

(別紙様式1)

GC-clamped DGGE によるパラフィン包埋

ヒト腫瘍組織の遺伝子解析

(04557018)

平成6年度科学研究費補助金 (試験研究(B)(2))

研究成果報告書

平成 7 年 2 月

研究代表者 小 川 勝 洋

(旭川医科大学医学部教授)

は し が き

研究組織

研究代表者： 小 川 勝 洋 (旭川医科大学医学部教授)
研究分担者： 西 川 祐 司 (旭川医科大学医学部助手)
研究分担者： 太 田 知 明 (旭川医科大学医学部助手)
研究分担者： 斉 藤 義 徳 (旭川医科大学医学部助手)

研究経費

平成4年度	1, 800千円
平成5年度	500千円
平成6年度	500千円
計	2, 800千円

研究発表

(1) 学会誌等

Ikue Fukuda, Katsuhiko Ogawa

Detection of p53 gene mutations in rat hepatocellular carcinoma cell lines by denaturing gradient gel electrophoresis.

Molecular Carcinogenesis 7: 257-262, 1993

Tomokazu Hoshi, Masato Imai, Katsuhiko Ogawa

Frequent K-ras mutations and absence of p53 mutations in mucin-producing tumors of the pancreas.

Journal of Surgical Oncology 55(2): 84-91, 1994

Masayuki Tokumitsu, Takayuki Kadohama, Katsuhiko Ogawa

Infrequent loss of heterozygosity and mutation of the p53 gene in immortal and transformed mouse embryo fibroblasts.

Molecular Carcinogenesis 10: 52-57, 1994

Yoshihiko Tokusashi, Katsuhiko Ogawa

Absence of p53 mutations and various frequencies of Ki-ras exon 1 mutations in rat hepatic tumors induced by different carcinogens.

Molecular Carcinogenesis 10: 45-51, 1994

Masato Imai, Tomokazu Hoshi, Katsuhiko Ogawa

K-ras codon 12 mutation in biliary tract tumors detected by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis.

Cancer 73(11): 2727-2733, 1994

Masayuki Tokumitsu, Katsuhiko Ogawa

Homology of p53 intronic sequences between four laboratory mouse strains and Japanese wild mice.

Genome 37: 1022-26, 1994

Takayuki Kadohama, Kunihiro Tsuji, Katsuhiko Ogawa

Indistinct cell cycle checkpoint after u.v. damage in H-ras-transformed mouse liver cells despite normal p53 gene expression.

Oncogene 9: 2845-2852, 1994

Katsuhiro Ogawa, Yoshihiko Tokusashi, Ikue Fukuda
Absence of p53 mutations in methylnitrosourea-induced mammary tumors in rat.
Cancer Prevention and Detection (in press)

(2) 口頭発表

Katsuhiro Ogawa, Ikue Fukuda and Yoshihiko Tokusashi
p53, H-ras and K-ras mutations in chemically-induced hepatic and mammary lesions in rats.

8th International Symposium of Cancer Detection and Prevention
(1993. 3.14-16, Niece, France)

Katsuhiro Ogawa, Masato Imai, Tomokazu Hoshi and Tomoaki Ohta
Identification of K-ras and p53 gene mutations by GC-clamped DGGE in human and animal cancers.

83th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR)
(1992. 5. 20-23, San Diego, California)
Proc. AACR 33:111, 1992.

星 智和、今井政人、小川勝洋

GC-clamped DGGE による大腸癌の K-ras 点突然変異の検出
第81回日本病理学会総会 (1992. 5. 14-16, 仙台)

今井政人、星 智和、小川勝洋

GC-Clamped DGGE による肝外胆道癌における K-ras 遺伝子突然変異の検索
第81回日本病理学会総会 (1992. 5. 14-16, 仙台)

福田郁江、小川勝洋

ラット肝癌細胞株及び肝癌組織における p53 遺伝子突然変異の検索
第51回日本癌学会総会 (1992. 9.29-10.1, 大阪)

徳差良彦、小川勝洋

種々の化学物質によるラット肝癌における K-ras 遺伝子の点突然変異の検索
第51回日本癌学会総会 (1992. 9.29-10.1, 大阪)

徳光正行、小川勝洋

GC-clamped DGGE によるマウス肝腫瘍の p53 遺伝子突然変異の検索
第51回日本癌学会総会 (1992. 9.29-10.1, 大阪)

小川勝洋、徳光正行、徳差良彦
マウス系間における p53 遺伝子 polymorphism の検索
第51回日本癌学会総会 (1992. 9.29-10.1, 大阪)

星 智和、今井政人、小川勝洋
Constant denaturant gel electrophoresis (CDGE) による粘液産生腫瘍のK-ras 点突然変異
の検討
第51回日本癌学会総会 (1992. 9.29-10.1, 大阪)

徳光正行、小川勝洋
マウス系間の p53 遺伝子 polymorphism
第15回日本分子生物学会年会 (1992.12.7-10, 京都)

星 智和、今井政人、伊藤久美子、紀野修一、櫛部 朗、草野満夫、小川勝洋、水戸廸郎
同時性大腸多発癌における核 DNA ploidy pattern 及び K-ras point mutation の検討
日本外科学会総会 (1992. 3. 25-27, 東京)

星 智和、今井政人、矢吹英彦、柿坂明俊、草野満夫、葛西真一、水戸廸郎、小川勝洋
癌抑制遺伝子 p53 の予後因子としての検討および遺伝子変異の検出法
Constant denaturant gel electrophoresis (CDGE) の検討
日本消化器外科学会 (1993. 2.18-19, 神戸)

徳差良彦、小川勝洋
異なる化学物質で誘発したラット肝癌における K-ras 遺伝子 codon 12 の点突然変異の検索
第72回北海道医学大会腫瘍系分科会 (第48回北海道癌談話会)
(1992. 9.19, 札幌)

福田郁江、小川勝洋
ラット肝癌細胞株及び肝癌組織における p53 遺伝子の突然変異の検索
第72回北海道医学大会腫瘍系分科会 (第48回北海道癌談話会)
(1992. 9.19, 札幌)

徳光正行、小川勝洋
化学物質誘発マウス肝腫瘍における p53 遺伝子突然変異の DGGE による検討
第72回北海道医学大会腫瘍系分科会 (第48回北海道癌談話会)
(1992. 9.19, 札幌)

星 智和、今井政人、澤 雅之、矢吹英彦、近藤啓史、葛西真一、水戸迪郎、小川勝洋
粘液産生膵腫瘍・膵癌における癌遺伝子 K-ras 及び癌抑制遺伝子 p53 の検討
第33回北海道胆膵疾患談話会 (1992. 8.1, 札幌)

星 智和、今井政人、垣坂明俊、草野満夫、葛西真一、水戸迪郎、小川勝洋
大腸癌における p53 遺伝子と予後
北海道腸疾患研究会 (1992. 11.14, 札幌)

小川勝洋
ラットでの発癌研究—遺伝子レベルでの展開に向けて
1993 秋期日本癌学会シンポジウム (1993. 11.26-27)

小川勝洋
肝癌と p53
発癌病理研究会 (1993. 8.24, 穂高)

小川勝洋
実験肝発癌の分子病理学的研究
埼玉医大分子病理研究会(1994. 1.21, 埼玉)

Katsuhiro Ogawa, Kunihiko Tsuji, Takayuki Kadohama
A cell checkpoint function in normal, immortal and transformed rodent hepatocytes
with the wild type p53 gene.
Keystone Symposium (1994. 2.13-20, Taos, New Mexico, USA)

徳光正行、小川勝洋
マウス胎児線維芽細胞の Immortalization 及び Transformation における p53 遺伝子変異と
mdm2 遺伝子発現の検討
第52回日本癌学会総会 (1993. 10.5, 仙台)

徳差良彦、福田郁江、小川勝洋
GC-clamped PCR-DGGE 法による MNU 誘発ラット乳癌における p53 遺伝子の点突然変異の解析
第52回日本癌学会総会 (1993. 10.5, 仙台)

福田郁江、西川祐司、小川勝洋
ラット肝癌細胞株及び肝癌組織におけるプロヒビチン遺伝子の突然変異の解析
第52回日本癌学会総会 (1993. 10.5, 仙台)

角浜孝行、西森博幸、徳光正行、小川勝洋

C3H マウス肝由来不死化細胞とその活性型 H-ras 導入による形質転換細胞の特性
第16回日本分子生物学会年会 (1993. 12.16-19, 幕張)

徳差良彦、小川勝洋

ラット p53 遺伝子の一次構造
第16回日本分子生物学会年会 (1993. 12.16-19, 幕張)

徳光正行、小川勝洋

マウス化学肝発癌過程における p53 遺伝子 LOH の検出
第16回日本分子生物学会年会 (1993. 12.16-19, 幕張)

角浜孝行、徳光正行、西川祐司、小川勝洋

ヒト活性型 c-H-ras により形質転換したマウス肝細胞株の特性
第82回日本病理学会総会 (1993. 4.6-8, 東京)

星 智和、小川勝洋

大腸癌における p53 突然変異と予後及び病理学的因子の検討
第82回日本病理学会総会 (1993. 4.6-8, 東京)

角浜孝行、辻 邦彦、小川勝洋

H-ras 形質転換に伴う肝細胞の p53 依存細胞周期制御能の変化
北海道癌談話会第53回春期シンポジウム「染色体・癌遺伝子・癌抑制遺伝子ー最近のトピックス」 (1994. 7.1, 札幌)

Katsuhiko Ogawa, Takayuki Kadohama

Cell cycle checkpoint after UV irradiation in normal, immortal and H-ras transformed mouse hepatocytes.

The Eight International Society of Differentiation (ISD) (1995. 10.22-26, 広島)

角浜孝行、辻 邦彦、西森博幸、徳光正行、吉江真澄、小川勝洋

C3H マウス肝由来正常・不死化・ras 形質転換細胞における cell cycle checkpoint 能と染色体数の不安定化の検討

第53回日本癌学会総会 (1994. 10.19-21, 名古屋)

研究成果

[研究目的]

癌の原因は癌遺伝子・癌抑制遺伝子などの異常の集積によるためであることが明らかになってきた。しかし、それぞれの種類の癌にどのような遺伝子異常が関わっているかはほとんどわかっていない。したがって、癌のメカニズムを理解するには、遺伝子異常を簡単に検出できる方法の確立が望まれる。一方、ヒト腫瘍の病理標本はパラフィンブロックとして大量に保存されているため、これを材料として遺伝子解析ができるようになると、癌の解明に資するところが大きい。遺伝子異常を検出する方法としては、single strand conformation polymorphism (SSCP), RNase A mismatch analysis, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), constant denaturant gel electrophoresis (CDGE), direct sequencing などさまざまな方法が報告されている。この中で、我々は PCR と DGGE を組み合わせた GC-clamped DGGE 法を応用してパラフィン包埋材料の遺伝子解析を行った。この方法の利点は、① 微量の DNA があればよく、組織切片からくり抜いた微小組織片を対象とすることができること、② 放射性同位元素を用いないために通常の実験室でできること、③ 同時に多数の試料を調べることができること、④ 遺伝子異常の検出が迅速で、せいぜい1日程度の時間しか要しないことなどがあげられる。我々はこの方法を用いてヒト、ラット、マウス腫瘍における K-ras 遺伝子、p53 遺伝子の解析を行った。

[研究計画・方法・結果]

1. GC-clamped PCR-DGGE 法の確立

GC-clamped PCR-DGGE 法を確立するために陽性コントロールとして K-ras codon 12 の first position に G→A の変異を持つ A549 細胞と正常ヒト胎盤 DNA を使用した。K-ras exon 1 の両端に PCR primer を設定し、5' 側 primer の 5' 側に約 30 mer の GC rich sequence (GC clamp) を添加した。これらの primer を用いて PCR を行ったところ、予想された 148bp の単一の PCR product が増幅された。次に 0~80% の変性剤の濃度勾配を含む 10% polyacrylamide gel を作製し、PCR product を gradient と直角方向に泳動した。変性剤は urea と formamide を用い、それらの濃度は 7M urea, 40% vol/vol formamide を 100% とした。泳動は 150V、60℃の条件下で6時間行い、泳動後 gel をエチジウムブロマイド染色して UV 照射下で撮影した。その結果、K-ras exon 1 を含む PCR fragment は 0-40% 変性剤の濃度範囲では、ほぼ一定の泳動度を示したが、40-60% の範囲では急速に泳動速度が低下した。これは変性剤により GC clamp 以外の DNA が単鎖化するとともに三次元構造をとるためである。一方、同様の条件下で正常 DNA から増幅した PCR product と A549 細胞からの PCR product を同時に DGGE を行ったところ、40-60% の濃度勾配範囲で両者は明らかに異なる泳動パターンを示した。これは上記の三次元構造が塩基配列の違いにより微妙に異なることによる。次に、40-60% の濃度勾配ゲルを作製し、PCR product を濃度勾配と平行に泳動したところ、正常と A549 では明らかに異なった位置にバンドを示した。さらに A549 DNA を正常 DNA

で様々の割合で希釈して PCR を行い DGGE を行ったところ、前者が 1 に対して正常 DNA が 16 倍存在下でも異常バンドが観察された。

2. ヒト胆道癌における *K-ras* 遺伝子の変異

K-ras codon 12, 13 の変異はヒト腫瘍で最も高い頻度で検出される癌遺伝子の異常である。その頻度は腫瘍の種類によって異なり、膀胱癌、大腸癌、肺癌では高いが、肝癌、乳癌、腎癌では低い。一方、胆道癌の *K-ras* 変異については、報告者によってまちまちで、0% から 100% まで大きな開きがある。我々はこの差は検出方法の感度の違いによるものと考え、GC-clamped PCR DGGE 法で検討した。材料は 1979 年から 1991 年までの手術および剖検材料で、いずれもパラフィンブロックとして保存されていたものである。その内訳は腫瘍 46 例（胆道癌 22 例、胆道腺腫 1 例、胆のう癌 18 例、胆のう腺腫 5 例）、腫瘍様病変 10 例（腺腫様過形成 8 例、コレステロールポリープ 1 例、腺腫様胆のう炎 1 例）及び過形成 10 例である。これらの診断基準は WHO 分類に基づいた。これらのパラフィンブロックから 5 μ m の連続切片を作製して、1 枚を H-E 染色し、もう一枚から実体顕微鏡下で腫瘍細胞に富んだ部分を注射針でくり抜いた。これらを template として PCR を行ったところ、いずれの試料からも予測された 148bp のバンドが増幅された。次に PCR product を DGGE で解析し、異常が見られた試料については oligonucleotide dot blot hybridization 法により、*K-ras* codon 12 の塩基配列を決定した。その結果、胆道癌では 46 例中 22 例 (47.8%)、胆のう癌では 18 例中 6 例 (33.3%) に変異が見られ、それらは主に glycine \rightarrow serine への変化であった。また、一つの腫瘍で 2 種類の変異が見られた例や、原発巣と転移巣で *K-ras* 変異が異なった例も見られた。これらのことは、一つの癌が *K-ras* に関して異なった遺伝子型を持つ癌細胞から構成されていることを示している。一方、胆のう腺腫でも 5 例中 3 例で *K-ras* 変異が見られたことから、この異常は必ずしも悪性の指標にはならないことが明らかになった。また、*K-ras* 変異の有無は様々な病理学的、臨床的パラメーターとは相関しないことが判明した。

3. 粘液産生膀胱癌と通常型膀胱癌の *K-ras*, *p53* 遺伝子

粘液産生膀胱癌は Vater 乳頭からの粘液の漏出、尿管の著しい拡張、浸潤・転移がまれなこと、予後良好なことが特徴で、病理像、臨床像が通常型膀胱癌と大きく異なる。このような違いは、それぞれに関与する癌関連遺伝子の差によるものと考えられる。通常型膀胱癌に関しては、*K-ras* codon 12 の変異がほぼ 100% の例で検出されることが知られている。しかし、粘液産生膀胱癌の *K-ras* については報告が乏しく、また *p53* についての報告はない。我々は粘液産生膀胱癌 16 例と通常型膀胱癌 20 例について GC-clamped PCR-DGGE 法により *K-ras*, *p53* の変異を検索した。これらはいずれもパラフィンブロックとして保存されていた病理標本で、上記と同様に実体顕微鏡下で腫瘍細胞に富んだ部位をくり抜き、それを PCR template として使用した。*p53* に関しては exon 5 から exon 8 までをそれぞれ増幅して検索した。その結果、*K-ras* codon 12 の変異は粘液産生型 16 例中全例に、通常型 20 例中 19 例に検出された。一方、*p53* の変異は通常型の 4 例 (20%) に検出されたが、粘液産生型では全例陰性であった。

p53 変異の検出された4例については PCR product を TAクローニングベクターに組み込み、塩基配列を決定した。その結果、3例に codon 272, 273 の misse sense mutation が見られ、他の1例では codon 285-286 の 1 base deletion であった。また、p53 の免疫染色では、misse sense mutation を示した通常型3例で陽性であったが、粘液産生型 16 例を含む他の例ではいずれも陰性であった。

4. ラット肝発癌における p53 変異

ヒト肝癌では p53 変異が高頻度に見られ、しかも地域によってその codon が異なることが報告されている。これは発癌因子の差によるものと考えられる。ラット肝化学発癌は多段階発癌モデルとして古くから解析されており、p53 変異に関して発癌剤の種類による影響のみでなく、initiation/promotion/progression のいずれの段階で関与するかについても解析できるものと期待される。我々は Solt & Farber 法にて誘発した前癌結節、肝癌組織および肝癌細胞株から mRNA を抽出し、RT-PCR 法により exon 4-6, exon 6-10 の範囲を増幅して DGGE 法により解析した。さらに、変異が見い出された試料については sequencing を行い、塩基配列を決定した。その結果、前癌結節 12 例、肝癌 6 例ではいずれも p53 変異は検出できなかった。しかし、肝癌細胞株では 10 株中6株で p53 変異が認められた。次に 3'-Me-DAB, MNU, aflatoxin B1, DEN の4種類の発癌剤で誘発した肝癌、肝前癌病変についても解析を行った。これらの材料についてはホルマリン固定、パラフィン包埋し、病変部を組織切片からくり抜いて検索した。ラット p53 遺伝子については exon 5 と exon 6 が融合していることがわかったため、この両 exon を同時に増幅した。しかし、これらの肝病変 58 例については、p53 変異は全く検出できなかった。以上の結果は、p53 変異は肝癌細胞株の樹立時に生じたものと考えられ、ラット肝発癌への p53 の関与は乏しいものと考えられた。

5. ラット肝発癌における K-ras 変異

ラット肝癌では K-ras codon 12 の変異が報告されているが、その頻度は報告者によって著しく異なっており、また検出方法もまちまちである。そこで上記の4種類の発癌剤で誘発した肝癌および前癌病変についてパラフィン切片から病変部をくり抜き、DGGE 法により K-ras codon 12 の変異を検索した。その結果、3'-Me-DAB で誘発した肝癌では 49 個中4個に、aflatoxin B1 で誘発した肝癌では 13 個中1個に K-ras codon 12 の変異が検出された。これに対して、DEN, MNU による肝癌 31 個、前癌結節 38 個では全例で K-ras 変異は検出できなかった。したがって、ラット肝癌では K-ras codon 12 の変異は一般に低頻度で、しかもそれは発癌剤の種類によって異なることが明らかになった。

6. マウス胎児線維芽細胞の不死化と p53

マウス細胞は in vitro で自然に不死化しやすいことが知られている。それは一部の少数細胞に何らかの突然変異が生じるためと考えられているが、未だ詳細は不明である。この過程での p53 については、変異が高頻度に見つかるというものとほとんどないという正反対の報告

である。我々はこの点をマウス p53 の intron の polymorphism を利用して検索した。すなわち、我々は C3H と DBA2 マウスでは intron 1 の塩基配列が一部異なっていることを偶然発見した。そこで C3H x DBA2 F1 マウスから 3T3, 3T6, 3T12 などの不死化細胞株を多数樹立し、これらについて p53 LOH を検討した。方法は polymorphic sequence を含む領域を PCR で増幅し、ポリアクリルアミドゲル泳動、エチジウムブロマイド染色したのち、母または父由来のバンド有無により LOH を判定した。この結果、59 株中 1 例のみに p53 LOH が認められた。さらにこれら細胞株について各 p53 exon を増幅し、DGGE 法により mutation の有無を検索したところ、LOH を示した 1 例以外は全て p53 遺伝子は正常であることが明らかになった。したがって、マウス線維芽細胞の自然不死化には p53 の不活性化は関与しないことが判明した。

[総括と反省]

GC-clamped PCR DGGE 法はパラフィン包埋ヒト腫瘍の突然変異の検出に有効であることが証明された。材料は古いものほど PCR のかかりが悪くなる傾向が見られたが、今回使用した中で最も古いもので 1979 年のものであり、上記の目的に十分かなうものであった。この方法の実施に当たって今回の研究から気付いた点を上げると以下のとおりである。

- ① 正常 DNA を用いて PCR の条件を十分検討し、目的以外の非特異的バンドが出現しない条件を選ぶことが大切である。非特異バンドがあると DGGE の結果の判定がきわめて難しくなる。
- ② それぞれの種類別の PCR fragment については必ず perpendicular DGGE を行い、parallel DGGE での gradient 濃度範囲を決定しておく必要がある。また、parallel DGGE についても泳動時間を種々変えて最も適当な条件を選ぶことが大切である。
- ③ DGGE で変異が検出された材料については再度、PCR からくり返し、結果に再現性が有るか否かを確認すべきである。
- ④ コンタミネーションを防止するために、試薬や器具の取り扱いには十分注意を払う必要がある。
- ⑤ 腫瘍組織については間質成分が混在すると、wild type のバックグラウンドが強くなるため、変異があっても検出できないことがある。したがって、顕微鏡下で腫瘍細胞成分をくり抜き、enrichment を行うことが望ましい。
- ⑥ DGGE 法は変異の有無を判定する方法であるから、塩基配列を決定する手段を準備しておく必要がある。その方法としては DNA sequencing (ベクターを使用する方法と direct sequencing)、oligonucleotide hybridization が考えられるが、これらは目的により適宜、使い分ける。
- ⑦ 最近、DGGE を簡素化した CDGE が報告されており、条件設定を十分行くと DGGE に匹敵する検出感度を持つとされている。この方法は gradient を作製する必要がないため、gel の作製が DGGE よりはるかに容易となるので今後、この方法の応用を検討する必要がある。