

原 著

網膜芽細胞腫のパラフィン包埋組織を用いた DNA 解析

東京女子医科大学 第一病理学 (主任: 小林 慎雄教授)

* 山梨医科大学 生化学第一講座, ** 同 病理学第二講座

カトウヨウイチロウ オカダ ヨシイエ カワオイ アキラ コバヤシ マキオ
加藤陽一郎・岡田 芳家*・川生 明**・小林 慎雄

(受付 平成3年9月25日)

DNA Analysis in Paraffin Embedded Tissues of Retinoblastoma

Youichiro KATO, Yoshiie OKADA*, Akira KAWAOI** and Makio KOBAYASHI

Department of Pathology (Director: Prof. Makio KOBAYASHI)

Tokyo Women's Medical College

Department of *Biochemistry and **Pathology, Yamanashi Medical College

In morphologically, retinoblastoma (RB) is classified into two types, one is differentiated type that the tumor cells forming rosette, the other is undifferentiated type that the tumor cells was not. The cause of difference in morphological feature of this tumor is still unknown. In order to elucidate the relationship between morphological feature and alteration of the gene, we extracted the DNA from paraffin embedded tissue diagnosed as RB (2 cases of undifferentiated type, 2 cases of differentiated type). And carried out polymerase chain reaction (PCR) using the primer of exon 4 and exon 20 in retinoblastoma susceptibility gene (Rb gene). One case had a deletion of exon 20 in Rb gene, but we could not confirm the relationship between histological types and alteration of the gene.

緒 言

網膜芽細胞腫は、小児の網膜の癌で約60%は散发性、残りの40%が遺伝性に発生する。この腫瘍は、形態学的に腫瘍細胞がロゼット構造を再現する分化型と、ロゼットを認めない未分化型の2種類に分類することができる。

Knudson は、突然変異の起こる頻度と発症時期との関係からこの腫瘍の発生には2つの突然変異が必要であるという2段階突然変異説を提起した¹⁾。近年の分子生物学の進歩により網膜芽細胞腫関連遺伝子 (Rb 遺伝子) の単離解析が行なわれ、この仮説は見事に立証され、Rb 遺伝子は癌抑制遺伝子と呼ばれるようになった²⁾³⁾。Rb 遺伝子の変異は、網膜芽細胞腫ばかりでなく、肺小細胞癌、骨肉腫、乳癌においても観察されている^{4)~6)}。

また、さらなる研究によって Rb 遺伝子が解析され、この遺伝子の産物は、105-110kd の核内タン

パク質であり細胞周期に依存し、リン酸化されることが示された⁷⁾⁸⁾。そして、脊椎動物以上の種においてはヒト Rb 遺伝子類似の構造遺伝子が存在することが示され、Rb 遺伝子は、細胞の本質的な機能を担う遺伝子であると考えられている⁹⁾。

今回、我々は、山梨医科大学附属病院眼科で外科的に切除された網膜芽細胞腫未分化型2例、分化型2例のパラフィン包埋ブロックより DNA を抽出し、Rb 遺伝子のエクソンについて polymerase chain reaction (PCR) を行ない、形態学的特徴と遺伝子の変異との間の相関の有無について検討を行なった。

対象と方法

1. ヒト網膜芽細胞腫 (RB) 症例

ヒト RB 症例は、山梨医科大学附属病院眼科において眼球摘出を受けた4例を用いた(表1)。光学顕微鏡観察には、型のごとくパラフィン包埋と

表1 Summary of cases

Case	Age	Sex	Locus of tumor	Histopathological diagnosis	Family history	Operation date
1	2Y	Female	Unilateral(Rt)	Retinoblastoma, undifferentiated type	No	1984
2	2Y	Female	Unilateral(Rt)	Retinoblastoma, undifferentiated type	No	1987
3	1Y	Male	Unilateral(Lt)	Retinoblastoma, differentiated type	No	1988
4	2M	Female	Bilateral	Retinoblastoma, differentiated type	No	1989

表2 Primer position, sequences and amplified bp

No.	Primer position	Sequences	Amplified DNA bp
A	1 Prealbumin gene exon 3	5'-TAATCCAGACTTTCACACCT-3'	231 bp
	2 Prealbumin gene exon 3	3'-CGTAAGGTCCTTACGTGTC-5'	
B	3 Rb gene exon 4	5'-TCTTTCCTTTGTAGTGTC-3'	136 bp
	4 Rb gene exon 4	3'-AAGTCGTTTAAACCTTTCCTA-5'	
C	5 Rb gene exon 20	5'-ATTCCCACAGTGTATCGGCT-3'	160 bp
	6 Rb gene exon 20	3'-TCCGTAAACCTGGTTCATTC-5'	

し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行なった。

2. 組織からの DNA の抽出

パラフィン包埋組織からの DNA の抽出は Goelz らの方法を改良して行なった¹⁰⁾。つまり組織片混和の vortex の条件を緩和し、その後の 18 ゲージの注射針は通さず、なるべく機械的な DNA の断片化が起こらないようにした。そして DNA を沈澱させるための塩濃度は、酢酸ナトリウムを終濃度 0.3M となるように加えて、最終的に得られた DNA は TE8 (10mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA) に再浮遊させた。また、コントロールとして正常ヒト末梢血リンパ球より、Sambrook らの方法により DNA を抽出した¹¹⁾。

3. プライマーの合成

ゲノム DNA を増幅するためのプライマーの位置は、コントロールとして 18 番染色体上のプレアルブミン遺伝子のエクソン 3 を選択した。また、Rb 遺伝子においては、Rb 遺伝子の一部として最初に単離された cDNA, H3-8 を含む部位としてエクソン 4 と、いわゆる deletion hot spots とよばれる部位の中でエクソン 20 を選択した。PCR 用のプライマーの合成は、Applied Biosystem 社の

Model 391 を用いホスホアミダイト法により行なった。プライマーの位置とシーケンスおよび増幅される DNA の塩基の大きさは表 2 に示した。

4. PCR 反応

ゲノム DNA 0.5 μ g を鋳型とし、Gene Amp PCR Reagent Kit (Cetus 社) を用い、94 $^{\circ}$ C 1.5 分、55 $^{\circ}$ C 2 分、72 $^{\circ}$ C 0.3 分の反応を 30 回サイモリアクター (ATTO 社) を利用して行なった。増幅したサンプルの 10 μ l は 8% ポリアクリルアミドゲル (PAG) で泳動し、エチジウムブロミドで染色し観察した。

結 果

1. 網膜芽細胞腫の組織形態

代表的な組織像を図 1 に示した。図 1A は症例 1 の組織像である。腫瘍細胞は均一な大きさで細胞質に乏しく、殆ど裸核の小型細胞で、特定の配列、構造を模倣しない未分化な細胞である。図 1B は、症例 4 の組織像である。腫瘍細胞は個々の腫瘍細胞に差はみられないが、Flexner 型ロゼットを形成した分化度の高い腫瘍の組織像である。

2. PCR 反応

表 1 の症例と正常ヒト DNA を用い PCR を行

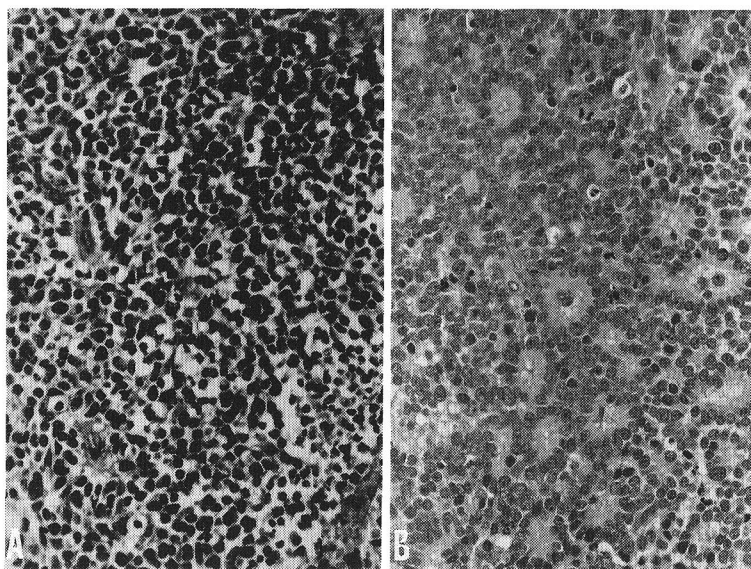


図1 網膜芽細胞腫の組織像

A: 分化型 (症例1), B: 未分化型 (症例4).

ロゼット構造が認められる. ヘマトキシリン・エオジン染色 (×40)

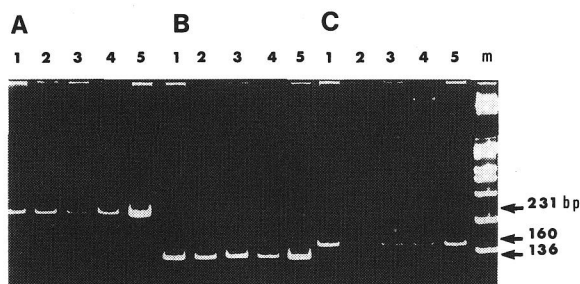


図2 PCR産物の8%ポリアクリルアミドゲル泳動パターン

A: プレアルブミン遺伝子エクソン3, B: Rb 遺伝子エクソン4, C: Rb 遺伝子エクソン20.

レーン1~4は, 症例1~4に相当する. レーン5は, 正常ヒト末梢血リンパ球由来のDNA. m: pBR322を制限酵素 *HinfI* で切断したサイズマーカー.

なった. 図2Aはコントロールとしてヒトプレアルブミン遺伝子のエクソン3についてPCRを行なったものである. すべてのレーンにおいて増幅されたDNAが確認できた. 図2Bは, Rb遺伝子のエクソン4の位置におけるPCRであるが, この実験でも予想される位置にバンドが確認できた. 図2Cは, Rb遺伝子のエクソン20の位置の

PCRの結果を示した. レーン3・4は染色性は弱いバンドが確認でき, レーン2においてはバンドが確認できなかった.

考 察

網膜芽細胞腫は, 小児の眼球内に発生する悪性腫瘍で世界中にその発症を認めるが, 本邦では15,000の出産に1人の割合で発生し, オランダ, フィンランドでは15,000から34,000の出産に1人の割合で発生すると報告され, 地域によってその発生頻度に差が認められる¹²⁾¹³⁾. この腫瘍は散发性に出現するものと, 常染色体優生遺伝により家族集積性を示すものがある. この遺伝性網膜芽細胞腫罹患児で, 治療により延命が可能となり成人した症例でも他臓器への腫瘍発生が高頻度で認められ, 次世代への浸透率は80%とされている. この腫瘍は, 網膜後極から視神経を介して頭蓋内に進展することが多く, 予後は悪い. 従って視神経浸潤の有無によって予後が決定される. しかし一方では神経芽細胞腫と同様に自然退縮例の存在することも知られている.

この腫瘍の発生原因は, 第13番染色体にある全長200kb以上にもわたるRb遺伝子の変異であ

り, RB 患者の多くにおいて欠損, 突然変異が報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾. さらにこの遺伝子から合成されるタンパク質は, 110kd のタンパク質で核内に存在し, 細胞周期に依存してリン酸化を受けると報告されている⁷⁾⁸⁾.

今回, 我々は, Rb 遺伝子の一部分として最初に単離された H3-8 に含まれるエクソン 4 とエクソン 20 について PCR を行なった. 症例 2 においてのみエクソン 20 に欠損を見出すことができた. コントロールとして行なった写真 2A の結果では, ヒトプレアルブミン遺伝子エクソン 3 の 231bp の増幅された DNA が確認できたことから, それよりも小さい Rb 遺伝子エクソン 20 の 160bp の DNA が分解されたため増幅されなかったということは考えにくく, この部位に遺伝子の欠損があると判断できる(図 2C). 我々がエクソン 20 を選択した理由は, このエクソンがいわゆる deletion hot spots とよばれる部位の中に存在するエクソンであること. および, RB タンパク質は, DNA に結合して核内に存在することから, DNA 結合タンパク質に共通に見出されるロイシンジッパー様構造を示す部位をエクソン 20 にもつためであるが, この部位の DNA 欠損と組織型との相関は認められなかった(表 3).

今回, 我々はパラフィン包埋組織より DNA を抽出し PCR 法により解析を行ない, DNA レベルで遺伝子の欠損を見出すことができた. パラフィン包埋組織中の DNA は経時的に分解して行くと

いう報告があり¹⁶⁾, このような組織から抽出した資料を用いサザンブロット法を行なう場合, その結果の解釈を誤ることがある. 今回行なった PCR 法は, そのような点を克服し得る有用な方法であった.

症例の検索をお許しいただいた山梨医科大学眼科, 塚原重雄教授の御好意に深甚の感謝の意を表します.

この研究の一部は, 文部省科学研究費(一般研究 C No. 63570157)の助成によった.

この研究の要旨は, 第 79 回日本病理学会総会(福岡)で発表した.

文 献

- 1) Knudson AG Jr: Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastom. Proc Natl Acad Sci USA 68: 820-823, 1971
- 2) Dryja TP, Rapaport JM, Joyce JM et al: Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastomas. Proc Natl Acad Sci USA 83: 7391-7394, 1986
- 3) Lee WH, Bookstein R, Hong F et al: Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. Science 235: 1394-1399, 1987
- 4) Harvour JW, Lai SL, Whang-Peng J et al: Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. Science 241: 353-357, 1988
- 5) Lee WH, Bookstein R, Lee EYHP: Studies on the human retinoblastom susceptibility gene. J Cell Biochem 38: 213-227, 1988
- 6) Lee EYHP, To H, Shew JY et al: Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. Science 241: 218-221, 1988
- 7) Lee WH, Shew JY, Hong FD: The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. Nature 329: 642-645, 1987
- 8) Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E: The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. Cell 58: 1097-1105, 1989
- 9) Bernards R, Schackleford GM, Gerber MR et al: Structure and expression of murine retinoblastoma gene and characterization of its encoded protein. Proc Natl Acad Sci USA 86: 6474-6478, 1989
- 10) Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B:

表 3 Correlation between histopathological type and genetic alteration in examind cases

Case	Histopathological diagnosis	A	B	C
1	Retinoblastoma, undifferentiated type	+	+	+
2	Retinoblastoma, undifferentiated type	+	+	-
3	Retinoblastoma, differentiated type	+	+	+
4	Retinoblastoma, differentiated type	+	+	+

A: human prealbumin gene exon 3, B: human Rb gene exon 4,

C: human Rb gene exon 20,

+: amplified DNA, -: not amplified DNA.

- Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130 : 118-126, 1985
- 11) **Sambrook J, Feitsch EF, Maniatis T**: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed, pp9.16-9.19, Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor (1989)
 - 12) **Takkancan A, Tuovinen E**: Retinoblastoma in Finland 1912-1964. *Acta Ophthalmol* 49 : 293-300, 1971.
 - 13) **Sang DN, Albert DM**: Retinoblastoma: Clinical and histopathologic features. *Hum Pathol* 13 : 133-147, 1982
 - 14) **Dunn JM, Phillips RA, Zhu X et al**: Mutation in the *RBI* gene and their effects on transcription. *Mol Cell Biol* 9 : 4596-4604, 1989
 - 15) **Friend SH, Horowitz JM, Gerber NR et al**: Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumor: Organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 9059-9063, 1987
 - 16) 堀尾光三, 徳田好勇, 前田 盛: 病理分野における遺伝子技法(4), 病理組織材料を用いた Southern blot 法による遺伝子解析. *病理と臨床* 9 : 547-552, 1991
-