

泌尿器科悪性腫瘍における癌遺伝子増幅と癌抑制遺伝子の不活化

—制限酵素切断多型性分析による検討—

金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 久住治男教授)

國見 一人 打林 忠雄 久住 治男

ONCOGENE AMPLIFICATION AND INACTIVATION OF TUMOR SUPPRESSOR GENES IN UROLOGICAL MALIGNANT TUMORS

—The Application of Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis—

Kazuto Kunimi, Tadao Uchibayashi and Haruo Hisazumi

Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

We applied restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis to 24 cases of renal cell carcinomas (RCC), 18 cases of prostate adenocarcinomas (PC), and 11 cases of transitional cell carcinomas (TCC) in the renal pelvis to study the oncogene amplification and inactivation of tumor suppressor genes. All of the cases showed no amplification nor gross rearrangements of the Harvey ras, c-myc, c-fos, c-myb, EGFR and PDGFR. In contrast, RFLP analyses demonstrated allelic losses interpreted as inactivational events of TSGs among the tumor forms studied. RCC had allelic losses on the short arm of chromosome 3 (3p) (68%), the long arm of chromosome 18 (18q) (33%), Y chromosome (29%), and 17p (27%) at high frequencies. PC showed frequent allelic losses on 16q (67%), 8p (50%), 18q (43%), 10p (40%), and 10q (38%). TCC had allelic losses on 17p (73%), 11p (64%), and 9p (40%). It was likely that the cases with the more malignant grade tumor had the more allelic losses.

Key words: tumor suppressor gene, restriction fragment length polymorphism analysis, urological malignancies

要旨: 手術的に得られた腎癌24例, 前立腺癌18例, 腎盂移行上皮癌11例に制限酵素切断多型性 (RFLP) 分析を施行し, 各種癌遺伝子の増幅, あるいは癌抑制遺伝子の不活化の有無につき検討した. Harvey ras, c-myc, c-fos, c-myb, EGFR, PDGFR いずれの癌遺伝子も各種瘍型にて DNA コピー数の過剰増加を呈さなかった. 一方, RFLP 分析にて癌抑制遺伝子の不活化を示す染色体座位欠失所見が各種瘍型で検出された. 腎癌では, 第3染色体短腕 (3p) に68%, 第18染色体長腕 (18q) に33%, Y染色体に29%, 17p に27%の順に高頻度に座位欠失が見られた. 前立腺癌では, 16q(67%), 8p(50%), 18q(43%) 10p (40%), 10q (38%) に, 腎盂移行上皮癌では, 17p (73%), 11p (64%), 9p (40%) に高頻度の座位に欠失が認められた. 各種瘍型において癌細胞の悪性度が高い症例ほど多数の座位欠失を伴う傾向を示した.

キーワード: 癌抑制遺伝子, 制限酵素切断多型性分析, 泌尿器科領域悪性腫瘍

緒 言

癌化に関与する遺伝子群はその作用様式の相違により2つに大別されている. 一つは癌遺伝子(オンコジーン; oncogene)であり, 正常細胞ではプロトオンコジーン(proto-oncogene)として正常な細胞発育・分化の調節系を司る蛋白を産生している. 1対の相同染色体上の同一座位にある二つのプロトオンコジーンコ

ピーの一方に点突然変異(point mutation)もしくは過剰増加・発現(amplification)をもたらす優性変異により, 癌遺伝子に変化する. 1983年に, 第12コードンに点突然変異(GGC→GTC)を有する Harvey ras 遺伝子が, 初めてヒト膀胱癌細胞株(T24/EJ)から分離・同定された¹⁾. また, ヒト骨髄性白血病細胞における c-myc 遺伝子の過剰発現²⁾をはじめ, *in vivo* 悪性腫

場における数多くの癌遺伝子研究がなされている³⁴⁾。

一方、癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) は、正常状態では癌化を抑制する機能を有しかつ2つの遺伝子コピーともに変異または欠失が生じ、産生蛋白の機能的不活化をもたらす劣性変異により癌化に關与する。1984年 Cavenee ら⁵⁾、Dryja ら⁶⁾は、小児網膜芽細胞腫に制限酵素切断多型性分析 (restriction fragment length polymorphism [RFLP] analysis) を行い、第13染色体長腕バンド14 (13q14) の欠失が高頻度に認められると報告した。同座位に癌抑制遺伝子が存在しかつ同遺伝子の二段階の不活化機序の一つが座位欠失として検出されると推察された。従って、RFLP 分析は腫瘍細胞ゲノムで起こっている癌抑制遺伝子の不活化現象を間接的に証明しうる方法として位置付けられた⁷⁾⁸⁾。

今回、RFLP 分析を泌尿器科悪性腫瘍 (腎癌、前立腺癌、腎盂移行上皮癌) に応用し、これら各種癌における DNA レベルでの癌遺伝子および癌抑制遺伝子の異常に関する検討を行った。

対象および方法

I. 対象

1986年から1989年にスウェーデンカロリンスカ病院泌尿器科において外科的摘除術を施行し得られた腎癌24例、前立腺癌18例、腎盂移行上皮癌11例を対象とした。いずれも術前補助療法は施行されていない症例で、前立腺癌のリンパ節転移巣4例、および脳転移巣4例以外はすべて原発巣であった。

II. DNA 抽出

摘除後、癌および正常組織片を約0.5g採切し、一部を病理診断用にホルマリン固定し、残り組織片を直ちに-80℃に凍結・保存した。凍結固形組織より高分子ゲノム DNA をフェノール・クロロホルム法⁹⁾にて抽出した。TE⁻⁴溶液 (10mM トリス-塩酸緩衝液, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid) にゲノム DNA を溶解させ、DNA 濃度は分光光度計にて260nm 吸光度より測定した。

III. サザンブロッティング法

高分子状態のゲノム DNA 7 μ g を各種制限酵素にて処理し得られた多数の DNA フラグメントをゲル電気泳動にてサイズ分画化した。その後、ゲルを0.4M 水酸化ナトリウム、0.6M 塩化ナトリウム溶液で二重鎖フラグメントを一重鎖に変性させ、ナイロン膜にブロットした。24時間後、膜を80℃、2時間ベイキングし、

一重鎖フラグメントをナイロン膜に固定した¹⁰⁾。

IV. 癌遺伝子の DNA 増幅

Harvey ras, c-myc, c-fos, c-myb, EGFR および PDGF 癌遺伝子の塩基配列に相補的な DNA プローブ¹¹⁾をランダムプライミング法¹²⁾を用いて³²P 標識し、サザンハイブリダイゼーションに用いた。ナイロン膜を6 \times saline sodium citrate (SSC), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA, 0.2% フィコール, 0.2% ウシアルブミンおよび0.2% ポリビニールピロリドンを含む溶液中で2時間、65℃でプレハイブリダイゼーションを行った。次いで³²P 標識 DNA プローブとともにハイブリダイゼーション溶液 (6 \times SSC, 1% SDS, 100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA, 50% ホルムアルミドおよび5% デキストランスルフェート) 中で24時間、42℃でハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜を2 \times SSC, 1% SDS 溶液および0.1 \times SSC, 0.1% SDS 溶液で洗浄後、-80℃でオートラジオグラフィを行った。

V. RFLP 分析

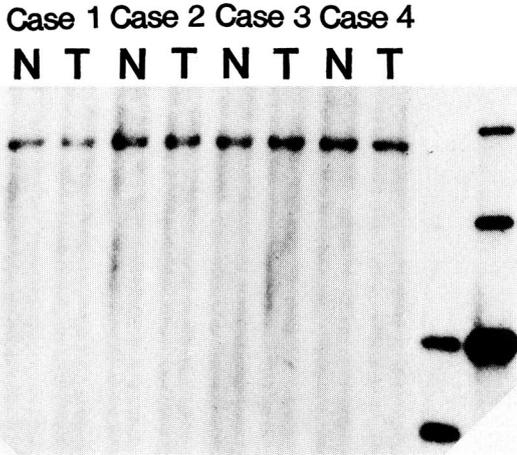
acrocentric chromosome と呼ばれる第13, 14, 15, 21, 22染色体短腕部を除く全染色体短・長腕にマップされている DNA プローブ¹¹⁾を同様に³²P 標識し、同様にサザンハイブリダイゼーションに用いた。使用した DNA プローブを以下に示す (カッコ内は DNA プローブの染色体マップ部位を示す, p; 短腕, q; 長腕), NFGB, D1S2(1p), REN(1q), D2S6, D2S44(2p), D2S3 (2q), DNF15S2, RAF-1 (3p), D3S31 (3q), D4S23, D4S125(4p), FGA(4q), D5S4, D5S21(5p), D5S22, D5S36(5q), D6S8, D6S10(6p), MYB, D6S44 (6q), EGF-R (7p), MET, MDR1 (7q), D7S11 (7p-q), NEFL, D8S7 (8p), TG, MYC, (8q), INFA, INFB1 (9p), ASSP3, D9S7 (9q), D10S17, D10S24(10p), PLAU, D10S25(10q), HRAS1, CAT, D11S12 (11p), PYGM, D11S34 (11q), D12S16 (12p), D12S7 (12q), D13S3, D13S5 (13q), FOS, D14S1(14q), D15S1, D15S10(15q), HBZP, D16S35(16p), D16S7, D16S20(16q), MYH2, D17S28, D17S34(17p), GH1, D17S24 (17q), D18S3 (18p), D18S5 (18q), D19S11 (19p), D19S8 (19q), D20S6 (20p), D20S4, D20S8 (20q), D21S8, D21S17 (21q), PDGFB (22q), DXS7(Xp), DXYS1X(Xq), DXYS20(XYp).

結果

I. 癌遺伝子 DNA コピーの異常

いずれの腫瘍型においても検討した Harvey ras,

Fig. 1 An example of Southern autoradiogram hybridized with c-myc gene probe. Lane N and T denote normal and tumor DNA from an individual, respectively. Genomic DNA was digested with TaqI. No c-myc gene amplification is detected. Nor is shown the gross rearrangement of the gene structure.



c-myc, c-fos, c-myb, EGFR, PDGFR 癌遺伝子の DNA レベルでの著明なコピー数増幅を示唆する所見は得られなかった (Fig. 1)。また、正常および腫瘍 DNA 間で明らかなシグナルサイズの相違を示さなかった。従って、点突然変異やサザンブリダイゼーションにて検出不可能な塩基配列の突然変異や小範囲の欠落・挿入の場合を除き、検討した癌遺伝子の DNA 増幅がこれら腫瘍型の腫瘍原性に関わっている所見は認められなかった。

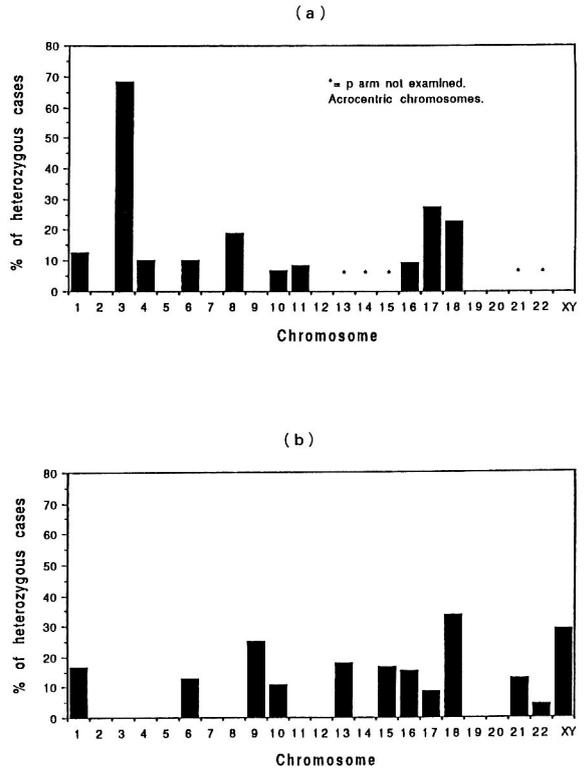
II. RFLP 分析による染色体欠失座位同定

1. 腎癌

腎癌24例中16例 (67%) にいずれかの染色体座位上に2つのシグナルのうち一方の欠失、つまりヘテロ接合性の消失が検出された。座位欠失を示す染色体は多岐にわたるものの第3染色体短腕(3p)に正常 DNA にてヘテロ接合性を示す22例中15例 (68%) に最も高頻度にヘテロ接合性の消失が認められた。次いで、第18染色体長腕 (18q) に15例中5例 (33%)、Y染色体に14例中4例 (29%)、17p に11例中3例 (27%) に座位欠失が検出された (Fig. 2)。Fig. 3 に3p 上に位置する DNA プローブ、DNF15S2を用いた際のオートラジオグラムを示す。

各症例における Skinner による腫瘍細胞の悪性度

Fig. 2 Losses of alleles from p arms (a) and q arms (b) of chromosomes in renal cell carcinoma as a % of heterozygous cases. (n=24)



分類と欠失座位数を比較すると (Table 1), grade II 7例中平均欠失座位数は0.86(範囲0~1), grade III 16例中2.25 (範囲0~9), grade IV は1例のみで欠失座位は4箇所であった。grade III 群では1箇所以下の座位欠失を示した症例は10例で、それ以外は2~9箇所と grade III 群内で欠失座位数にバラツキが見られたが、grade が進展するに従い、座位欠失が多くなる傾向を示した。UICC による臨床病期分類では、stage II 群6例中平均欠失座位数は1.83(範囲0~6), stage III 群13例中2.00 (範囲0~9), stage IV 群4例中2.00(範囲0~7), stage VI 症例は1例のみで欠失座位数は1箇所であり、臨床病期と欠失座位数との明らかな相関は見られなかった。

2. 前立腺癌

18例の前立腺癌のうち、12例 (67%) に少なくとも一つ以上の染色体短腕または長腕座位にヘテロ接合性の消失が認められた。腎癌と同様座位欠失は種々の染色体に見られ、16q にヘテロ接合性を示す9例中6例

Fig. 3 Loss of heterozygosity on 3p in tumor (T) DNA as compared with normal (N) DNA in renal cell carcinoma cases. Genomic DNA was digested with Hind III and the DNF15S2 probe was used. The alleles (A1 and A2) observed are indicated to the left side of autoradiogram; C, constant band. The third and fourth lane from the left side are size marker signals.

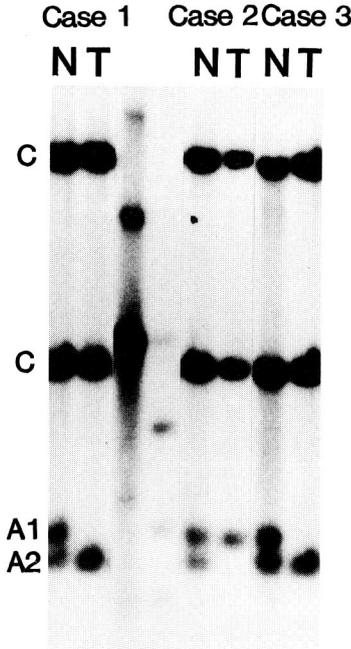
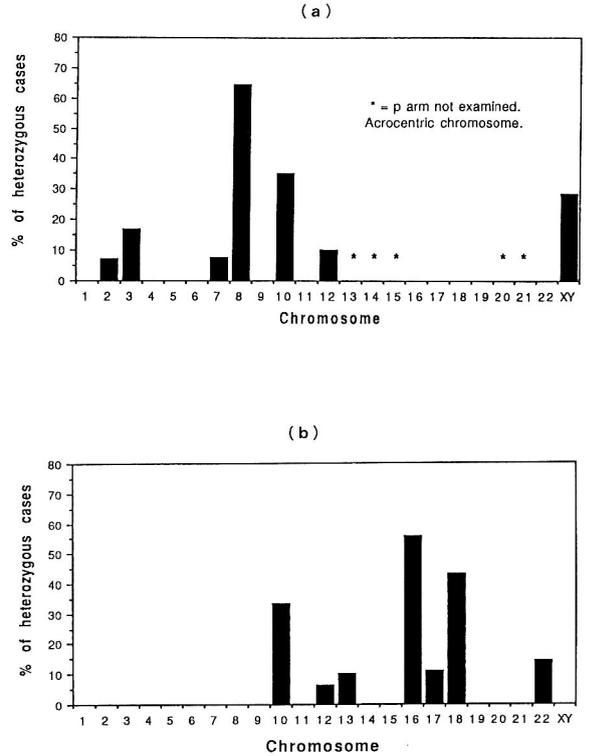


Table 1 Relationship between malignancy grade of tumor cells, clinical stage and number of loci lost in renal cell carcinoma

Malignancy grade	Number of cases	Number of loci lost	
		Average	Range
Grade II	7	0.86	0-1
Grade III	16	2.25	0-9
Stage			
II	6	1.83	0-6
III	13	2.00	0-9
IV	4	2.00	0-7
V	1	1.00	1

(67%), 8pに6例中3例(50%), 18qに7例中3例(43%), 10pに10例中4例(40%), 10qに13例中5例(38%)の順に高頻度であった(図4)。また、12例のヘテロ接合性の消失を認めた症例は、全例第16, 8, 10染色体のいずれかに座位欠失を伴っていた。8pに位

Fig. 4 Losses of alleles from p arms (a) and q arms (b) of chromosomes in prostate adenocarcinoma as a % of heterozygous cases. (n=18)



置する DNA プローブ, NEFL にてヘテロ接合性の消失を示した症例を Fig. 5 に呈示する。

各症例における腫瘍細胞の悪性度を分化型と未分化型とに大別し欠失座位数を比較すると、前者10例中平均1.00(範囲0~4)であったのに対し、後者8例では平均2.63(範囲0~6)と後者で多くなる傾向が認められた。なお、前者で4箇所欠失を認めた症例は脳転移巣の1例のみで、他の9例は2箇所以下の座位に欠失を示した。臨床病期との比較では、10例の原発巣では、4箇所の欠失座位を有する1例を除く平均欠失座位数は0.33(範囲0~1)であった。4例の所属リンパ節転移巣症例では全例2箇所に座位欠失を示し、4例の脳転移巣症例では平均4.00(範囲1~6)の欠失を示し、臨床病期の進展に伴い座位欠失が多く認められた(Table 2)。

3. 腎盂移行上皮癌

11例全例に種々の染色体に少なくとも一つ以上の座位にヘテロ接合性の消失が認められ、中でも17pに11

Fig. 5 Representative Southern autoradiogram demonstrating loss of heterozygosity on 8p in prostate adenocarcinoma cases. The restriction enzyme used is TaqI and the NEFL probe was hybridized, indicating two alleles, A1 and A2. The left two lanes are the size marker signals. All cases except for case 1 show allelic losses.

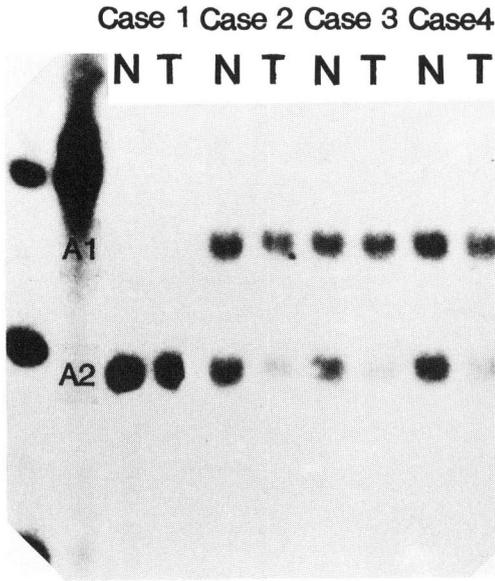
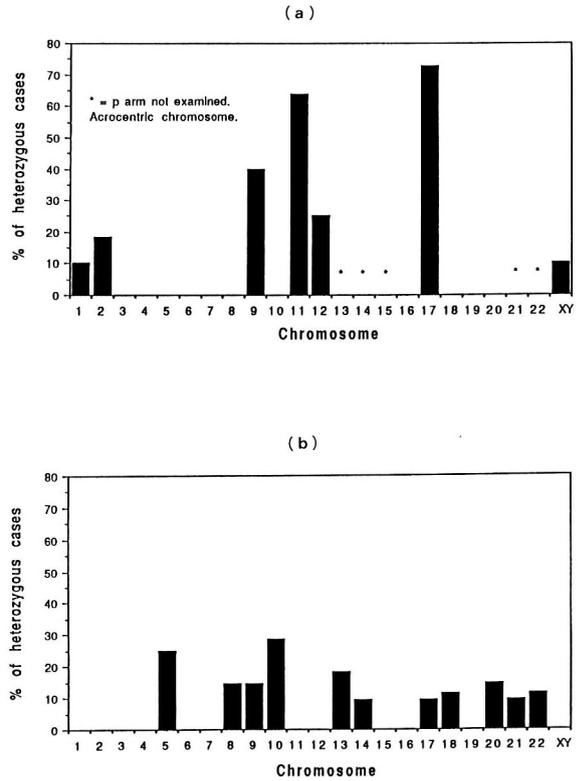


Table 2 Relationship between malignancy grade of tumor cells, clinical stage and number of loci lost in prostate adenocarcinoma

Malignancy grade	Number of cases	Number of loci lost	
		Average	Range
Highly differentiated	10	1.00	0-4
	One case (Brain meta.) Nine cases	4 0.33	4 0-1
Poorly differentiated	8	2.63	0-6
Stage Primary	10	0.70	0-4
	One case (Poorly diff.) Nine cases	4 0.33	4 0-1
Lymph node meta.	4	2.00	2
Brain meta.	4	4.00	1-6

例中 8 例 (73%), 11p に 11 例中 7 例 (64%), 9p に 10 例中 4 例 (40%) の順に座位欠失所見が得られた (Fig. 6). 11 例全例は少なくともこれらの染色体座位いずれかに欠失を伴っていた. Fig. 7 に 1 症例のオートラジ

Fig. 6 Losses of alleles from p arms (a) and q arms (b) of chromosomes in urothelial carcinoma as a % of heterozygous cases. (n=11)



オグラムを示す.

各症例の癌細胞悪性度分類別では, 7 例の grade II 症例では平均欠失座位数が 2.57 (範囲 1 ~ 5) であったのに対し, 4 例の grade III 症例のそれは 5.00 (範囲 2 ~ 9) と高値を示した (Table 3). 臨床病期との比較は, 全例原発巣であったため検討し得なかった.

各腫瘍型で比較的高頻度に欠失を示した染色体座位のうち, 腎癌と前立腺癌における 18q および腎癌と腎盂移行上皮癌における 17p は共通して認められた欠失座位であったが, 他の欠失座位はそれぞれの腫瘍型に特異的であった.

考 察

癌細胞の発生起源を遺伝子学的背景に求める発想は, 19 世紀に遡ることができる. 当時の病理学者達は, 癌細胞内の異常核分裂像を顕微鏡レベルで描出しようと試みた. 1902 年に Boveri は, 2 つのウニ精子を同時に卵子に受精させると異常核分裂が誘導され, その娘細胞染色体に欠失が生じ, さらに囊胚に未分化腫瘍類

Fig. 7 Loss and retention of heterozygosity in an individual urothelial carcinoma case. The restriction enzyme used to digest genomic DNA and the DNA probes are indicated below each autoradiogram. Note loss of the INFB1 allele A2, the CAT allele A1, the D17S34 allele A2 and the D17S28 allele A1. Both the A1 and A2 alleles of the D9S7 and the GHI loci are retained.

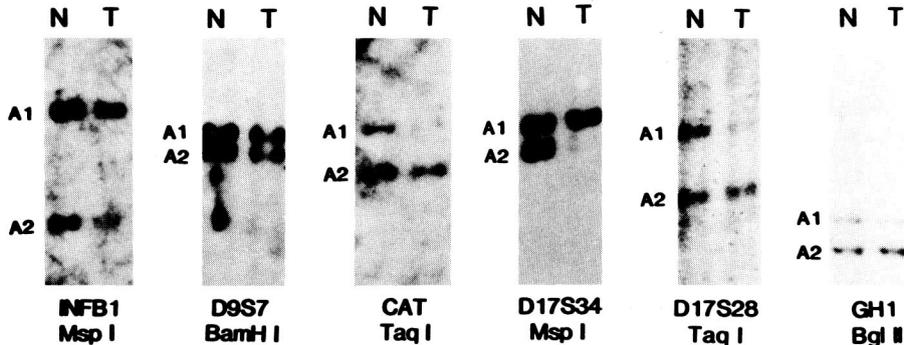


Table 3 Relationship between malignancy of tumor cells and number of loci lost in urothelial carcinoma

Malignancy grade	Number of cases	Number of loci lost	
		Average	Range
Grade II	7	2.57	1-5
III	4	5.00	2-9

似の異型組織が発生したと述べている。著書“On the question of origin of malignant tumor”¹⁵⁾の中で彼は、癌細胞発生は不安定で不均等な核分裂に由来するとし、染色体異常に起因する仮説を提唱した。しかし、その概念を客観的所見として証明するには核型染色体分析法 (karyotype analysis) の登場を待たねばならず、20世紀中盤になってからである。その分染法の技術的進歩により、ヒト正常細胞ゲノムが22対の常染色体と1対の性染色体より成ることが解明され、同時に腫瘍細胞ゲノムにおける腫瘍特異的な染色体異常所見が報告されるに至った^{16)~18)}。

分子生物学的手法の発達には染色体レベルでの異常所見検出に加えて遺伝子レベルの解析を可能にしつつある。癌遺伝子は元来トランスフォーム能を有するレトロウイルスより分離された遺伝子群である。その後癌遺伝子のある正常細胞に移入すると悪性細胞に変化する現象が観察された。現在までに約30種類同定されており、それぞれヒト正常細胞の発育・分化調節系を司る蛋白を産生するプロトオンコジーンの変異型である

ことが判明している。

一方、癌抑制遺伝子の存在概念は、1969年 Harris により報告された体性細胞融合の研究体系に見いだすことができる¹⁹⁾。in vitro で正常線維芽細胞と線維芽肉腫細胞とを細胞融合させると腫瘍原性を有しないハイブリッド細胞が発生したと報告している。以後種々の正常細胞と腫瘍細胞間の融合実験が追試され、腫瘍原性を持たないハイブリッド細胞をさらに培養すると特定染色体の消失とともに腫瘍原性が再獲得された所見が観察されている。これらの所見は、正常細胞染色体に腫瘍原性への誘導を抑制する機能を持つ遺伝子または遺伝子学的要素が存在し、腫瘍細胞ではこれら遺伝子学的因子の欠損・消失が生じているものと解釈された²⁰⁾。

癌抑制遺伝子の存在は臨床上的ヒト悪性腫瘍における研究からも証明されており、小児網膜芽細胞腫の細胞遺伝学的・分子生物学的研究に集大成されている。その核型染色体分析にて、家族性発生例ではその正常細胞に、散発性発生例ではその腫瘍細胞に、一部の症例で第13染色体の1対の相同染色体のうち一方に13q14の欠失が認められた²¹⁾²²⁾。1984年、Cavenee ら⁵⁾、Dryja ら⁶⁾は、同染色体長腕にマップされている DNA プロブを用いて RFLP 分析を行い、染色体核型像にて検出し得ない症例でも13q14の欠失が認められることを報告した。一方、1971年 Knudson は、小児網膜芽細胞腫の疫学的検討を行い、発癌における two-hit theory、すなわち正常網膜細胞の癌化には二段階の変異現象が必要であるとする仮説を提唱した²³⁾。以上の総

合所見より、13q14に網膜芽細胞腫の発癌に關与する癌抑制遺伝子が存在し、同時に同遺伝子の二段階の不活化現象の一方が染色体座位の欠失として現われ、RFLP析では検出不可能なもう一方の変異が残存コピーに生じているものと推察された。1986年には、Friendら²⁴⁾、Leeら²⁵⁾、Fungら²⁶⁾により13q14からretinoblastoma 1 gene (RB1) 遺伝子がクローニングされ、1988年、Huangら²⁷⁾、Booksteinら²⁸⁾は、*in vitro* 網膜芽細胞腫細胞に正常型RB1遺伝子をトランスフェクションさせると同遺伝子産生蛋白の発現と同時に腫瘍原性が減弱したことから、RB1遺伝子が癌抑制遺伝子のカテゴリーに属することを直接的に証明した。従って、他のヒト悪性腫瘍にRFLP分析を応用し染色体座位欠失を同定することは、同部に存在する癌抑制遺伝子の不活化現象が起こっていることの間接的証明になるものと解釈された。

現在では、RFLP分析に基き種々のヒト悪性腫瘍における欠失座位が複数の染色体上で同定されている。癌抑制遺伝子として最初に同定されたRB1遺伝子に不活化が生じている可能性を示す13q14の欠失は、今回検討した泌尿器科悪性腫瘍では、いずれも低率にしか認められなかったが、一方では網膜芽細胞腫のみならず骨肉腫、肺癌、乳癌などの他臓器悪性腫瘍のRFLP分析でも報告されている⁷⁸⁾。また、直腸癌と今回検討した腎癌、前立腺癌に観察された18qの欠失、ならびに直腸癌、肺癌、乳癌、グリオーマなどと腎癌、腎盂移行上皮癌に観察された17pの欠失などのように、ある特定の癌抑制遺伝子の不活化は異なる腫瘍型間の発癌・プログレッションに共通し認められる現象であることを示唆するものである⁷⁸⁾。RFLP分析上17pに欠失を示した直腸癌、肺癌、乳癌、膀胱癌などにおいて、17pにマップされているp53遺伝子の残存コピーが点突然変異を有していたとする劣性不活化現象が報告されており^{29)~31)}、また正常型p53遺伝子を同遺伝子が不活化している直腸癌培養細胞にトランスフェクションさせると癌細胞の増殖が抑制されたとする報告³²⁾と併せて、p53遺伝子が癌抑制遺伝子として注目されている。従って、我々が今回検討した17pの欠失を示した腎盂移行上皮癌、腎癌例においてもp53遺伝子が不活化している可能性を示唆するものであり、現在検討中である。一方では腎癌における3pの欠失、前立腺癌における8p、16qの欠失、腎盂移行上皮癌における11pの欠失などは、未だこれら欠失部位より癌抑制遺伝子が同定されてはいないが、これら泌尿器科悪性腫瘍

間で腫瘍特異的に検出されており、各種瘍型の発癌・プログレッションが経路を異にする遺伝子学的異常背景の上に成り立っていることを表すものである。

今回我々が行ったRFLP分析は、非常に短い領域である第13、14、15、21、22染色体短腕を除く全染色体における欠失座位のスクリーニングであり、全染色体核型像を顕微鏡下で観察する従来の核型染色体分析法に対比し、Vogelsteinらはallelotype analysisと命名している¹⁴⁾。散見される腎癌のRFLP分析では、3pの欠失が最も高頻度に見られる共通した所見である^{33)~36)}。本研究結果では頻度は低くなるもののさらに18q、Y染色体、および17pに欠失所見が認められ、これら座位上の癌抑制遺伝子の不活化が複雑に腎癌の腫瘍原性に関わっているものと考えられた。Carterらは、前立腺癌のRFLP分析を行い、3p、7q、9q、10p、10q、11p、13q、16p、16q、17p、18qの11染色体部位を調べ、16qおよび10qにヘテロ接合性の消失が30%に認められ、これらの欠失部位に存在すると考えられる癌抑制遺伝子の不活化が前立腺癌の癌化に少なからず関与しているものと推察しており³⁷⁾、本検討においてもそれを支持する結果が得られたと同時にさらに8p、18q、10pに存在する癌抑制遺伝子の不活化現象も前立腺癌で生じていることが示唆された。腎盂移行上皮癌における17p、11pの欠失は、膀胱移行上皮癌において同様の結果が得られたとする報告³⁸⁾と合わせて尿路移行上皮癌に共通し認められる異常所見であるものと推察された。

直腸癌の分子生物学的研究成果によれば、正常直腸上皮細胞から、前癌病変であるadenomaを経てcarcinoma, metastatic phenotypeを示す腫瘍へと進展する際にそれぞれ必要な癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常が示されており³⁹⁾、癌化の多段階説を遺伝子学的背景から支持するものである。今回検討した腫瘍型で悪性度が高い症例ほど多数の染色体座位の欠失、すなわち癌抑制遺伝子の不活化が生じている所見が得られたことは、従来の評価基準に加え新たな遺伝子学的異常に基づいた癌細胞の生物学的悪性度診断の可能性を示唆するものである。

以上より、泌尿器科悪性腫瘍のRFLP分析にて、各種瘍間に共通した、もしくは特異的に検出された染色体部位が広く認められたことは、複数の癌抑制遺伝子の不活化がこれら腫瘍型の発癌・プログレッションに關与しているものと推察された。

稿を終えるにあたり、直接御指導、御校閲を賜った

Sweden Karolinska Hospital, V. Peter Collins 教授なら
びに Lennart Andersson 教授に深謝致します。また、本研
究遂行に御協力頂いた教室員各位に感謝致します。

文 献

- 1) Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. and Barbacid, M.: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, 300, 149—152, 1982.
- 2) Collins, S.J. and Groudine, M.: Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature*, 298, 679—681, 1982.
- 3) Bos, J.L.: Ras oncogenes in human cancer; a review. *Cancer Res.*, 49, 4682—4689, 1989.
- 4) Slamon, D.J., deKernion, J.B., Verma, I.M. and Cline, M.J.: Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science*, 224, 256—262, 1984.
- 5) Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C. and White, R.L.: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 305, 779—784, 1983.
- 6) Dryja, T.P., Rapaport, J.M., Weichselbaum, R. and Bruns, G.A.P.: Chromosome 13 restriction fragment length polymorphisms. *Hum. aGenet.*, 65, 320—324, 1984.
- 7) Green, A.R.: Recessive mechanisms in malignancy. *Br. J. Cancer*, 58, 115—121, 1988.
- 8) Ponder, B.: Gene losses in human tumours. *Nature*, 335, 400—402, 1988.
- 9) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- 10) Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503—517, 1975.
- 11) Kidd, K.K., Bowcock, A.M., Schmidtke, J., Track, R.K., Ricciuti, F., Hutchings, G., Bale, A., Pearson, P. and Willard, H.F.: Report of the DNA committee and catalog of cloned and mapped genes and dna polymorphisms. Tenth International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.*, 51, 622—947, 1989.
- 12) Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132, 6—13, 1983.
- 13) Skolnick, M.H. and White, R.: Strategies for detecting and characterizing restriction fragment length polymorphisms (RFLP's). *Cytogenet. Cell Genet.*, 32, 58—67, 1982.
- 14) Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y. and White, R.: Allelotype of colorectal carcinoma. *Science*, 244, 207—211, 1989.
- 15) Boveri, T.: *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. 2nd ed., Verlag von Gustav Fischer, Jena, 1914.
- 16) Sandberg, A.A. and Turc-Carel, C.: The cytogenetics of solid tumors. *Cancer*, 59, 387—395, 1987.
- 17) Heim, S., Mandahl, N. and Mitelman, F.: Genetic convergence and divergence in tumor progression. *Cancer Res.*, 48, 5911—5916, 1988.
- 18) Teyssier, J.R.: The chromosomal analysis of human solid tumors. A triple challenge. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 37, 103—125, 1989.
- 19) Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P. and Tachibana, T.: Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, 223, 363—368, 1969.
- 20) Klein, G.: The approaching era of the tumor suppressor genes. *Science*, 238, 1539—1545, 1987.
- 21) Balaban, G., Gilbert, F., Nichols, W., Meadows, A.T. and Shields, J.: Abnormalities of chromosome #13 in retinoblastomas from individuals with normal constitutional karyotypes. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 6, 213—221, 1982.
- 22) Benedict, W.F., Banerjee, A., Mark, C. and Marpfree, A.L.: Non-random chromosomal changes in direct preparations of primary retinoblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 10, 311—333, 1983.
- 23) Knudson, A.G.: Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 820—823, 1971.
- 24) Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. and Dryja, T.P.: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323, 643—646, 1986.
- 25) Lee, W.H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.J., Shew, J.Y. and Lee, E.Y.H.P.: Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. *Science*, 235, 1394—1399, 1987.
- 26) Fung, Y.K.T., Murphree, A.L., T'ang, A., Qian, J., Hinrichs, S.H. and Benedict, W.F.: Struc-

- tural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, 236, 1657—1661, 1987.
- 27) Huang, H.J.S., Yee, J.K., Shew, J.Y., Chen, P.L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E.Y.H.P. and Lee, W.H.: Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science*, 242, 1563—1566, 1988.
- 28) Bookstein, R., Shew, J.Y., Chen, P.L., Scully, P. and Lee, W.H.: Suppression of tumorigenicity of human prostatic carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science*, 247, 712—715, 1989.
- 29) 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. and Vogelstein, B.: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 342, 705—708, 1989.
- 30) Varley, J.M., Brammar, W.J., Lane, D.P., Swallow, J.E., Dolan, C. and Walker, R.A.: Loss of chromosome 17p13 sequences and mutation of p53 in human breast carcinomas. *Oncogene*, 6, 413—421, 1991.
- 31) Sidransky, D., von Eschenbach, A., Tsai, Y.C., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., Paul, M., Green, P., Hamilton, S.R., Frost, P. and Vogelstein, B.: Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, 252, 706—709, 1991.
- 32) Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K.V. and Vogelstein, B.: Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*, 249, 912—915, 1990.
- 33) Zbar, B., Brauch, H., Talmadge, C. and Linehan, M.: Loss of alleles on loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature*, 327, 721—724, 1987.
- 34) Kovacs, G., Erlandsson, R., Boldog, F., Ingvarsson, S., Muller-Brechlin, R., Klein, G. and Sumegi, J.: Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 1571—1575, 1988.
- 35) Morita, R., Ishikawa, J., Tsutsumi, M., Hikiji, K., Tsukada, Y., Kamidono, S., Maeda, S. and Nakamura, Y.: Allelotype of renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 51, 820—823, 1991.
- 36) Ogawa, O., Kakehi, Y., Ogawa, K., Koshiba, M., Sugiyama, T. and Yoshida, O.: Allelic loss at chromosome 3p characterizes clonal cell phenotype of renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 51, 949—953, 1991.
- 37) Carter, B.S., Ewing, C.M., Ward, W.S., Treiger, B.F., Aalders, T.W., Schalken, J.A., Epstein, J.I. and Isaacs, W.B.: Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 8751—8755, 1990.
- 38) Tsai, Y.C., Nichols, M.P.W., Hiti, A.L., Williams, Z., Skinner, D.G. and Jones, P.A.: Allelic losses of chromosome 9, 11, and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.*, 50, 44—47, 1990.
- 39) Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M.M. and Bos, J.L.: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Eng. J. Med.*, 319, 525—532, 1988.

(1991年8月16日受理)