

Specific Detection of c-erbB-2 mRNA Expression in Endoscopic Biopsy Specimen of Gastric Cancers by the Polymerase Chain Reaction Following Reverse Transcription

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8524

逆転写反応および特異的 DNA 増幅反応法を用いた胃癌の内視鏡的生検組織における *c-erbB-2* mRNA の特異的検出

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

二 宮 致

逆転写反応 (reverse transcription, RT) および特異的 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法を用いた mRNA の特異的検出方法により胃癌における *c-erbB-2* mRNA の発現を調べ、胃癌における予後の予測因子としての有用性を検討した。ヒト胎児肺繊維芽細胞 (human embryonic lung fibroblast, HEL), ヒト胃癌培養細胞 MKN-7, ヒト成熟胎盤, ヒト胃癌切除組織24例, 内視鏡的生検組織24例より全 RNA を抽出し, AMV 逆転写酵素とアンチセンスプライマー ERB-3 を用いて *c-erbB-2* mRNA に対する cDNA (*c-erbB-2* cDNA) を合成した。 *c-erbB-2* cDNA は, PCR プライマー ERB-2 および ERB-3 を用いた PCR 法によって増幅後サザンプロット法にて解析した (RT-PCR 法)。その結果, HEL 細胞では 12ng, MKN-7 細胞では 100pg の全 RNA より *c-erbB-2* mRNA の検出が可能であった。MKN-7 細胞の *c-erbB-2* mRNA の発現量は, HEL 細胞に対し72.6倍であった。24例の胃癌切除標本においては, 成熟胎盤に比し2倍以上の *c-erbB-2* mRNA の発現が認められた症例は3例あり, これらの症例ではいずれも免疫組織染色によって *c-erbB-2* タンパクの染色性が確認された。また24例の胃癌症例の内視鏡的生検組織における *c-erbB-2* mRNA 発現量と術後の臨床病理学的所見を比較したところ, *c-erbB-2* mRNA 発現量が多い症例ではリンパ節転移が認められる傾向があった。以上より RT-PCR 法を用いる mRNA の特異的検出は, 高い検出感度と定量性を有していた。本法は, 少量の胃癌の内視鏡的生検材料に適用可能であり術前に胃癌進行度を診断するために有用な方法であると考えた。

Key words *c-erbB-2* mRNA expression, polymerase chain reaction, reverse transcription, gastric cancer, endoscopic biopsy

近年の胃癌に対する治療の進歩はめざましく死亡率は年々減少している¹⁾。その理由としては, 診断術の向上, 外科手術および化学療法の進歩が考えられる²⁻⁴⁾。特に早期胃癌は, 胃癌全体の約30-35%を占め, 90%以上の5年生存率が得られるようになってきた²⁵⁾。早期胃癌のリンパ節転移率は11-13%であり⁵⁻⁷⁾、大半の症例は, 病巣の局所切除や内視鏡的治療によっても根治可能である。しかし実際のところ, 術前の画像診断では, 癌の微小転移巣の検出は不可能であり, 定型的な領域リンパ節の郭清を伴った胃切除術が標準術式として行なわれている⁷⁾。即ち胃癌の予後を左右する因子であるリンパ節への微小転移の有無を予知することにより, 症例に応じた適切な治療法の選択が可能となる。近年胃癌における種々の遺伝子異常と癌の悪性度の関係が注目されている。本研究では, 胃癌の悪性度を規定する癌遺伝子として *c-erbB-2* 遺伝子に注目し, 逆転写反応 (reverse transcription, RT) および特異的 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法を応用した微量の内視鏡的生検組織における *c-erbB-2* 遺伝子発現の検出法を開発し, その有用性を検討した。

材料および方法

1. 培養材料

本研究ではヒト胃癌培養細胞として MKN-7 (福島医科大学

第二病理学教室鈴木利光先生より供与), および非腫瘍性細胞としてヒト胎児肺繊維芽細胞 (human embryonic lung fibroblast, HEL) (金沢大学がん研究所ウイルス部田中淳之博士より供与) を用いた。各細胞の培養には 10% (V/V) 非燻化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO, Grand Island, NY, USA) と 0.3mg/ml グルタミン (日本製薬, 東京) を含む RPMI-1640 培地 (ニプロ, 大阪) を用い, 5% CO₂ 濃度, 37℃ の条件下で培養した。対数増殖期に, 0.02% トリプシン (GIFCO, Detroit, Mich., USA)-0.2% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) を含む 0.15M リン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline, PBS) を用いて細胞を剥離し, さらに 0.15M PBS にて2回洗浄し, 得られた細胞浮遊液を 1,000rpm 10分間遠心して細胞を単離し, 全 RNA を抽出した。臨床材料として1990年4月から1993年4月までに金沢大学医学部附属病院第二外科にて手術を施行された胃癌症例24例の癌部組織および1991年4月より1993年4月までに金沢大学医学部附属病院第二外科にて上部消化管内視鏡検査の施行された胃癌症例24例より得られた胃癌の内視鏡的生検組織を用い, RT-PCR 法により *c-erbB-2* mRNA の発現を検討した。組織の採取は生検鉗子を用いて行い, 1症例あたり3-4個の組織を採取した。遺伝子発現の比較対象としては, 成熟胎盤を用いた。全ての組織は採取直後に液体窒素を用いて瞬間凍

平成5年12月15日受付, 平成6年1月19日受理

Abbreviations: AGPC, acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform; dATP, deoxyadenosine 5'-triphosphate; dCTP, deoxycytidine 5'-triphosphate; dGTP, deoxyguanosine 5'-triphosphate; dTTP, deoxythymidine 5'-triphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGFR, epidermal growth factor

結し、使用するまで -80°C にて凍結保存した。切除胃癌の一部は10%緩衝ホルマリン液にて固定し、胃癌取扱い規約⁸⁾に従って病理組織学的診断用の標本を作成した。上部消化管内視鏡検査の施行された24例は、後に金沢大学医学部附属病院第二外科にて手術を施行し、その臨床病理学的事項については胃癌取扱い規約⁸⁾に準じて記載分類し表2に示した。

II. 全 RNA の抽出

RNA の抽出は、グアニジン酸・フェノール・クロロホルム (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform, AGPC) 法を用いて行った⁹⁾。凍結した組織は、メスを用いて細切後、4ml のグアニジンチオシアネート (guanidine thiocyanate, GTC) 溶液 [4M GTC (和光純薬工業, 大阪), 25mM クエン酸ナトリウム, 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム, 0.1M 2-メルカプトエタノール] 中で破碎懸濁した。また細胞は、4ml の GTC 溶液中にて十分に懸濁させた。懸濁した試料に 400 μl の 2M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.0) を加え攪拌した。さらに 4ml の飽和フェノールを加え攪拌した後、800 μl のクロロホルムを加え、攪拌後水中に15分間静置した。氷冷後 4°C , 7,000rpm, 20分間遠心した。水層に 4ml のイソプロパノールを加え、 -20°C に1時間放置した後 4°C , 7,000rpm の条件下で20分間遠心し、RNA を沈澱させた。得られた RNA は 500 μl の GTC 溶液に溶解した。さらに等量のイソプロパノールを加え、 -20°C に1時間放置した後 4°C , 7,000rpm で20分間遠心し、RNA を再度沈澱させた。RNA は、80%のエタノール 1ml で洗った後、滅菌蒸留水に溶解した。各 RNA の 260nm における吸光度 (optical density, OD) を測定し、1OD を 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として RNA 濃度を計算した。

III. プライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドの作成

183塩基対のヒト *c-erbB-2* 遺伝子 cDNA を特異的に増幅する PCR プライマーとして ERB-2 (3424-3443): 5'-GATGTATT-TGATGGTGACCT-3' と ERB-3 (3587-3606): 5'-ATCTGG-CTGGTTCACATATT-3', およびプローブ用オリゴヌクレオチドとして ERB-11 (3488-3517): 5'-ACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGG-3' をヒト *c-erbB-2* 遺伝子 cDNA の塩基配列¹⁰⁾より選定した。また98塩基対のヒト β -アクチン遺伝子 cDNA を特異的に増幅する PCR プライマーとしては β -ACT-4 (2233-2252): 5'-ATCACCATTGGCAATGAGCG-3' と β -ACT-5 (2406-2425): 5'-TTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3', およびプローブ用オリゴヌクレオチドとして β -ACT-6 (2265-2284): 5'-TGAGGCACTCTCCAGCCTT-3' をヒト β -アクチン遺伝子配列¹¹⁾より選定した。プライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドは、DNA 合成装置 PCR メイト (Applied Biosystems, CA, USA) により合成した。プローブ DNA 13pmol に対し [γ - ^{32}P] ATP 50 μCi (Amersham, Greenwich, CT, USA), ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM 塩化マグネシウム, 5mM ジチオトレイトール, 0.1mM スペルミジンおよび 0.1mM EDTA (pH8.0)], 10単位 T4 キナーゼ (宝酒造, 京都) および滅菌蒸留水を加え全量 20 μl とし、 37°C において45分間反応させ 5' 末端標識した後、ハイブリダイゼーションに用いた。

IV. 逆転写 (RT) 反応

全 RNA は、イースト RNA を用いて段階希釈した。各 RNA サンプルを 95°C 5分間加熱した後水中にて急冷し、mRNA の高次構造を崩した。さらに PCR 反応緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム, 0.01%ゼラチン (Sigma, ST. Louis, MO, USA), 0.05% ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (和光, 大阪)], デオキシリボヌクレオチド混合液 [デオキシアデノシン三リン酸 (deoxyadenosine 5'-triphosphate, dATP), デオキシングアノシン三リン酸 (deoxyguanosine 5'-triphosphate, dGTP), デオキシシチジン三リン酸 (deoxycytidine 5'-triphosphate, dCTP), デオキシチミジン三リン酸 (deoxythymidine 5'-triphosphate, dTTP) 各 125 μM], 5mM ジチオトレイトール, RNA 分解酵素阻害因子 (Ribonuclease inhibitor, RNasin) (Promega Biotec, Madison, WI, USA) 4単位, ニワトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素 (avian myeloblastosis virus reverse transcriptase) 1単位, 50pmol のアンチセンスプライマーである ERB-3 または β -ACT-5 を加え、滅菌蒸留水により全量 20 μl に調整した。室温にて10分間放置し mRNA にアンチセンスプライマーを結合させたのち、 42°C において60分間反応させ、cDNA を合成した。

V. PCR 反応

逆転写反応により得られた cDNA 溶液を 95°C において5分間加熱処理し逆転写酵素を失活させた後、デオキシリボヌクレオチド (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 各 225 μmol , センスおよびアンチセンスプライマー各 50pmol, Taq DNA ポリメラーゼ 2.5単位 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) を含む 80 μl の PCR 反応緩衝液を加え、全量 100 μl に調整した。加熱の際に起きる反応液の蒸発を防ぐため、反応液に 50 μl のミネラルオイル (Sigma) を重層した。反応には DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus) を使用し、熱変性を 94°C , 1分間, アニーリングを 48°C , 2分間, DNA の伸長を 72°C , 1分間とし、これを1サイクルとして、25サイクル繰り返した。反応終了後、クロロホルム 150 μl を加え振とうし、上層の PCR 反応溶液を採取した。

VI. 増幅 DNA 断片の検出

増幅後の DNA 溶液に 10 μl の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および 300 μl のエタノールを加え、 -80°C , 30分間放置した後、 4°C , 15,000rpm にて20分間遠心し、DNA を沈澱させた。DNA は、80%エタノール 300 μl にて洗浄した後、滅菌乾燥し、試料溶解液 (0.06% ブロムフェノールブルー, 0.06% キシレンシアノールおよび6.7% グリセロールを含むトリス-EDTA (TE) 緩衝液) 9 μl に溶解した。各試料は 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エチジウムブロマイドを含む泳動緩衝液 (40mM トリス, 20mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA, pH7.2) 中、定電圧 100V において2.5%アガロースゲルで電気泳動を行った。泳動後のゲルは、紫外線照射下に写真撮影を行った後、サザン法¹²⁾に準じて転写を行った。即ち、泳動終了後のゲルをアルカリ変性液 (0.5M 水酸化ナトリウム, 1.5M 塩化ナトリウム) 中で30分間振とうし DNA を変性させた後、中和液 (3M 塩化ナトリウム, 0.5M Tris-HCl,

receptor; GTC, guanidine thiocyanate; HEL, human embryonic lung fibroblast; OD, optical density; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcription; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, saline-sodium citrate; TBS, tris-buffered saline

pH7.2) 中で15分間振とうした。中和操作を2回繰り返した後、DNA は 20×食塩・クエン酸ナトリウム (saline-sodium citrate, SSC) (3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸ナトリウム) を用いてナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N, Amersham) に転写した。転写の終了したナイロンメンブレンフィルターに10分間紫外線を照射して、DNA をフィルターに固定した。フィルターはハイブリダイゼーション緩衝液 [6×SSC, Denhardt's 液¹³⁾ (0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% ウシ血清アルブミン, 0.1% フィコール400), 10% 硫酸デキストラン, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), および 0.1mg/ml サケ精子 DNA] 中、恒温水槽において1時間のプレハイブリダイゼーションを行った。その後、0.05% (V/V)³²P 標識プローブを加え、16時間のハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションは、プローブ ERB-11 に対しては55℃、プローブ β -ACT-6 に対しては48℃で行った。ハイブリダイゼーション後のフィルターは 2×SSC および 0.1% SDS を含む溶液中で、15分間2回の洗浄を行ない、引き続き 0.1×SSC および 0.1% SDS を含む溶液中で1時間の洗浄を行った。洗浄の温度は、プローブ ERB-11 に対しては55℃、プローブ β -ACT-6 に対しては48℃で行った。洗浄後X線フィルム (Kodak, New York, USA) を用いて-80℃にて4-5時間の感光を行った。PCR 増幅 DNA 断片に相補結合したプローブの放射活性を、バイオイメージアナライザー (富士フィルム, 東京) により測定した。

VII. *c-erbB-2* タンパクの免疫組織染色

c-erbB-2 タンパクに対する免疫組織染色はビオチン標識ストレプトアビジン (labelled streptavidin-biotin, LSAB) 法にて行った。ホルマリン固定した24例の胃癌切除標本は、パラフィン包埋し、4 μ m に薄切脱パラフィン処理した。1%過酸化水素添加無水メタノールにて20分間処理後、10倍希釈の正常ヤギ血清を20分間反応させた。次に一次抗体として20倍希釈の *c-erbB-2* タンパクに対するポリクローナル抗体 (Triton Bioscience Inc., Alameda, CA, USA) を4℃、24分間反応させた後、トリス緩衝食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) にて10分間3回洗浄した。二次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG (DAKO corporation, Carpinteria, CA, USA) を100倍希釈して30分間反応させた。TBS にて10分間3回洗浄後、100倍希釈のペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DAKO corporation) を30分間反応させた。TBS にて10分間3回洗浄後、1%過酸化水素加0.03%ジアミノベンチジン (diaminobenzidine, DAB) で20-30分間発色反応を行った。水洗後0.3%メチルグリーン染色し封入した。細胞膜に明瞭な染色性を示す例を陽性と判定した。各症例の *c-erbB-2* タンパク発現程度を強陽性++, 陽性+, 陰性-に分け表1に示した。

VIII. 統計学的検討

c-erbB-2 mRNA 発現量と臨床病理所見との相関の検定には、スピアマン検定法 (Spearman test) を用い、危険率5%未満を有意な相関、10%未満を傾向ありとした。

成 績

1. ヒト培養細胞における *c-erbB-2* および β -アクチン mRNA の発現

ヒト胃癌培養細胞 MKN-7 と非腫瘍性細胞 HEL における

c-erbB-2 および β -アクチン mRNA の発現を観察するために、各細胞由来 RNA の段階希釈系列を作成し、RT-PCR を施行した。アガロースゲル上で電気泳動後、各 PCR 産物をエチジウムブロマイド染色法により解析した結果、ERB-2 および ERB-3 のプライマーペアでは *c-erbB-2* mRNA 由来の183塩基対の増幅 DNA 断片が検出され、 β -ACT-4 および β -ACT-5 のプライマーペアでは β -アクチン mRNA 由来の98塩基対の増幅 DNA 断片が検出された (図1)。プローブ (ERB-11 または β -ACT-6) を用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法により、増幅 DNA 断片の解析を行った。その結果 HEL および MKN-7 とともに鋳型 RNA 量に比例した *c-erbB-2* または β -アクチン mRNA 由来増幅 DNA 断片が単一バンドとして検出された。一方試料 RNA の希釈に用いたイースト RNA からは PCR 増幅産物は検出されなかった。また同時に反応液中に逆転写酵素を添加せずに HEL および MKN-7 の全 RNA に対して RT-PCR を施行したところ増幅 DNA 断片は検出されず、

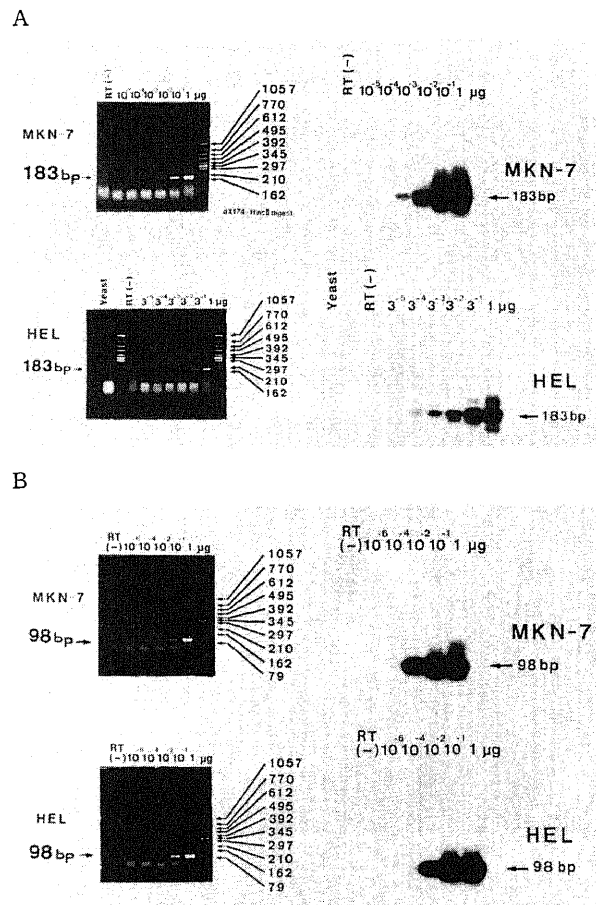


Fig. 1. Southern analysis of *c-erbB-2* (A), and β -actin (B) mRNA reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products from serial dilutions of human embryonic lung fibroblasts (HEL) and MKN-7 total RNA. In Fig. 1 A and B, the left figures show the photographs of agarose gel after electrophoresis of each RT-PCR product and the right figures are the results of the Southern analysis. RT (-) indicates that the sample was subjected to RT-PCR without reverse transcriptase. The ϕ ×174 DNA digested with HincII as DNA size marker was run on the same gel; the numbers from 79 to 1057 (bp, base pair) indicates the size of each DNA fragment.

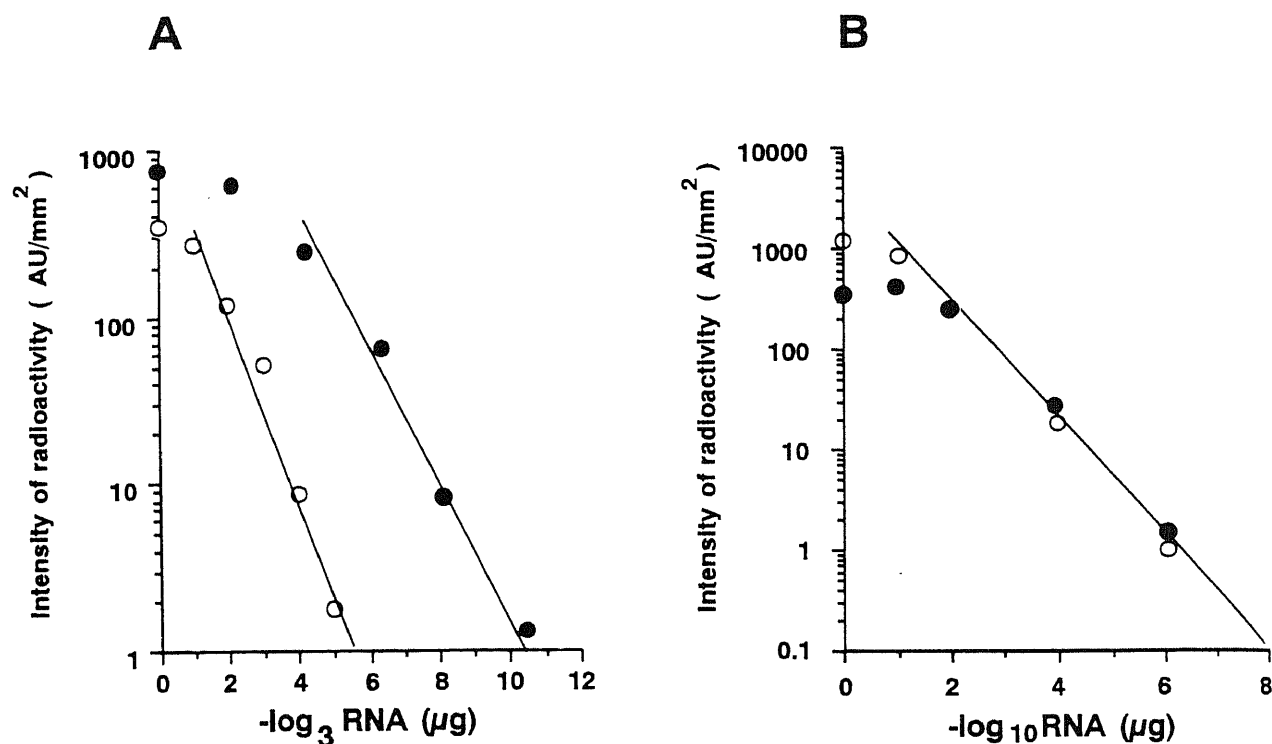


Fig. 2. Plot of radioactivity of PCR products from HEL (○) and MKN-7 (●) using the intensity of the hybridization signals in Fig. 1. The radioactivities of the PCR products shown in Fig. 1 were analyzed using a Fujix Bioimage analyzer and described in arbitrary units (AU) per mm². The radioactivity was plotted against the concentration of total RNA as template. A shows the expression level of the *c-erbB-2* and B shows that of *β-actin* gene.

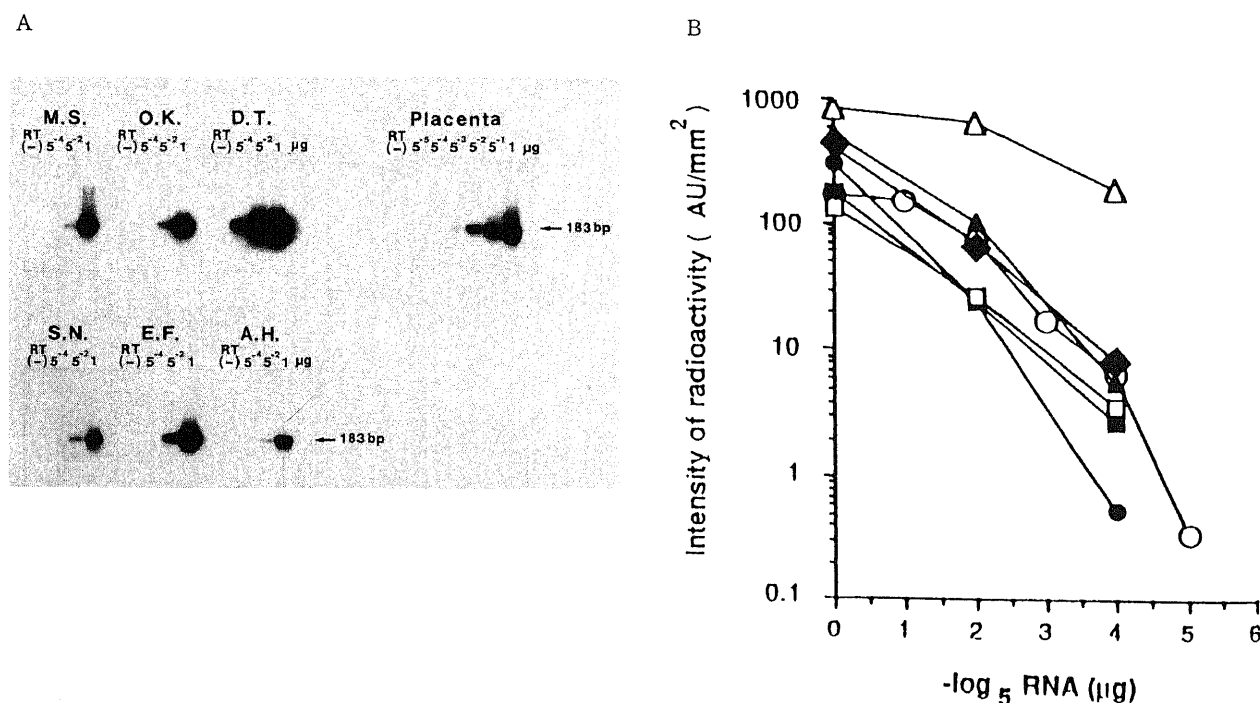


Fig. 3. Detection of *c-erbB-2* mRNA expression by the RT-PCR method from gastric cancer tissue. A, Total RNA from surgically resected gastric cancer tissue and mature placenta was diluted ranging from 5⁻⁶ to 1 μg in yeast total RNA. Each sample was transcribed and amplified by 25 cycles of PCR, then the amplified cDNA was hybridized to the probe ERB-11. RT (-) indicates that the sample was subjected to RT-PCR without reverse transcriptase. Abbreviation: bp, base pairs. B, The radioactivities of the PCR products shown in A were analyzed using a Fujix Bioimage analyzer and described in arbitrary units (AU) per mm². The radioactivity was plotted against the concentration of total RNA as template. ○, placenta; ●, case (M.S.); ■, case (A.H.); ▲, case (E.F.); □, case (S.N.); △, case (D.T.); ◆, case (O.K.).

本法で検出された DNA 断片は RNA 試料中に混入したゲノム DNA より増幅されたものではなく mRNA より逆転写された cDNA に由来することが確認された。 *c-erbB-2* mRNA の検出は、HEL では約 $3^{-4}\mu\text{g}$ (12ng), MKN-7 では約 $10^{-4}\mu\text{g}$ (100pg) の全 RNA より可能であった。検出された PCR 産物量は相補結合したプローブ DNA の放射活性を測定することにより定量した。両対数グラフの横軸に鋳型とした全 RNA 量、縦軸に検出された PCR 産物量をプロットすると両者は直線関係となり、直線の傾きは HEL と MKN-7 において同じであり本法の高い定量性が示された。これにより MKN-7 は HEL に比べ 72.6倍の *c-erbB-2* mRNA を過剰発現していることが確認された。一方遺伝子発現の内部標準とした β -アクチンの発現量に差は認められなかった (図 2)。

II. 臨床胃癌組織における *c-erbB-2* mRNA 発現の RT-PCR による解析

1. 胃癌切除標本における発現

手術的に摘出された胃癌症例24例の胃癌組織およびヒト成熟胎盤より抽出した全 RNA を段階希釈し RT-PCR を行い、 *c-erbB-2* および β -アクチン mRNA の発現を検討した (図 3)。胃癌組織24例全例において *c-erbB-2* mRNA に由来する増幅 DNA 断片が検出された。検出された PCR 産物量を相補結合したプローブ DNA の放射活性により測定し、各症例の成熟胎盤に対する *c-erbB-2* および β -アクチン mRNA 発現量を比較した。各症例における *c-erbB-2* mRNA の発現量を β -アクチン mRNA 発現量で補正した結果、24例中4例 (16.7%) に *c-erbB-2* mRNA 過剰発現が確認された。それら4例の *c-erbB-2*

mRNA 発現は成熟胎盤に比べて各々1.75倍, 2.25倍, 14.1倍および22.8倍過剰であった (表 1)。パラフィン包埋標本の免疫組織染色により *c-erbB-2* タンパク発現を調べた結果では、 *c-erbB-2* タンパク発現は24例中3例 (12.5%) に観察された。 *c-erbB-2* タンパク発現を認めた3例 (第1, 2および3症例) は

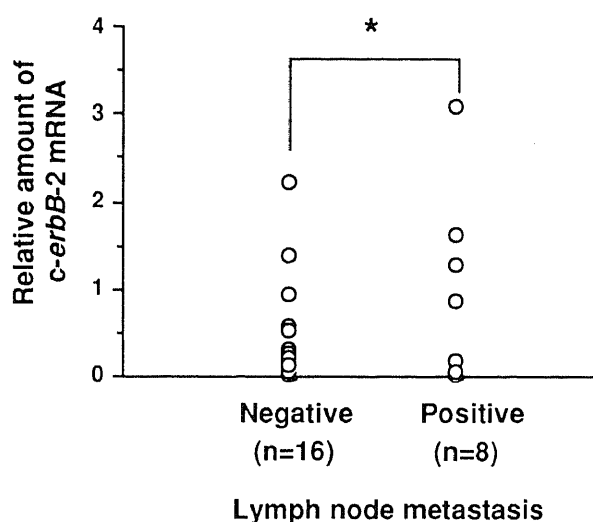


Fig. 4. Comparison of lymph node metastasis and *c-erbB-2* mRNA expression examined from endoscopic biopsy specimen. The relative amount of *c-erbB-2* mRNA were analyzed by the RT-PCR method and standardized by that of β -actin as an internal control. * $p < 0.1$ by Spearman test.

Table 1. Comparison of *c-erbB-2* gene expression between the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay and the immunohistochemical assay

Case number	Relative amount ratio of PCR products ^{a)}		Relative amount of <i>c-erbB-2</i> mRNA ^{b)}	<i>c-erbB-2</i> protein immunoreactivity
	<i>c-erbB-2</i>	β -actin		
1 (D.T.)	97.1	4.26	22.8	++
2	18.1	1.29	14.1	++
3	1.62	0.72	2.25	+
4	3.09	1.76	1.75	—
5 (O.K.)	1.62	1.90	0.85	—
6	1.27	2.06	0.62	—
7	0.52	1.00	0.52	—
8	2.24	5.00	0.45	—
9	0.15	0.61	0.26	—
10	3.08	13.1	0.24	—
11 (S.N.)	0.67	4.26	0.16	—
12	2.06	13.1	0.15	—
13 (E.F.)	1.00	6.90	0.15	—
14	2.06	18.1	0.11	—
15	1.00	10.3	0.10	—
16	3.08	13.1	0.10	—
17	1.00	13.1	0.08	—
18	1.00	13.1	0.08	—
19	0.11	3.08	0.04	—
20	0.56	18.1	0.03	—
21 (M.S.)	0.24	6.89	0.03	—
22	0.02	1.00	0.02	—
23	0.02	1.00	0.02	—
24 (A.H.)	0.45	25.0	0.02	—

—, no staining; +, weak staining; ++, strong staining.

^{a)} The relative amount ratio of PCR products in surgically resected samples to that in placenta was calculated with a curve in which radioactivities of PCR products were plotted against total RNA as template, as presented in Figure 3B for *c-erbB-2*.

^{b)} The relative amount of *c-erbB-2* mRNA was standardised by that of β -actin as an internal control.

いずれも RT-PCR 法により成熟胎盤に比し、2 倍以上の *c-erbB-2* mRNA 発現の亢進が観察された症例であった。*c-erbB-2* mRNA 発現が14.1倍および22.8倍亢進していた2症例では、*c-erbB-2* タンパクの染色性は強陽性、2.25倍の症例では弱陽性であり、mRNA 発現量と染色性は一致した。

2. 内視鏡的生検標本における発現

上部消化管内視鏡検査の施行された胃癌症例24例の胃癌組織の内視鏡的生検組織における *c-erbB-2* の発現を同様に検討した。胃癌組織24例全例において *c-erbB-2* mRNA の発現が認められた。各症例における *c-erbB-2* mRNA の発現量を β -アクチン mRNA 発現量で補正した結果、成熟胎盤に対して1倍以上の *c-erbB-2* mRNA 発現の亢進を認めた症例は、24例中5例(20.8%)であった。内視鏡的生検組織における *c-erbB-2* mRNA 発現量を手術施行後の臨床病理組織所見と比較検討した(表2)。各症例の *c-erbB-2* mRNA 発現量とリンパ節転移の有無との相関を検討したところ、有意な相関は認められなかったが、*c-erbB-2* mRNA 発現量の高い症例では、リンパ節転移しやすい傾向が認められた(図4)。

考 察

c-erbB-2 遺伝子は、*v-erbB* 遺伝子や、上皮増殖因子受容体(epidermal growth factor receptor, EGFR) 遺伝子と極めて相同なチロシンリン酸化塩基配列をもつ遺伝子として同定された^{1014)~16)}。*c-erbB-2* 遺伝子は、第17染色体長腕(q21)に位置する¹⁰¹⁷⁾。乳癌¹⁸⁾、唾液腺癌¹⁹⁾、胃癌、大腸癌¹⁸⁾などの腺上皮組織由来の種々のヒト癌において *c-erbB-2* 遺伝子の増幅が確認された。またマウスの非腫瘍性細胞 NIH3T3 に *c-erbB-2* 遺伝子を導入して過剰発現させると形質転換および造腫瘍性の獲得が引

き起こされることが確認され¹⁹²⁰⁾、*c-erbB-2* 遺伝子は、癌遺伝子として注目されるようになった。特に乳癌では、*c-erbB-2* 遺伝子の増幅が10-30%に認められ、遺伝子増幅例は予後不良であるとされている²¹⁾²²⁾。*c-erbB-2* 遺伝子増幅例では、*c-erbB-2* タンパクの過剰発現が認められる²³⁾²⁴⁾。Berger らは、乳癌における *c-erbB-2* タンパク発現の免疫組織染色による検討で *c-erbB-2* タンパク陽性例は、核異型性が強く、リンパ節転移を伴い、予後不良であると報告している²⁴⁾。一方胃癌において *c-erbB-2* 遺伝子の増幅は、5.4-7.8%に認められている¹⁸⁾²⁵⁾。また *c-erbB-2* タンパクに対してポリクローナル抗体を用いた免疫組織学的検討で Yonemura ら²⁶⁾は、*c-erbB-2* タンパク陽性例は260例中31例(11.9%)であり、その染色性は、胃癌の壁深達度、リンパ節転移度、リンパ節転移再発率と相関し、*c-erbB-2* タンパク陽性例は陰性例に比し有意に予後不良であるとしている。特に早期胃癌では、*c-erbB-2* タンパク陽性例は220例中22例(10%)であり、*c-erbB-2* タンパク陽性例は陰性例に比べ、リンパ節転移率が約3倍高率であったとしている²⁷⁾。以上の事実より胃癌における *c-erbB-2* 遺伝子の発現性は胃癌の悪性度、特にリンパ節転移を予測する因子として注目されている。*c-erbB-2* タンパクは、分子量 185kDa のチロシンキナーゼ活性を有する受容体型タンパクである。*c-erbB-2* タンパクのリガンドとしては、分子量約 44kDa の糖タンパクとする考えが有力である²⁸⁾²⁹⁾。Peles ら²⁸⁾、Holmes ら²⁹⁾はこれをそれぞれ neu differentiation factor (NDF)、Heregulin (HRG) と命名したが、同一の物質である事が判明した³⁰⁾。*c-erbB-2* タンパクは細胞膜に位置し悪性度の高い腫瘍細胞では、発現が亢進しているため癌治療における標的としての応用も期待される。近年 *c-erbB-2* タンパクに対するモノクローナル抗体を用いた癌治療実験が試みられている^{31)~33)}。こ

Table 2. Summary of the clinicopathological findings and the *c-erbB-2* mRNA expression examined from endoscopic biopsy specimen in 24 cases of gastric cancer

Case number	Age	Sex	Relative amount of <i>c-erbB-2</i> mRNA ^{a)}	Clinicopathological findings ^{b)}					
				Histology subtype	Depth of invasion	Lymph node metastasis	Hepatic metastasis	Peritoneal metastasis	Stage
1	52	M	3.09	por	ss	n4(+)	H3(+)	P1(+)	N b
2	58	M	2.23	por	sm	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
3	65	M	1.62	por	ss	n4(+)	H3(+)	P1(+)	N b
4	47	F	1.38	sig	sm	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
5	61	M	1.28	tub	pm	n1(+)	H0(-)	P0(-)	II
6	48	M	0.93	tub	m	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
7	49	M	0.85	por	ss	n1(+)	H0(-)	P0(-)	II
8	73	F	0.85	por	sm	n1(+)	H0(-)	P0(-)	I b
9	67	M	0.57	tub	sm	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
10	54	M	0.53	por	se	n0(-)	H0(-)	P2(+)	N b
11	80	F	0.32	tub	sm	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
12	54	M	0.27	sig	m	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
13	75	F	0.25	tub	sm	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
14	73	F	0.20	tub	m	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
15	57	M	0.20	tub	m	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
16	56	F	0.18	tub	si	n4(+)	H0(-)	P0(-)	N b
17	58	M	0.17	por	m	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
18	76	M	0.15	tub	ss	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I b
19	59	M	0.14	por	sm	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
20	77	F	0.05	por	pm	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I b
21	67	F	0.05	tub	si	n4(+)	H0(-)	P1(+)	N b
22	63	M	0.03	sig	m	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I a
23	43	F	0.03	por	ss	n1(+)	H0(-)	P0(-)	II
24	68	M	0.02	por	pm	n0(-)	H0(-)	P0(-)	I b

M, male; F, female; por, poorly differentiated adenocarcinoma; tub, tubular adenocarcinoma; sig, signet ring cell adenocarcinoma; m, tunica mucosa; sm, tela submucosa; pm, tunica muscularis propria; ss, tela subserosa; se, serosa exposed; si, serosa infiltrating; H, hepatic metastasis; P, peritoneal metastasis; n, lymph node; number (0-4), degree of metastasis; (+), positive metastasis; (-), negative metastasis.

^{a)} The relative amount of *c-erbB-2* mRNA in endoscopic biopsy specimen to that in placenta was analyzed by the RT-PCR method and standardised by that of β -actin as an internal control.

^{b)} According to the General Rules for the Gastric Cancer Study by Japanese Research Society for Gastric Cancer⁴⁾.

これらの知見より *c-erbB-2* 遺伝子発現の検索は、癌の悪性度の評価および治療法の選択に有用なものの考えられる。しかしこれまでの臨床癌における *c-erbB-2* 遺伝子に関する報告は、全て切除標本を用いており、術前に *c-erbB-2* 遺伝子の発現性について検討した報告はない。術前に胃癌組織を採取する方法として胃内視鏡を用いた生検があるが、内視鏡的生検組織は小さく、通常の免疫組織染色やノーザンブロット法の材料としては適さない。近年微量の RNA より遺伝子発現を検出する方法として RNA の逆転写により得られた cDNA を PCR により増幅して検出する方法 (RT-PCR 法) が開発され³⁴⁻³⁷⁾、定量的な遺伝子発現の解析法としての有用性が示された³⁸⁻⁴⁰⁾。本研究では、極少量の内視鏡的生検組織における *c-erbB-2* mRNA の発現を RT-PCR 法により解析し検討した。*c-erbB-2* 遺伝子は、EGFR や *c-erbB-3* 遺伝子と極めて相同性の高い遺伝子であるため *c-erbB-2* mRNA 増幅用プライマーとして用いた ERB-2 および ERB-3 は、EGFR や *c-erbB-3* 遺伝子と最も相同性の低い自己リン酸化部位より選定した^{41,42)}。ヒト胎児肺繊維芽細胞 HEL および胃癌培養細胞 MKN-7 由来の *c-erbB-2* mRNA を RT-PCR 法により特異的に増幅後サザンブロットハイブリダイゼーション法により検出し、RT-PCR 法の感度と定量性に関する基礎的検討を行った。両対数グラフの横軸に鋳型とした全 RNA 量、縦軸に検出された PCR 産物量をプロットすると両者は直線関係となり、直線の傾きも HEL と MKN-7 において同じであり本法の高い定量性が示された。MKN-7 における *c-erbB-2* 遺伝子の増幅と過剰発現が報告されているが¹⁷⁾、今回の検討では MKN-7 は HEL に比べ *c-erbB-2* mRNA を 72.6 倍の過剰発現していることが確認された。HEL では $3^{-4}\mu\text{g}$ (12ng)、MKN-7 では $10^{-4}\mu\text{g}$ (100pg) の全 RNA より *c-erbB-2* mRNA の検出が可能であり、本法は極めて高感度であり、極少量の材料に対しても適応可能である事が示唆された。RT-PCR 法では、試料 RNA に混入したゲノム DNA が増幅され、検出されることが懸念される。ゲノム DNA における *c-erbB-2* 遺伝子の完全な塩基配列は未だ解明されていない。本論文には結果を示さなかったが、成熟胎盤由来の DNA をプライマー ERB-2 および ERB-3 を用い PCR 法により増幅した場合、プライマー ERB-3 の直前に 141 塩基対のイントロンが存在することが確認された。以上より本法において試料中に混入した DNA は、検出された増幅 DNA 断片の長さの違いにより区別可能である。胃癌 24 例の切除標本を用いた検討では、全例において *c-erbB-2* mRNA の検出が可能であった。胃癌における *c-erbB-2* mRNA 発現は、成熟胎盤に比べて全体に低レベルであったが、RT-PCR 法にて成熟胎盤に比して 2 倍以上の *c-erbB-2* mRNA の過剰発現が認められた症例では免疫組織染色によっても *c-erbB-2* タンパクの発現が認められた。内視鏡的生検組織は手術摘出組織と比べて微量であるが AGPC 法を用いることにより 3-4 個の生検組織より充分量の全 RNA の抽出が可能であった。症例数が少ないため *c-erbB-2* mRNA 発現量と臨床病理所見との間に、明らかな相関関係は認められなかったが、*c-erbB-2* mRNA 発現量の高い症例では、リンパ節転移が発生している傾向が認められた。

以上より RT-PCR 法を用いた mRNA の特異的検出は、検出感度が高く定量性に優れ、極少量の材料に於いても適用可能である事が示された。本法の胃癌の内視鏡的生検組織への応用は、胃癌のリンパ節転移の術前予測の一助になるものと期待さ

れる。

前癌病変や早期胃癌における遺伝子上の変化を調べることは、発癌のメカニズムの解明や癌の悪性度の診断に重要な意義を持つと思われる。本法は、極少量の内視鏡的生検材料にも適用可能であり、胃内の微小病変における遺伝子発現の解析や、術前の胃癌の進行度の診断予測および治療法の選択に有用であると考えられる。

結 論

c-erbB-2 遺伝子発現の解析法として RT-PCR 法による特異的且つ定量的 mRNA 発現の検出を試行し、感度および定量性について検討を行うと共に、本法により胃癌における *c-erbB-2* mRNA の発現を解析し、その予後予測因子としての有用性を検討した。得られた成績は以下の如くである。

1. プライマーペア ERB-2 および ERB-3 の組み合わせにより 183 塩基対 *c-erbB-2* mRNA 由来の増幅 DNA 断片を得た。
2. RT-PCR 法によりヒト胎児肺繊維芽細胞 HEL では 12ng、ヒト胃癌細胞 MKN-7 では 100pg の全 RNA より *c-erbB-2* mRNA の検出が可能であった。
3. MKN-7 細胞の *c-erbB-2* mRNA の発現量は、HEL 細胞に対し 72.6 倍であった。
4. RT-PCR 法により 24 例の胃癌切除組織における *c-erbB-2* mRNA 発現を観察した。成熟胎盤に比し 2 倍以上の *c-erbB-2* mRNA の発現が認められた症例は 3 例あり、これらの症例ではいずれも免疫組織染色によって *c-erbB-2* タンパクの染色性が確認された。
5. 24 例の胃癌症例の内視鏡的生検組織における *c-erbB-2* mRNA 発現量と術後の臨床病理学的所見を比較したところ、*c-erbB-2* mRNA 発現量が多い症例ではリンパ節転移が認められる傾向があった。

以上の結果より、RT-PCR 法を用いた *c-erbB-2* 遺伝子発現の解析法は、十分な感度と定量性を備えていることが明らかとなった。また本法により胃癌における *c-erbB-2* 遺伝子発現とリンパ節転移との関連性から、*c-erbB-2* 遺伝子発現の予後予測因子としての有用性が示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、懇篤な御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部第二外科講座宮崎逸夫教授、本学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり、直接御協力と御鞭撻を賜りました金沢大学医学部第二外科米村 豊講師および本学がん研究所化学療法部遠藤良夫先生に深く感謝いたします。また御助言、御協力を戴きました本学第二外科およびがん研究所化学療法部各位に厚く御礼申し上げます。

尚、本研究の要旨の一部は、第 91 回日本外科学会総会 (1991, 京都)、第 50 回日本癌学会総会 (1991, 東京) において発表した。

文 献

- 1) Stanley, K., Stjernswäld, J. & Korolitchouk, V.: Cancers of the stomach, lung and breast: mortality trends and control strategies. World Health Stat. Q., 41, 107-114 (1988).
- 2) Maruyama, K., Okabayashi, K. & Kinoshita, T.: Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality. World J. Surg., 11, 418-425 (1987).

- 3) 澤 敏治, 木下一夫, 竹川 茂, 大山繁和, 長谷川啓, 藤村 隆, 上田順彦, 渡辺俊雄, 加藤真史, 宮田龍和, 松田祐一, 高嶋 達, 富田富士夫, 片山寛次, 田中茂弘, 佐久間寛, 松木伸夫, 萩野 茂, 米村 豊, 宮崎逸夫: 末期胃癌に対するPMUE療法(CDDP, MMC, UFT, Etoposide)の効果. 癌と化学療法, 17, 2381-2386 (1990).
- 4) 平山 雄, 久道 茂, 吉野肇一, 春山克郎, 石引久弥, 安部令彦: 胃癌の疫学. 胃癌の臨床(城所 功 編), 第1版, 2-53頁, へるす出版社, 東京, 1983.
- 5) Kaibara, N., Nishidoi, H., Kimura, O., Makino, M., Sumi, K. & Koga, S.: Analysis of results of surgical treatment of gastric cancer. Dig. Surg., 5, 124-127 (1988).
- 6) Lehnert, T., Sternberg, S. S., Sprossmann, M. & DeCosse, J. J.: Early gastric cancer. Am. J. Surg., 157, 202-207 (1989).
- 7) Maruyama, K., Gunven, P., Okabayashi, K., Sasako, M. & Kinoshita, T.: Lymph node metastases of gastric cancer. Ann. Surg., 210, 596-602 (1989).
- 8) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約, 第12版, 1-89頁, 金原出版, 東京, 1993.
- 9) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., 162, 156-159 (1987).
- 10) Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T. & Toyoshima, K.: Similarity of protein encoded by the human *c-erbB-2* gene to epidermal growth factor receptor. Nature, 319, 230-234 (1986).
- 11) NG, S. Y., Gunning, P., Eddy, R., Ponte, P., Leavitt, J., Shows, T. & Kedes, L.: Evolution of the functional human β -actin gene and its multi-pseudogene family: Conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. Mol. Cell. Biol., 5, 2720-2732 (1985).
- 12) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98, 503-517 (1975).
- 13) Denhardt, D. T., Efstratiadis, A., O'Connell, C. & Maniatis, T.: Biochemical and biophysical research communications. Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 641-646 (1966).
- 14) Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P. H., Liebermann, T. A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A. & Ullrich, A.: Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. Science, 230, 1132-1139 (1985).
- 15) King, C. R., Kraus, M. H. & Aaronson, S. A.: Amplification of a novel *v-erbB*-related gene in a human mammary carcinoma. Science, 229, 974-976 (1985).
- 16) Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. & Yamamoto, T.: A *v-erbB*-related protooncogene, *c-erbB-2*, is distinct from the *c-erbB-1*/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6497-6501 (1985).
- 17) Fukushima, S., Matsubara, K., Yoshida, M., Sasaki, M., Suzuki, T., Semba, K., Toyoshima, K. & Yamamoto, T.: Localization of a novel *v-erbB*-related gene, *c-erbB-2*, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. Mol. Cell. Biol., 6, 955-958 (1986).
- 18) Yokota, J., Yamamoto, T., Toyoshima, K., Terada, M., Sugimura, T., Battifora, H. & Cline, M. J.: Amplification of *c-erbB-2* oncogene in human adenocarcinomas in vivo. Lancet, 1, 765-767 (1986).
- 19) Hudziak, R. M., Schlessinger, J. & Ullrich, A.: Increased expression of the putative growth factor receptor p185^{HER2} causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7159-7163 (1987).
- 20) Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R. & Aaronson, S. A.: *erbB-2* is a potent oncogene when overexpressed in NIH 3T3 cells. Science, 237, 178-182, (1987).
- 21) Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. & McGuire, W. L.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the *HER-2/neu* oncogene. Science, 235, 177-182 (1987).
- 22) Zhou, D., Battifora, H., Yokota, J., Yamamoto, T. & Cline, M. J.: Association of multiple copies of the *c-erbB-2* oncogene with spread of breast cancer. Cancer Res., 47, 6123-6125 (1987).
- 23) Venter, D. J., Tuzi, N. L., Kumar, S. & Gullick, W. J.: Overexpression of the *c-erbB-2* oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. Lancet, 2, 69-72 (1987).
- 24) Berger, M. S., Locher, G. W., Saurer, S., Gullick, W. J., Waterfield, M. D., Groner, B. & Hynes, N. E.: Correlation of *c-erbB-2* gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading. Cancer Res., 48, 1238-1243 (1988).
- 25) Park, J. B., Rhim, J. S., Park, S. C., Kimm, S. W. & Kraus, M. H.: Amplification, overexpression, and rearrangement of the *erbB-2* protooncogene in primary human stomach carcinomas. Cancer Res., 49, 6605-6609 (1989).
- 26) Yonemura, Y., Ninomiya, I., Yamaguchi, A., Fushida, S., Kimura, H., Ooyama, S., Miyazaki, I., Endou, Y., Tanaka, M., & Sasaki, T.: Evaluation of immunoreactivity for *erbB-2* protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. Cancer Res., 51, 1034-1038 (1991).
- 27) Yonemura, Y., Ninomiya, I., Ohoyama, S., Fushida, S., Kimura, H., Tsugawa, K., Kamata, T., Yamaguchi, A., Miyazaki, I., Endou, Y., Tanaka, M. & Sasaki, T.: Correlation of *c-erbB-2* protein expression and lymph node status in early gastric cancer. Oncology, 49, 363-367 (1992).
- 28) Peles, E., Bacus, S. S., Koski, R. A., Lu, H. S., Wen, D., Ogden, S. G., Levy, R. B. & Yarden, Y.: Isolation of the *neu*/HER-2 stimulatory ligand: A 44 kd

glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell*, **69**, 205-216 (1992).

29) Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D., Shepard, H. M., Kuang, W. J., Wood, W. I., Goeddel, D. V. & Vandlen, R. L.: Identification of heregulin, a specific activator of p185^{erbB2}. *Science*, **256**, 1205-1210 (1992).

30) Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S. V., Baccus, S. S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S. M., Levy, R. B., Koski, R. A., Lu, H. S. & Yarden, Y.: Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell*, **69**, 559-572 (1992).

31) Wels, W., Harwerth, I. M., Mueller, M., Groner, B. & Hynes, N. E.: Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res.*, **52**, 6310-6317 (1992).

32) Kasprzyk, P. G., Song, S. U., Di Fiore, P. P. & King, C. R.: Therapy of an animal model of human gastric cancer using a combination of anti-erbB-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, **52**, 2771-2776 (1992).

33) Bacus, S. S., Stancovski, I., Huberman, E., Chin, D., Hurwitz, E., Mills, G. B., Ullrich, A., Sela, M. & Yarden, Y.: Tumor-inhibitory monoclonal antibodies to the HER-2/Neu receptor induce differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **52**, 2580-2589 (1992).

34) Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J. & Werb, Z.: Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis of mRNA phenotyping. *Science*, **241**, 708-712 (1988).

35) Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S. & Kahn, A.: Transcription of the dystrophin gene in human

muscle and non-muscle tissues. *Nature*, **333**, 858-860 (1988).

36) Kashani-Sabet, M., Rossi, J. J., Lu, Y., Ma, J. X., Chen, J., Miyachi, H. & Scanlon, K. J.: Detection of drug resistance in human tumors by *in vitro* enzymatic amplification. *Cancer Res.*, **48**, 5775-5778 (1988).

37) Kawasaki, E. S., Clark, S. S., Coyne, M. Y., Smith, S. D., Champlin, R., Witte, O. N. & McCormick, F. P.: Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5698-5702 (1988).

38) Fuqua, S. A. W., Falette, N. F. & McGuire, W. L.: Sensitive detection of estrogen receptor RNA by polymerase chain reaction assay. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 858-861 (1990).

39) Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T. & Bates, S. E.: Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry*, **29**, 10351-10356 (1990).

40) Fuqua, S. A. W., Fitzgerald, S. D. & McGuire, W. L.: A simple polymerase chain reaction method for detection and cloning of low-abundance transcripts. *Biotechniques*, **9**, 206-211 (1990).

41) Plowman, G. D., Whitney, G. S., Neubauer, M. G., Green, J. M., McDonald, V. L., Todaro, G. J. & Shoyab, M.: Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4905-4909 (1990).

42) Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. & Aaronson, S. A.: Isolation and characterization of *ERBB3*, a third member of the *ERBB*/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9193-9197 (1989).

Specific Detection of *c-erbB-2* mRNA Expression in Endoscopic Biopsy Specimen of Gastric Cancers by the Polymerase Chain Reaction Following Reverse Transcription Itasu Ninomiya, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 103, 197—206 (1994)

Key words *c-erbB-2* mRNA expression, polymerase chain reaction, reverse transcription, gastric cancer, endoscopic biopsy

Abstract

A highly sensitive and quantitative method using the polymerase chain reaction following reverse transcription (RT-PCR) has been developed for detecting *c-erbB-2* mRNA expression in gastric cancers. In this method, *c-erbB-2* gene expression in human embryonic lung fibroblasts (HEL), a gastric cancer cell line (MKN-7), mature placenta, 24 surgically resected gastric cancer tissues and 24 endoscopic biopsy tissues were examined. The *c-erbB-2* gene expression could be detected at the respective concentrations of 12 ng of total RNA for HEL and 100 pg of total RNA for MKN-7. The *c-erbB-2* gene expression of MKN-7 cells was at a much higher level (72.6-fold) than that of HEL. Four (16.7%) of 24 gastric cancers tested showed overexpression of *c-erbB-2* mRNA (1.75-22.8 fold to placenta), while *c-erbB-2* oncoprotein expression was found in only three cases by immunohistochemical assay. This technique may be useful in examining the expression of *c-erbB-2* gene in a small endoscopic biopsy specimen before surgery. The high expression level of *c-erbB-2* mRNA examined in endoscopic biopsy specimen was moderately correlated with lymph node metastasis at the time of the operation. Analysis of the activated oncogenes using this RT-PCR assay may be a good approach to elucidate the basic role of oncogenes in malignant transformation.