

遺伝子班報告

班長 馬場正三

遺伝子班の研究テーマとして昨年あげた、二つのテーマについての進展状況を報告する。

① 大腸癌における K-*ras*, p53 遺伝子変異と癌の進展・予後の解析

② 家族性大腸癌 (HNPCC) 家系集積を行い、多重癌の特性を解析する

研究テーマ①については、班員小林らは大腸癌 54 例について、肝転移群と非転移群で K-*ras*, p53, DCC の遺伝子異常を新鮮大腸癌切除標本材料を用い検索し、DCC LOH 検出例, K-*ras* 点突然変異非検出例は肝転移高危険群であることを認め、p53 の下流の細胞周期調節遺伝子である p21^{CIP1/WAF1} の mRNA 発現低下を高率に認めた。

研究テーマ②の HNPCC の原因遺伝子がクローニングされ、RER が比較的容易に検索できるようになったので、テーマ①との整合性を考え、一般大腸癌、多発癌、HNPCC の多数症例を対象として、RER と LOH を同時に測定可能にする autosequencer による解析方法を開発した。

Replication Error(RER) および Loss of Heterozygosity(LOH)の蛍光自動分析法による検出

1. ゲノム DNA の調整

DNA サンプルは、摘出した癌組織および正常組織、あるいは同一患者の血液から DNA を抽出した。すなわち、組織 100mg を細切し、10mM Tris, 10mM EDTA 溶液, 10% SDS 溶液, Proteinase K および RNase を加えて、37°C で一夜

インキュベートした。インキュベート後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、エタノールによりゲノム DNA を沈殿させ、適量の TE 緩衝液に溶解した。また、血液細胞については、抗凝固剤として EDTA・2Na を採血時に添加し、0.2% NaCl で赤血球を低張溶血させ、有核球成分を回収した。このあと、前出の同様の操作を行いゲノム DNA を抽出した。

2. マイクロサテライト領域の PCR

調整した DNA の 50ng をテンプレートとして、2 番染色体短腕 (D2S123), 3 番染色体短腕 (D3S1067), 17 番染色体短腕 (TP53) の各マイクロサテライト領域を GT-strand のみ蛍光標識したプライマーセットによりおのおのべつべつに PCR 増幅させた。PCR は、ロボサイクラー 40 (日本 Genetics 社) を用いて、denature: 62°C 1 分, annealing: 58°C 2 分 (TP53: 62°C), extension: 72°C 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクル行った。

3. Autosequencer による解析

PCR 後、反応液 4μl に同量のホルムアミドを添加し、95°C で 5 分間熱変性したのち、Alfred Auto-Sequencer (Pharmacia) にて電気泳動、解析を行った。RER および LOH の判定は Fragment-manager を用いて、ピーク面積の比較により行った。

本年度は、この方法を用い 5 年生生存率が判明している症例について p53 の LOH, RER との関連

を検討する。

テーマ②に関しては第43回大腸癌研究会の際に、日本癌病態治療研究会の先生がたにアンケートを送り、HNPCCの集計を行った。日本癌病態治療研究会会員57施設から回答を得た。大腸癌症例は109症例であった。初年度調査として、大腸癌研究会に入会している日本癌病態治療研究会各施設に調査用紙を送付し、調査を依頼した。

今年度調査として、大腸癌研究会に所属していない本研究会全員に同様の調査を依頼する予定である。

考 察

大腸癌の予後因子として、LOHのような大きなDNA異常のある癌と、mismatch repair geneの異常によるpoint mutationによる発癌に起因する大腸癌に差のあることが予想される。これを多数例により解析すると同時に、p53の変異の有無による抗癌剤感受性の差が術後のadjuvant chemotherapyの指標となりうるかは重要な問題である。去年行ったp53変異と抗癌剤感受性に関するアンケート調査の結果では、いずれも少数例

の解析で、結果は相反するものが相なればなる状態であり、多数例解析による結論を出さねばならない問題である。初年度はAutosequencerによるRER、LOHの解析法を開発できたので、本年度これによる多数例の解析を行いたい。

今回のHNPCCの調査で明らかになったのは、わが国では男性ではなおsecond primaryの第1位は胃癌であり、女性では子宮体部癌であるという、興味ある所見である。

HNPCCに合併する大腸癌は一般大腸癌に比し、poorly adenocarcinoma, mucinous adenocarcinomaの頻度は高いにもかかわらず、比較的良好な予後を示している。また、大腸癌癌巣にリンパ球浸潤が高度であることが知られており、HNPCCの患者の個体側の解析としてHLA遺伝子を追及する必要がある。また、HNPCCのRERは80%以上であるが、家族歴のない多重癌でも、RER50%程度に認められている。RER(+)を指標にした予防的大腸切除術も考量する必要がある。

(文責 馬場正三)