

Frequent p53 Mutations in Human Gastric Cancer Cell Lines

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/2297/8305

ヒト胃癌細胞株における p53 遺伝子の構造異常解析

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

伏 田 幸 夫

(平成4年1月13日受付)

現在、著しい分子生物学の発展に伴いヒト癌における発癌、進展、転移のメカニズムが遺伝子レベルで解明されつつある。さらに、遺伝子異常のなかでも、本来の機能を失うことで正常な細胞動態からの逸脱を引き起こすと考えられる遺伝子、すなわち癌抑制遺伝子が染色体異常の解析により各種発見され、種々の癌において検討されている。しかしながら、ヒト胃癌における癌抑制遺伝子の解析はほとんどなされていないのが現状である。そこで本研究では、ヒト胃癌継代培養細胞株10株を用いて癌抑制遺伝子 p53 の構造異常について検討した。まず各細胞株から全 RNA を抽出し、ノーザンブロットにて p53 遺伝子の発現の有無を検討したところ、培養細胞株のうちの1つ KATO III では全く発現を認めず他の9株では発現量が若干差はあるものの塩基長の変化などは認めなかった。そこで KATO III の高分子 DNA を抽出しサザンブロットを行ったところ、p53 遺伝子の完全欠失を認めた。また、他の9株では、RNA サンプルを一度逆転写酵素 (RT) を用いて cDNA に変換した後、PCR 法で増幅する RT-PCR 法 (reverse transcriptase polymerase chain reaction) で判別できるような DNA 上の欠失、挿入は認めなかった。次に SSCP 法 (single strand conformation polymorphism method) にて構造異常の有無を検討したところ、KATO III を除く9株中4株に易動度の差を認め構造異常の存在が示唆された。易動度の差を認めた4株についてジ・デオキシ法にて塩基配列を決定したところ、そのすべてに変異 (1塩基置換) がみつかった。また同時に抗 p53 モノクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行ったところ、変異の認められた4株のみが染色陽性で p53 遺伝子産物の存在を確認した。本研究においてヒト胃癌細胞株10株中5株 (50%) に構造異常を認めたことから、p53 遺伝子がヒト胃癌に関与する主要な遺伝子であることが初めて明らかとなった。

Key words p53 mutations, gastric cancer, RT-PCR-SSCP, immunohistostaining

近年、細胞生物学、分子生物学の著しい発展に伴い各種ヒト癌の発生、進展のメカニズムが解明されつつある。

胃癌は日本を含めたアジアおよび世界各国で癌による死因の第1位であるにもかかわらず、未だ胃癌の発生、進展に関する知見は少ない。

胃癌細胞のゲノム DNA をトランスフェクション法にて NIH3T3 細胞にトランスフェクションすると、NIH3T3 細胞をトランスフォームする遺伝子があり、それらは癌遺伝子と命名されている。すなわち、ras 遺伝子、hst 遺伝子、raf 遺伝子などがそれであるが、これら遺伝子はある限られた症例のみにみられるにとどまっている^{1)~3)}。

ras 遺伝子の活性化は、マウス、ラット等の発癌モデルのみならず各種ヒト癌で報告されており、肺癌で80~90%、大腸癌で30~40%と高率に検出されている。しかし胃癌ではその活性化率は3~10%と低く、ras 遺伝子の関与は少ないと考えられている^{4)~7)}。また癌遺伝子の増幅に関しても、肺癌で高率に検出される c-erbB2 遺伝子、肺癌で検出される c-myc 遺伝子などは胃癌ではほとんど検出されない^{8)~9)}。

最近、癌遺伝子とならび p53 遺伝子、RB 遺伝子、DCC 遺伝子といった癌抑制遺伝子の存在が知られるようになり各種ヒト

癌において検討されてきている^{10)~13)}。なかでも p53 遺伝子は肺癌、大腸癌、乳癌、肝細胞癌などの癌でヘテロ接合性の消失を含め、構造異常が認められている^{12)~15)}。そこで著者は、ヒト胃癌における p53 遺伝子の構造異常についてヒト胃癌細胞株を用いて検討した結果を報告する。

材料および方法

I. 培養細胞株

ヒト胃癌継代培養細胞株 KATO III (Sloan Kettering Cancer Center, N. Y. の L. J. Old 博士より供与)、AZ521 (Japanese Cancer Research Bank より供与)、NUGC2, NUGC3, NUGC4 (名古屋大学第2外科、渡辺博士より供与)、MKN1, MKN7, MKN28, MKN45, MKN74 (福島医科大学、鈴木博士より供与)の10株を用いた。AZ521 および NUGC4 はイーグル変法培地 (Nissui, Tokyo) に、他の8株は RPMI-1640 液 (Gibco, Grand Island, U.S.A.) にペニシリン 100 μ g/ml、カナマイシン 100 μ g/ml および非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を10%濃度に加えた培養液、即ち10% FCS 加 RPMI 培地にて培養した。培養はいずれも37℃、5% CO₂ 下でおこなった。

II. サザン・ブロット・ハイブリダイゼーション

Abbreviations: DAB, diaminobenzidine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; PBS, phosphate buffer saline; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSCP, single strand conformation polymorphism

高分子 DNA を Takahashi ら¹⁸⁾の方法に従って抽出し、その 10 μ /g を制限酵素である BamHI, EcoRI および Hind III にて切断し 0.8% アガロースゲル上に電気泳動させた後、ナイロンメンブレンフィルター (Gene Screen Plus, Dupont 社, Boston, U.S.A.) にトランスファーした。メンブレンフィルター上の DNA 断片は ³²P-deoxy-CTP で標識した p53 DNA 断片 p53B (ATCC, Maryland, U.S.A.) をプローブに用い、65℃ にてハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーション液は、50% dextran sulfate 2ml, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 1ml, 5M NaCl 2ml, 2M Tris (pH 7.5) 250 μ l に蒸留水を加えて全量を 10ml としたものを用いた。20~24時間インキュベート後メンブレンフィルターを洗浄し、-80℃ でオートラジオグラフィーをおこなった。一方、プローブの標識にはマルチプライム法 (multiprime DNA labeling kit, アマシャム社, Buckinghamshire, England) を用いた。

III. ノーザンブロット・ハイブリダイゼーション

約 1×10^8 個の各培養細胞より全 RNA を Chomczynski ら¹⁹⁾のグアニジンフェノール・クロロホルム法にて抽出した。全 RNA 各 20 μ g をホルムアルデヒド、ホルムアミドで変性させ、2%ホルムアルデヒド加 1%アガロースゲル上に電気泳動後、ナイロンメンブレンフィルターにトランスファーした (約20時間)。メンブレンフィルターを風乾後、80℃ で2時間ベーキングした。プローブはサザン・ブロットと同じものを使用し、メンブレンフィルター上の RNA を42℃ でハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション液の組成は、formamide 5ml, 50×Denhart 1ml, NaCl 0.58g, 50% dextran sulfate 2ml, 10% SDS 1ml, 2M Tris (pH 7.5) 250 μ l, 蒸留水 1ml のものを用いた。20~24時間インキュベートした後メンブレンフィルターを洗浄し、-80℃ でオートラジオグラフィーをおこなった。同じメンブレンフィルターをデハイブリダイゼーションした後、 β -アクチンにてハイブリダイゼーションをおこない内部コントロールとした。

IV. RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

各細胞株の cDNA は、先に抽出した全 RNA 3 μ g からオリゴ dT プライマーを用い M-MLV 逆転写酵素 (BRL 社, Gaithersburg, U.S.A.) にて作成した。図1に示す如く p53 のエクソン5から8を含む領域を AxDx, BxEx, CxFx の3つに分け各 cDNA を鋳型とし、PCR にて増幅した。PCR に用いたプライマーは 380B DNA 合成機 (Applied Biosysteme 社, N. Y., U.S.A.) にて以下の通り作成した。

センス側として、Ax, 5'-GGGGATCCTTGCAATTCTGGG-ACAGC-3'; Bx, 5'-GGGGATCCCACCATGAGCCGTGCT-CA-3'; Cx, 5'-GGGGATCCATCATCACACTGGAAGAC-3' を、アンチセンス側として、Dx, 5'-GGGAATTCATTCCA-CTCGGATAAGAT-3'; Ex, 5'-GGGAATTCAAACACGCAC-CTCAAAGCT-3'; Fx, 5'-GGGAATTCATCCATCCAGTG-GTTTC-3' を用い、センス側プライマーには BamHI, アンチセンス側プライマーには EcoRI 切断部をそれぞれ付加した。PCR は、thermal cycler (Program Temp Control System PC-700, Astec Inc., Fukuoka) を用い、93℃, 1分間; 50℃, 1.5分間; 72℃, 1分間を1サイクルとし、35サイクル行った。反応条件は、PERKIN ELMER CETUS 社 (Norwalk, U.S.A.) のプロトコルに従った。

V. RT-PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism)

RT-PCR はIVと同様であるが、この際各プライマーの 5' 末端を [γ -³²P] ATP にて標識したものをを用いた。標識された PCR 産物 2 μ l に 0.1% SDS, 10mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を 5 μ l, 色素溶液 (95%ホルムアミド, 20mM EDTA, 0.05%キシレンシアノール, 0.05%プロモフェノールブルー) 7 μ l を加え、90℃, 3分間加熱変性後、5%グリセロール加 6%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。電気泳動は、40W で3~4時間、空冷しながらおこなった。泳動後、ゲルを濾紙上で乾燥し、室温でオートラジオグラフィーをおこなった (約12時間)。コントロールには、正常ヒトリンパ球を用いた。

VI. 塩基配列の決定

SSCP 法にて変異配列を検出した PCR 産物は BamHI, EcoRI で消化後精製し、pBluescript II SK にサブクローニングした。これらの DNA 塩基配列は Sequenase version 2.0 kit (USB, Cleveland, U.S.A.) を用い、ジ・デオキシ法にて決定した。

VII. 免疫組織染色

各細胞株を Lab-Tek スライド (MILES 社, Naperville, U.S.A.) にて培養し、抗 p53 モノクローナル抗体 PAb1801 (Oncogene Science 社, N. Y., U.S.A.) を用い、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ法にて p53 遺伝子産物を特異的に染色した。まず、50%アセトン加メタノールに10分間固定後 0.3%メタノール加過酸化水素水に20分間浸透し、リン酸緩衝液 (phosphate buffer saline, PBS) で洗浄した。次に正常ヤギ血清に15分間反応させた後、p53 モノクローナル抗体を一晩4℃ にて反応させた。PBS で洗浄後、ビオチン化ヤギ抗マウス IgG 抗体に30分間反応させ、ついでストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体に60分間反応させ diaminobenzidine (DAB) で発色した。核染色は、0.3%メチルグリーンにておこなった。

成 績

I. ノーザンブロット・ハイブリダイゼーションによる p53 遺伝子発現の解析

異なる胃癌培養細胞株10株について RNA を抽出し、p53 cDNA プローブを用いてノーザンブロット・ハイブリダイゼーションを行い、各細胞株における p53 mRNA の発現を調べた (図2)。内部コントロールとして β アクチンの発現を同時に調べたが、すべての細胞株でその発現を認めた。しかし、p53 遺伝子の発現は KATO III 株では全く認められなかった。その他9株においては発現量の差はあるものの、すべて2.8kbに単一

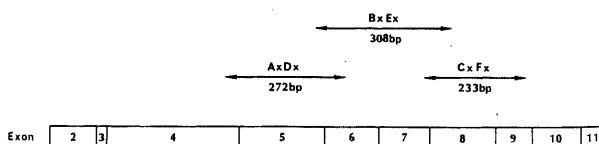


Fig. 1. Gene construction of p53 and the primers used for amplification. The regions of p53 cDNA amplified by the use of three sets of primers (AxDx, BxEx, CxFx) are shown.

のバンドしか認められず、ノーザンブロットにて示唆されるような挿入や欠失は認められなかった (図2)。

II. サザンブロット・ハイブリダイゼーションによる p53 遺伝子の解析

先のノーザンブロットにて p53 遺伝子の発現を認めなかった KATO III 高分子 DNA を制限酵素 BamHI, EcoRI, Hind III にて消化し、サザンブロット・ハイブリダイゼーションを行った。図3に示すように、対照として用いた正常ヒト胎盤細胞の DNA では、いずれの制限酵素消化においても p53 cDNA プロブと反応するバンドが認められた。しかし、KATO III 株からの DNA においてはどの制限酵素消化の場合でも p53 の cDNA と反応するバンドは検出できなかった。従って KATO III 株においては、p53 遺伝子領域はすべて欠失しているものと考えられた (図3)。

III. RT-PCR による p53 cDNA の増幅

3組のプライマーを用い10株からの cDNA をそれぞれ RT-PCR によって増幅したところ、KATO III を除く9株では、その全てに同じサイズのバンド (すなわち AxDx, 272bp; BxEx, 308bp; CxFx, 233bp) が認められた。しかし KATO III 株の cDNA からは、どのプライマーを用いた場合でもバンドは検出されなかった。図4に BxEx 領域における増幅例を示した (図4)。

IV. RT-PCR-SSCP による p53 遺伝子構造異常の検索

AxDx, BxEx, CxFx の3領域における構造異常を RT-PCR-SSCP 法を用いてスクリーニングした。図5に AxDx 領域の SSCP の結果を示したが、MKN1 株のみがコントロールとして用いた正常ヒトリンパ球と異なる易動度を示し、この領域における MKN1 株の構造異常が示唆された。また、図には示さなかったが、BxEx 領域では NUGC2 株および MKN28 株が、CxFx 領域では MKN7 株に易動度の差を認め、それぞれに構造異常の存在が示唆された。

V. p53 遺伝子変異配列の決定

SSCP 法にて構造異常のみつかった細胞株の p53cDNA フラグメントを pBluescript II CK にてサブクローニングし、その中から4~6個のクローンをひろい塩基配列を決定した。図6に示すように、NUGC2 株ではコドン245の GGC が AGC に、また MKN28 株では、コドン184の GTA が TAT に変異していた。この他の細胞株についても調べた結果を表1に示した。

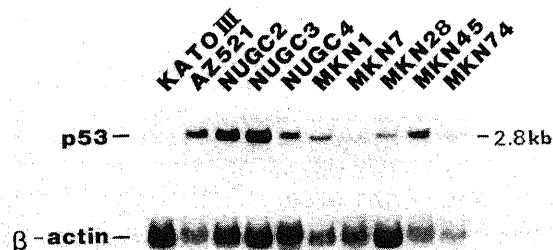


Fig. 2. Northern blot analysis of p53 mRNA. The 20 μ g of total RNA isolated from 10 gastric cancer cell lines was hybridized with a 32 P-labeled p53 XbaI fragment. The 2.8 kilobase transcripts were detected by the p53 probe in gastric cancer cell lines except KATO III. The same membrane was also hybridized with beta actin specific probe for internal control.

ミスセンス変異がみられたのは NUGC2 株, MKN1 株, MKN7 株, MKN28 株, ナンセンス変異がみられたのは MKN28 株であった。また MKN1 株では、1塩基欠失によるフレームシフトもみられた。以上のように、SSCP 法にて異常の

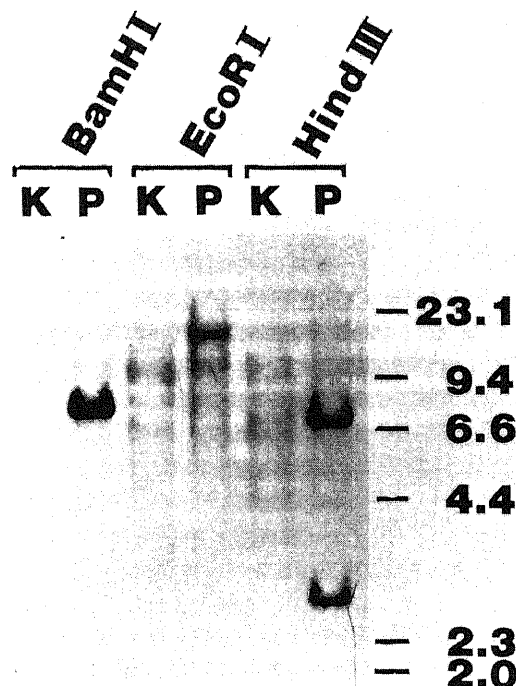


Fig. 3. Southern blot hybridization of DNA from KATO III cells. Southern blot analysis of DNA extracted from KATO III and from a normal human placenta (for control) were digested with restriction endonucleases, BamHI, EcoRI and HindIII, and transferred to nylon membrane after electrophoresis in 0.8% agarose gel. A membrane filter was hybridized with a 32 P-labeled p53 cDNA probe. In KATO III, complete deletion of p53 gene was shown. K, KATO III; P, human placenta.

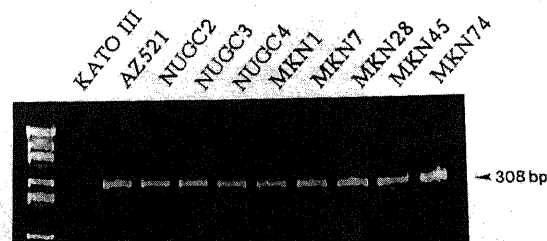


Fig. 4. PCR analysis of p53 cDNA fragment from 10 gastric cancer cell lines. Amplified DNA fragments were analyzed on a 12% polyacrylamide gel. DNA fragments amplified by BxEx primer were stained with ethidium bromide. In the case of KATO III, no amplified DNA band at around 308bp was detected. In the other cases, all amplified DNA band detected at 308bp and no other band was found.

みられた p53cDNA フラグメント全てに変異配列を認め、細胞株によっては複数の変異を持っていた (図6および表1)。

VI. 免疫組織染色

次に p53 遺伝子産物がそれぞれの細胞株において実際に発現しているかどうかを免疫組織染色で調べた。細胞株10株中構造異常のみつかった NUGC2 株, MKN1 株, MKN7 株, および MKN28 株の4例のみが抗 p53 モノクローナル抗体染色陽性であった (表1)。1例として MKN28 株の結果を図7に示した。図7の例にみられるように、核がほぼ均一に濃染し細胞質は染まらなかった。

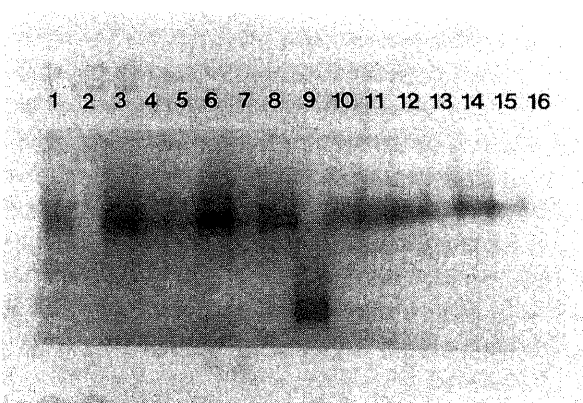
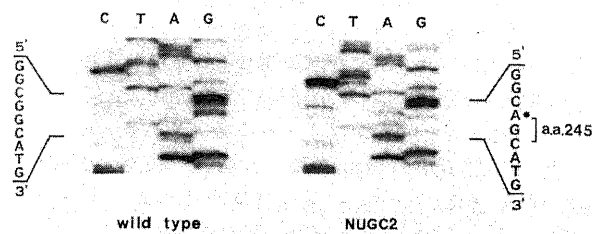
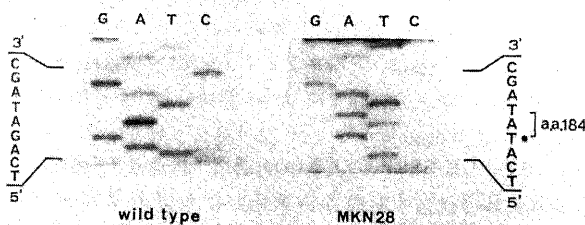


Fig. 5. Detection of gene alterations of p53 genes by the SSCP assay. An example of SSCP assay of RT-PCR products by the primer Ax Dx was shown. Primers were labeled by the polynucleotide kinase reaction with ^{32}P - γ -ATP. Lane 1, 4, 7, 10, 13 and 16 were RT-PCR products of normal lymphocytes containing normal p53 sequence for negative controls. Lane 9 (MKN1) showed shifted mobility compared with negative controls. Lane 2, 3, 5, 6, 8, 11, and 12 were KATO III, AZ521, NUGC2, NUGC3, NUGC4, MKN7, MKN28, MKN45, and MKN74, respectively.



(a)



(b)

Fig. 6. Sequencing analysis of NUGC2 and MKN28. The templates used for the sequencing reactions consisted of pooled clones generated from PCR products. Sequence analysis was performed by di-deoxy method. A G to A mutation was detected at codon 245 in NUGC2 (a), and a G to T mutation at codon 184 in MKN28 (b).

Table 1. Mutations in the p53 gene in human gastric cancer cell lines

Cell line	Histology ¹⁾	Immunostaining ²⁾	p53 gene alterations
KATO III	sig	(-)	complete deletion
AZ521		(-)	
NUGC2	por	(+)	
NUGC3	por	(-)	
NUGC4	sig	(-)	codon 245; GGC → AGC (Gly → Ser)
MKN1	adenosq	(+)	
MKN7	W/D	(+)	
MKN28	W/D	(+)	
			codon 143; GTG → GCF (Val → Ala)
			codon 159; a C deletion (frame shift)
			codon 278; CCT → TCT (Pro → Ser)
			codon 184; GAT → TAT (Asp → Tyr)
			codon 235; AAC → AAT (silent)
			codon 251; ATC → CTC (Ile → Leu)
MKN45	por	(-)	
MKN74	W/D	(-)	

1) Histological types were according to the Japanese Research Society of gastric Cancer, Jpn J. Surg., 11, 127-139 (1981).

sig, signet-ring cell carcinoma;

por, poorly differentiated tubular adenocarcinoma;

W/D, well differentiated tubular adenocarcinoma;

adenosq, adenosquamous cell carcinoma;

2) Immunohistochemistry by a monoclonal antibody p53 (Ab-2).

考 察

p53 遺伝子は17番染色体短腕に位置する遺伝子で、その遺伝子産物は核内に存在して細胞増殖を制御していると考えられている。発見当初は細胞をトランスフォームすることから癌遺伝子の一つと考えられていたが、そのトランスフォームする遺伝子は実は変異 p53 遺伝子であることが判明した¹⁸⁾¹⁹⁾。現在、p53 遺伝子は、癌抑制遺伝子の1つとして認められておりヒト各種癌について広く検討されつつある^{20)~22)}。そこで今回、ヒト胃癌細胞株10株を用いて p53 遺伝子の構造異常について検討した。

サザンブロット法にて KATO III 株は p53 遺伝子の完全欠失であることが判明した。癌細胞ではしばしば染色体17番の欠失が対立遺伝子の片方にあり、残存するもう一方にも異常があることが多いが、KATO III 株の場合、対立遺伝子の両方が欠失したものと考えられる。

慢性骨髄性白血病、あるいは肺癌の一部の症例において p53 遺伝子の再構成がみられるとされている²³⁾²⁴⁾。しかし、今回著者の検索した KATO III 株以外の9株では p53 遺伝子の増幅および再構成はみられず、RT-PCR 法にて検出され得るような、より小さな再構成もみられなかった。

PCR-SSCP 法は、国立がんセンターの Orita ら²⁵⁾が開発した DNA の構造異常を迅速かつ容易に検出する方法であり、サザンブロット法、ノーザンブロット法、RT-PCR 法にて検出不能な一塩基の異常さえも検出可能である。すなわち、DNA 断片は二本鎖のまま電気泳動で分離すると断片の長さのみに依存した易動度を示すが、これを一本鎖に変性すると塩基配列に依存した高次構造をとり、その高次構造の差が易動度の差として検出可能となる。p53 遺伝子は、ras 遺伝子のようにある一定の

コドンに異常がおきるのではなく広い領域にわたり異常がおきるため、そのすべての領域の塩基配列を決定することは労力の点で並大抵ではない。そこで今回、PCR-SSCP 法を用いてスクリーニングを行った。

KATO III 株を除く9株中4株に易動度の差を認めたが、このうち AxDx 領域の MKN1 株および CxFx 領域の MKN7 株では正常(陰性コントロール)とは異なるところに一本のバンドのみが認められた。通常二対の対立遺伝子があり、その一方のみに異常があるならば、もう一方の正常な遺伝子は陰性コントロールと同じ易動度を示し、バンドは二本認められるはずである。また対立遺伝子の両方に異なる異常があるならば、陰性コントロールと異なる二本のバンドが認められるはずである。以上より、これらの2株は一方の対立遺伝子の欠失を伴っていることが示唆された。また SSCP 法にて易動度の差を認めた他の2株では、陰性コントロールとのバンドが極めて近接しており欠失の有無の評価は困難であった。

SSCP 法にて易動度の差を認めた4株の塩基配列を決定したところ、そのすべてに構造異常を認めた。MKN1 株、MKN7 株、および NUGC2 株では、4~6個のクローンすべてにそれぞれ同じ構造異常を認め、またこれらの細胞株では p53 対立遺伝子の一方が欠失しているものと考えられた。MKN28 株については、2種類の異なった構造異常を有するクローンが認められ、p53 遺伝子の対立遺伝子両方に構造異常があると考えられた(表1)。

ヒト p53 遺伝子は、カエル、マウスなどに種を超えて長く保存されている5個の領域を持っているが²⁶⁾、大腸癌をはじめ肺癌、乳癌、脳腫瘍等では p53 の変異部位はこれらの中で特にホモロジーの高い領域(II, III, IV, V)に存在している^{27)~30)}。今回構造異常を認めた4株(KATO III 株は除く)でも、図8に示すようにホモロジーの高い領域のいずれかに変異が認められた(図8および表1)。このようにホモロジーの高い領域は p53 遺伝子の機能ドメインであり、これらのどこかに変異が生じることで正常 p53 遺伝子の機能が消失すると考えられており、今回の結果と合致する。

塩基の置換において、肺癌では G→T、大腸癌では GC リッチな部位での G→A への変異が多いのに対し²⁸⁾³¹⁾、今回の胃癌細胞株を用いた検討では一定のパターンを認めなかった³²⁾。今後、多数の臨床検体を用いた検討が必要と考えられた。

免疫組織学的検討では、構造異常が認められた4例では染色陽性であり構造異常があっても p53 タンパクそのものは組織において存在することが証明された。今回使用したモノクローナル抗体は p53 タンパクのアミノ酸32番から79番を認識し、正常 p53 タンパクと反応する³³⁾。一方、p53 遺伝子の変異部位はそのほとんどがドメイン II, III, IV, V に存在するため(図8)、変異 p53 タンパクとこのモノクローナル抗体が反応したものと考えられた。しかしながら、正常細胞では p53 タンパクの半減期が6~30分と短いため³⁴⁾、細胞内含量は低く組織染色では認識できない。それに反し変異 p53 タンパクの大半は半減期が数時間単位に延長し²⁰⁾、細胞内含量も多く染色陽性になると考えられており、今回の結果はそれを証明したことになった。

p53 遺伝子の構造異常があっても抗 p53 モノクローナル抗体による免疫組織染色でその異常タンパクを検出できたことは、今後臨床検体を多数検討する上で免疫組織染色が簡便で有用な

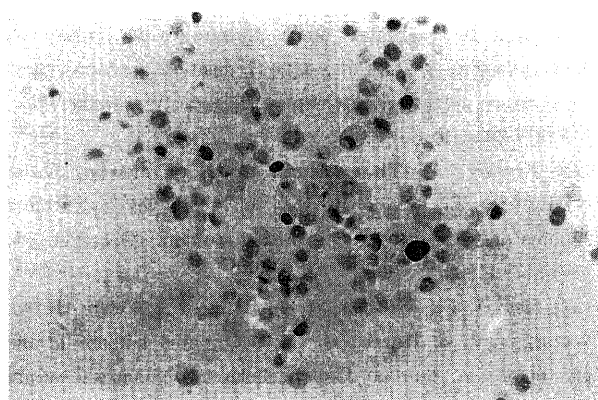


Fig. 7. An example of the immunostaining of p53 proteins in human gastric cancer cell lines (MKN28). Almost homogenous nuclear staining was observed with anti-p53 antibodies p53 (Ab-2).

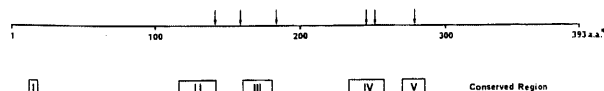


Fig. 8. Location of p53 mutations in human gastric cancer cell lines. Each individual mutation with amino acid substitutions is indicated by an arrow. The five conserved regions are also indicated.

スクリーニング法になり得ると考えられた。

結 論

ヒト胃癌継代培養細胞株10株を用いて、癌抑制遺伝子 p53 の構造異常について検討し、以下の結論を得た。

1. ヒト胃癌継代培養細胞株10株中1株に p53 遺伝子の完全欠失を、また他の4株に1塩基変異による構造異常を認めた。

2. 構造異常を認めた4株の変異部位はすべて p53 遺伝子の機能ドメイン (Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ) 上にあった。

3. 抗ヒト p53 モノクローナル抗体 PAb1801 を用いた免疫組織染色の結果、構造異常の p53 タンパクとこの抗体はよく反応することがわかった。p53 遺伝子構造異常のスクリーニングには、この抗体を用いた免疫組織染色が簡便で有用な方法であると考えられた。

4. p53 遺伝子の構造異常は、ヒト胃癌に関与する主要な遺伝子変化の1つであることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究の遂行にあたり直接御指導、御助言をいただいた米村豊博士に深く感謝します。さらに多大なる御援助、御協力をいただいた長崎大学医学部腫瘍医学教室、珠玖洋教授、浦野健先生に心から感謝致します。

なお、本論文の要旨は第50回日本癌学会総会(東京, 1991)にて発表した。

文 献

- 1) Bos, J. L., Verlaan-de Vries, M., Marshall, C. J., Veeneman, G. H., Van Boom, J. H. & van der Eb, A. J.: A human gastric carcinoma contains a single mutated and an amplified normal allele of the Ki-ras oncogene. *Nucleic Acids Res.*, 14, 1209-1217 (1986).
- 2) Sakamoto, H., Mori, M., Taira, M., Yoshida, T., Matsukawa, S., Shimizu, K., Sekiguchi, M., Terada, M. & Sugimura, T.: Transforming gene from human stomach cancers and a noncancerous portion of stomach mucosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 3997-4001 (1986).
- 3) Shimizu, K., Nakatsu, Y., Sekiguchi, M., Hokamura, K., Tanaka, K., Terada, M. & Sugimura, T.: Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to v-raf, from primary stomach cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5641-5645 (1985).
- 4) Almoquera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N. & Perucho, M.: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*, 53, 549-554 (1988).
- 5) Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., Van Boom, J. H., Van der Eb, A. J. & Vogelstein, B.: Prevalence of ras mutations in human colorectal cancers. *Nature (Lond.)*, 327, 293-297 (1987).
- 6) Nagata, Y., Abe, M., Kobayashi, K., Yoshida, K., Ishibashi, T., Naoe, T., Nakayama, E. & Shiku, H.: Glycine to aspartic mutations at codon 13 of the c-Ki-ras gene in human gastrointestinal cancers. *Cancer Res.*, 50, 480-482 (1990).
- 7) Kihana, T., Tsuda, H., Hirota, T., Shimosato, Y., Sakamoto, H., Terada, M. & Hirohashi, S.: Point mutation of c-Ki-ras oncogene in gastric adenoma and adenocarcinoma with tubular differentiation. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 308-314 (1991).
- 8) Yokota, J., Yamamoto, T., Miyajima, N., Toyoshima, K., Nomura, N., Sakamoto, H., Yoshida, T., Terada, M. & Sugimura, T.: Genetic alterations of the c-erbB-2 Oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene*, 2, 283-287 (1988).
- 9) Houldsworth, J., Cordon-Cardo, C., Ladanyi, M., Kelsen, D. P. & Chaganti, R. S. K.: Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 50, 6417-6422 (1990).
- 10) Lee, W. H., Bookstein, R., Honng, F., Young, L. J., Shew, J. Y. & Lee, H. P.: Human retinoblastoma susceptibility gene. *Science (Washington DC)*, 235, 1394-1399 (1987).
- 11) Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B.: Identification of chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science (Washington DC)*, 247, 49-56 (1990).
- 12) Takahashi, T., Nau, M. M., Chiba, I., Birrer, M. J., Rosenberg, R. K., Vinocour, M., Pass, H., Gazar, A. F. & Minna, J. D.: p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science (Washington DC)*, 246, 491-494 (1989).
- 13) Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., van Tuinen, P., Ledbetter, D. H., Baker, D. F., Nakamura, Y., White, R. & Vogelstein, B.: Chromosome 17 deletions and p53, gene mutations in colorectal carcinomas. *Science (Washington DC)*, 244, 217-221 (1989).
- 14) Prosser, J., Thompson, A. M., Cranston, G. & Evans, H. J.: Evidence that p53 behaves as a tumor suppressor gene in sporadic breast tumors. *Oncogene*, 5, 1573-1579 (1990).
- 15) Hsu, I. C., Metcalf, R. A., Sun, T., Welsh, J. A., Wang, N. J. & Harris, C. C.: Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature (Lond.)*, 350, 427-428 (1991).
- 16) Takahashi, M., Ritz, J. & Cooper, C. M.: Activation of novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell*, 42, 581-588 (1985).
- 17) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159 (1987).
- 18) Eliyahu, D., Michalovitz, D. & Oren, M.: Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature (Lond.)*, 316, 158-160 (1985).
- 19) Jenkins, J. R., Rudge, K. & Currie, G. A.: Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transform-

- ion-associated phosphoprotein p53. *Nature (Lond.)*, **312**, 651-654 (1984).
- 20) **Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T. H., Eliyahu, D., Oren, M. & Levine, A. J.**: Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms a hsc 70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 531-539 (1988).
- 21) **Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Ramano, J. W. & Ullrich, S. J.**: Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. USA*, **87**, 6166-6170 (1990).
- 22) **Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K. V. & Vogelstein, B.**: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science (Washington DC)*, **249**, 912-915 (1990).
- 23) **Buchman, V. L., Chumakov, P. M., Ninkina, N. N., Samarina, O. P. & Georgiev, G. P.**: A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene*, **70**, 245-252 (1988).
- 24) **Takahashi, T., D'Amico, D., Chiba, I., Buchhagen D. L. & Minna, J. D.**: Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. *J. Clin. Invest.*, **86**, 363-369 (1990).
- 25) **Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. & Hayashi, K.**: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**, 874-879 (1989).
- 26) **Sossi, T., Caron de Fromentel, C. & May, P.**: Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*, **5**, 945-952 (1990).
- 27) **Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., van Tuinen, P., Ledbetter, D. H., Baker, D. F., Nakamura, Y., White, R. & Vogelstein, B.**: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science (Washington DC)*, **244**, 217-221 (1989).
- 28) **Chiba, I., Takahashi, T., Nau, M. M., D'Amico, D., Curiel, D. T., Mitsudomi, T., Buchhagen, D. L., Carbone, D., Piantadosi, S., Koga, H., Reissman, P. T., Slamon, D. J., Holmes, E. C. & Minna, J. D.**: Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. *Oncogene*, **5**, 1603-1610 (1990).
- 29) **Bartek, J., Iggo, R., Gannon, J. & Lane, D. P.**: Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, **5**, 893-899 (1990).
- 30) **Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F. S., Weston, A., Modali, R., Harris, C. C. & Vogelstein, B.**: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **342**, 705-708 (1989).
- 31) **Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J. K. V., Hamilton, S. & Vogelstein, B.**: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.*, **50**, 7717-7722 (1990).
- 32) **Fushida, S., Urano, T., Yonemura, Y., Miyazaki, I. & Shiku, H.**: Frequent p53 mutations in human primary gastric cancer. *Cancer Res.*, in press.
- 33) **Banks, L., Matlashewski, G. & Crawford, L.**: Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 529-534 (1986).
- 34) **Oren, M., Maltzman, W. & Levine, A. J.**: Post translational regulation of the 53K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 101-110 (1981).

Frequent p53 Mutations in Human Gastric Cancer Cell Lines Sachio Fushida, Second Department of Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Jusen Med Soc., **101**, 147 - 154 (1992)

Key words p53 mutations, gastric cancer, RT-PCR-SSCP, immunohistostaining

Abstract

According to the developement of molecular biology, mechanisms of carcinogenesis, progression and metastasis are closely analysed. Suppressor genes have recently been analyzed in a variety of human cancers. However, analyses of suppressor genes in gastric cancer have been extremely limited. We therefore questioned whether p53 mutations would be observed in gastric cancer. RNA was extracted from 10 gastric cancer cell lines and northern blot analysis was performed. KATO III didn't express p53 gene due to complete deletion of p53 gene. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to amplify p53 cDNA using three sets of primers which covered well conserved and frequently mutating areas. There was no rearrangement in 9 cell lines except KATO III. RT-PCR products were then analyzed for the presence of mutations by single strand conformation polymorphism assays. Four of 9 cell lines showed shifted mobility and in all of them the presence of p53 mutations was confirmed by sequence analysis. Immunohistochemical study of p53 expression was also performed and p53 products were detectable only in the cases which had mutations. These results suggest that the p53 mutation appears to be the first major alteration of cellular genes in human gastric cancer.