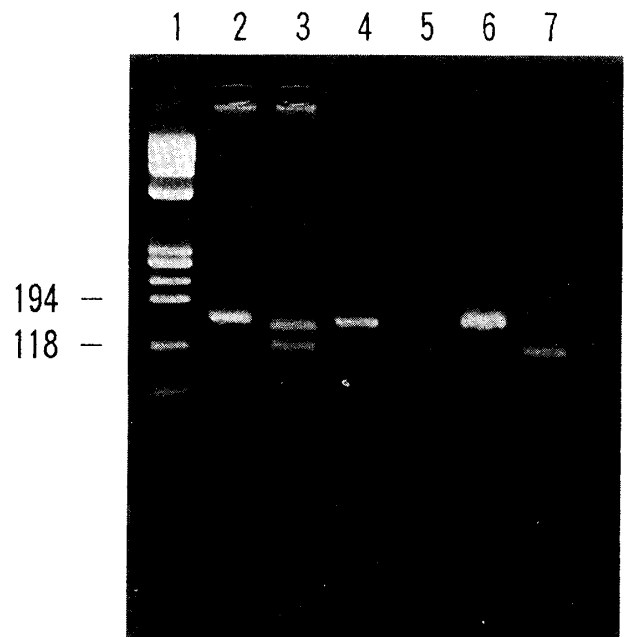


図4 膵液からの c-Ki-ras codon 12 点突然変異検出例 (Bst N I で消化した PCR 産物のアガロースゲル電気泳動 Et-Br 染色)

1: Hae III で消化した  $\Phi$ ×174 のサイズマーカー、2,3:膵癌、4,5:膵管内乳頭腫、6,7:正常肝 DNA 陰性コントロール、2,4,6:未処理 PCR 産物、3,5,7: Bst N I 消化 PCR 産物。3,5 に認める上のバンド 143 bp は Bst N I で消化されない変異のある DNA フラグメント、あるいは非消化現象により切れていないことも考慮する必要がある。114 bp の下のバンドは変異してない腫瘍細胞または非腫瘍性細胞 DNA。

表5 膵液からの c-Ki-ras codon 12 点突然変異の検出症例

Diagnosis	No. of cases	PCR'd	Mutation
Pancreatic carcinoma	9	6	4
Pancreatic adenoma	1	1	1
Solid and cystic tumor	1	0	/
Chronic pancreatitis			
with pseudocyst	2	2	0
without pseudocyst	14	11	0
Cholelithiasis	4	2	0
Gallbladder polyp	2	2	0
Controls	8	4	0
Total	41	28	5

されなかった(表5)。1例では PAP 検鏡標本の封入剤を溶解し、1個の異型細胞を取出しても点突然変異検出が可能であった。



膵癌の症例に高率に c-Ki-ras codon 12 の突然変異検出が可能であり、しかも非腫瘍性疾患では全例陰性であったことより、本法は特異性も高く、また膵癌診断の上で有用であると考えられた。

#### 5) 壊死組織からの c-Ki-ras codon 12 点突然変異検出による膵癌の診断<sup>14)</sup>

穿刺生検や生検で採取組織が壊死化しており、顕微鏡組織診断が不能なことに度々遭遇する。

膵癌では c-Ki-ras codon 12 の点突然変異が非常に高頻度に認められ、良性疾患では認められないことが分かっている。従って c-Ki-ras の変異が膵癌のマーカーとして有用である。

そこで我々は確定診断のついた症例で、診断不能の膵癌壊死組織のパラフィン包埋材料から DNA を抽出し、nested PCR 法 (Two-step RFLP PCR 法) により c-Ki-ras codon 12 の点突然変異検出を試みた。24 例中 24 例 (100%) すべてに検出可能であった (表 6)。

膵癌組織からの陽性対照群でも、20 例中 20 例 (100%) すべてに検出できた。壊死による膵癌細胞核 DNA のランダムな分解によっても c-Ki-ras gene は残存しており、この方法は膵癌確定診断の補助手段として極めて有用であると考えられる。

しかしこの方法での検出は Bst N1 で uncut の正常 band が混ざって pseudopositive に出ている可能性もあるので、codon 12 より 30b 下流の合成 primer, reverse を作製し、dideoxy 法による dye-primer sequencing 法で direct sequencing を行い確認した。20 例で確認でき、変異は AGT+GTT 7 例、AGT+GTT+GAT 7 例、AGT+GTT+TGT 1 例、GTT 4 例、GTT+GAT 1 例であった (表 7)。

geographical に mutagen が異なる可能性がある

表 6 膵液壊死組織からの c-Ki-ras codon 12 点突然変異の検出

Histological type	No. of cases	Positive cases
Pancreatic ductal adenocarcinoma	23	23
Necrotic tissue from the pancreatic cancers	24	24

表 7 膵癌壊死組織から検出した c-Ki-ras codon 12 点突然変異の変異型

Type of point mutation	No. of cases
AGT+GTT	7
AGT+GTT+GAT	7
AGT+GTT+TGT	1
GTT	4
GTT+GAT	1
	20

表 8 部分奇胎と全奇胎からのヒト Y 染色体特異的遺伝子検出例

Diagnosis	No. of cases	Detected cases
Partial hydatidiform mole	12	8
Complete hydatidiform mole	2	0
Seminoma	2	2

ること、同一症例での変異の重複が 16 例もあり codon 12 は極めて不安定な部位となっていること、heterozygous のものや同一腫瘍中の subclone で変異を異にするものが存在することが予想される。

#### 6) Y 特異的遺伝子検出による部分奇胎と全奇胎との鑑別への応用

部分奇胎は triploid が大部分で (一部 tetraploid) diandry であるのが特徴であるが、未だその核型は充分解析されていない。

実験材料は組織診断により確かめられた 12 例の部分奇胎とコントロールとしてセミノーマのパラフィン包埋材料からの抽出 DNA を用いた。DYZ 1 部分の human Y chromosome specific primer (PH-1550-10 Vienna Lab)<sup>15)</sup> を用い、PCR 法により 149bp の Y chromosome 特異的遺伝子 (Y) を検出した。その結果、12 例の部分奇胎の中 8 例に Y が検出できた (表 8)。Y 検出により 46XX の全奇胎との鑑別診断の一助となり、部分奇胎の染色体核型は XXY, XXX, XYY が予想されるが、これらの三型は 1 : 1 : 1 の割合で出現すると考えられる。

## 7) 腫瘍細胞の clonality の検索による重複癌と転移癌との鑑別<sup>16)17)</sup>

癌病巣が重複癌なのか、再発あるいは転移なのかは治療指針を立てる上で重要なことである。組織型が原発巣と第二の病巣と同一である場合、癌病巣は clonality を検索することにより判断することができる。

女性では2本の X chromosome のうち、一本は胎生期に random methylation により不活化される。従って X chromosome 上の gene である PGK gene の Bst XI polymorphism に関して heterozygous な case では methylation-sensitive restriction enzyme 消化後の正常組織と腫瘍組織の Bst XI polymorphism を比較することにより、腫瘍細胞の clonality を調べることができる。

PGK gene の Bst XI および Hpa II site を含む DNA 断片を PCR 法により増幅するが、PCR の前に DNA を methylation-sensitive restriction enzyme である Hpa II により処理しておく。すると X chromosome のうち、methylation により不活化されたものだけが消化されずに残り、PCR の template となり得る。PCR 産物をさらに Bst XI で消化し、アガロースゲル電気泳動を行う。monoclonal であれば1本の band しか現れないが、polyclonal であれば2本の band が現れることにより clonality を検索できる。

### 文 献

- 1) **Nowell PC**: The clonal evolution of tumour populations. *Science* 194 : 23-28, 1976
- 2) **Kundson AG**: Genetics and etiology of human cancer. *Adv Hum Genet* 8 : 1-66, 1978
- 3) **Fearon ER, Vogelstein B**: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 : 759-767, 1990
- 4) **町井康雄, 大森正樹**: 進行胃癌における laminin receptor DNA の増幅に関する研究. *Cytometry Res* 3 : 50-54, 1993
- 5) **Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R et al**: Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive

polymerase chain reaction technique. *Cancer Res* 51 : 3497-3502, 1991

- 6) **Chen J, Viola MV**: A method to detect ras point mutations in small subpopulations of cells. *Anal Biochem* 195 : 51-56, 1991
- 7) **Thibodeau SN, Bren G, Schaid D**: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260 : 816-819, 1993
- 8) **Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS et al**: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260 : 812-815, 1993
- 9) **Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S et al**: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363 : 558-561, 1993
- 10) **佐々木真紀子, 大森正樹**: Nevocellular nevus における codon 61 c-Ki-ras, c-N-ras, c-H-ras の点突然変異及び c-myc の増幅に関する検討. *癌の臨* 42 : 253-261, 1996
- 11) **羽場礼次, 三木 洋, 小林省二ほか**: 肺腺癌の進展様式におけるマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) の遺伝子増幅に関する検討. *Cytometry Res* 3 : 109-113, 1993
- 12) **Miki H, Ohmori M, Perantoni AO et al**: K-ras activation in gastric epithelial tumors in Japanese. *Cancer Letters* 58 : 107-113, 1991
- 13) **Miki H, Matsumoto S, Harada H et al**: Detection of c-Ki-ras point mutation from pancreatic juice. *Int J Pancreatol* 14 : 145-148, 1993
- 14) **大森正樹, 三木 洋, 村上元正**: c-Ki-ras 点突然変異検出による壊死組織からの膀胱癌の診断. *日病理学会誌* 84 : 294, 1995
- 15) **Kogan SC, Doherty M, Gitschier J**: An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *N Engl J Med* 317 : 985-990, 1987
- 16) **Vogelstein B, Feason ER, Hamilton SR et al**: Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science* 227 : 642-645, 1985
- 17) **Gilliland DG, Blanchard KL, Levy G et al**: Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 6846-6852, 1991