

Detection of Mutations of p53 Tumor Suppressor Gene in Pancreatic Juice and Its Application to Diagnosis of Patients with Pancreatic Cancer

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/2297/9355

膵液中 *p53* 癌抑制遺伝子変異の検出と その膵癌診断への応用に関する研究

金沢大学がん研究所 内科部 (主任: 澤武紀雄教授)

山 口 泰 志

膵癌では胃癌や大腸癌のように生検が行えない事が、その早期診断や鑑別診断において大きな隘路になっているので、膵液中DNA診断に大きな期待が寄せられ、膵液中*K-ras*癌遺伝子変異の検出が試みられている。しかし、その陽性率は高いものの、偽陽性がかなり見られ、癌特異性が問題となっている。この様な点を補完し、膵液中DNA診断の向上を目指して、内視鏡下経乳頭的に採取した膵液からDNAを抽出し、*p53*癌抑制遺伝子変異の有無を検討した。更に、*K-ras*コドン12変異の有無も同時に検討し、その対比より膵液中*p53*遺伝子分析の臨床的意義を明らかにしようとした。*p53*遺伝子分析に用いたPCR非ラジオアイソトープ一本鎖高次構造多型分析 (PCR nonradioisotopic-single strand conformation polymorphism analysis, nonRI-SSCP) 法の検出感度は、細胞株を用いた検討で正常DNAに対して変異DNAの割合が0.1%まで変異バンドの検出が可能であった。本法による*p53*遺伝子変異は膵癌の42.3% (26例中11例) に認められ、3例で塩基配列が決定され得、2例はミスセンス変異、1例は停止コドンへの変異であった。一方、粘液産生膵腫瘍 (腺腫) 4例と慢性膵炎16例の膵液の何れにも*p53*遺伝子変異は検出されなかった。膵癌の膵液中*K-ras*遺伝子変異の検討では、癌特異性に問題はあるが、検出感度に優れている改変PCR制限酵素断片長多型分析 (modified PCR restriction fragment length polymorphism analysis, PCR-RFLP) 法で84.0% (25例中21例)、定量的方法で癌特異性に優れているハイブリダイゼーションプロテクション分析 (hybridization protection assay, HPA) 法で65.3% (26例中17例) に変異が検出された。*p53*遺伝子と*K-ras*遺伝子変異の有無を組み合わせると、*K-ras*遺伝子分析にPCR-RFLP法、HPA法何れを用いた場合でも*p53*遺伝子変異単独陽性が2例ずつに見られ、両者の併用診断率は前者で92.0% (25例中23例)、後者で73.1% (26例中19例) にまで向上した。以上より膵癌における膵液中*p53*遺伝子変異の癌特異性は非常に高く、*K-ras*遺伝子変異陰性例にも*p53*遺伝子陽性例が見られ、*K-ras*遺伝子変異と組み合わせることにより、膵癌の遺伝子診断の向上することが示唆された。

Key words *p53*, *K-ras*, pancreatic cancer, pancreatic juice, genetic diagnosis

膵癌は悪性腫瘍の中でも最も予後不良の疾患の一つである。それは、癌の治療戦略の基本である早期診断が極めて難しく、多くの場合根治的治療の困難な進行癌の段階で初めて発見される場合の多いことに帰するところが大きい¹⁾。この問題の解決のために、これまでも画像診断や腫瘍マーカーなどにおいて鋭敏で、確実な診断法の開発に多くの努力がなされてきたが、未だ有効性の高いものはないといっても過言ではない。特に、癌の診断において最も重要な生検や細胞診などの病理学的診断法に関して、膵癌においては胃癌や大腸癌のように非観血的で簡便に質的診断を得られる方法が確立されていないことが大きな制約になっている。一方、近年癌の分子生物学的研究の進歩によって、膵癌で種々の癌関連遺伝子異常の発現することが明らかにされ、特に*K-ras*癌遺伝子コドン12の点突然変異が膵癌組織で75-100%と高頻度に発現していることが報告されている²⁾⁻⁵⁾。当教室では、従来より膵疾患患者から内視鏡的に採取した膵液中の生理活性物質や腫瘍マーカーを分析し各種膵疾

患の診断法に応用しようとする研究が行われてきた⁶⁾⁻⁸⁾。このような経験を踏まえて、膵液中の*K-ras*癌遺伝子コドン12の点突然変異の分析を試みたところ、改変PCR制限酵素断片長多型分析 (modified PCR-restriction fragment length polymorphism analysis, PCR-RFLP) 法で、80%以上に変異の検出という成績が得られ、膵癌の新たな質的診断法として、内外より大きな注目を集めている⁹⁾⁻¹²⁾。その後、多くの追試の報告がなされているが¹³⁾⁻¹⁷⁾、検出感度を高めると、粘液細胞過形成に由来する*K-ras*変異も検出されることが明らかとなり¹⁸⁾、偽陽性が出るのが問題となっている¹⁹⁾。この様な点を補完するため、膵液中の癌特異性の高い指標として、他の癌関連遺伝子の分析が如何に有用であるかを明らかにすることは重要な課題である。

癌抑制遺伝子の代表的存在である*p53*遺伝子は²⁰⁾²¹⁾、点突然変異などによる異常を起こすことによって正常*p53*蛋白の機能が失われ、細胞周期においてG1停止を回避し、さらにアポト

平成8年9月30日受付、平成8年11月5日受理

Abbreviations : AE, acridinium ester; bp, base pair; ERCP, endoscopic retrograde cholangiopancreatography; HPA, Hybridization protection assay; nonRI-SSCP, nonradioisotopic -single strand conformation polymorphism analysis; RFLP, restriction fragment length polymorphism; RI, radioisotope

ーシスを阻害し癌化を引き起こすと考えられている^{22,23)}。これまでのヒト膵癌の組織レベルの検討では、*p53* 遺伝子変異は40-76%に認めると報告されているが^{24)~26)}、膵液中*p53* 遺伝子変異について検討された報告は未だ無い。

本研究では膵疾患患者より内視鏡的に採取した純膵液からDNAを抽出し、*p53* 遺伝子変異の有無を検索し、その膵癌診断における有用性を検討した。さらに、*K-ras* 遺伝子コドン12変異の有無も同時に検討し、それらの対比により膵液中*p53* 遺伝子分析の臨床的意義も明らかにしようとした。

対象および方法

I. 実験に用いた培養細胞株

基礎的検討にヒト由来膵癌培養細胞株4株Panc-1, BxPC-3, MIAPaCa2, HPAFを用いた。Panc-1, BxPC-3, HPAFについては米国標準保存機関 (Rockville, Maryland, USA) より供給を受け、MIAPaCa2はJCRB細胞バンク (癌研究振興財団, 東京) より供給を受けた。BxPC-3はRPMI-1640培地 (日水製薬, 東京) に牛胎児血清10%を加えた培養液を用い、Panc-1, HPAF, MIAPaCa2についてはダルベッコ改変イーグル培地 (日水製薬) に牛胎児血清 (大日本製薬, 大阪) 10%を加えた培養液にて37℃, 5% CO₂ インキュベーター内で培養し、充分増殖した時点で細胞を回収した。

II. 膵液及び膵癌組織

1983年から1997年4月までの間に金沢大学がん研究所内科及びその関連施設を受診した膵癌患者26例, 粘液産生膵腫瘍 (腺腫) 患者4例, 慢性膵炎患者16例より内視鏡的に採取した純膵液を対象とした。膵液採取に際しては、全員にインフォームドコンセントが行われ、了解を得た。膵癌症例中12例は、手術例ないし剖検時の摘出標本の病理組織学的診断により確認され、他の14例は腹部超音波と腹部コンピューター断層撮影 (computed tomography, CT) の所見に加え、内視鏡的逆行性膵管胆管造影 (endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP) の所見により診断され、診断後いずれも1年以内に死亡したことが確認されている。これらの膵癌症例については腫瘍の大きさ, 占拠部位, 臨床病期について膵癌取扱規約 (膵癌研究会編)²⁷⁾に従い分類した。粘液産生膵腫瘍については、全例手術が施行され、摘出標本につき病理組織学的に良性腺腫と確認された。慢性膵炎については、日本膵臓病学会の診断基準に基づき診断され、いずれも確診に一致していた。

膵液採取は空腹時に十二指腸内視鏡JF10, JF1T10, JF230

(オリンパス社, 東京) のいずれかを用い、経乳頭的に膵管内にカニューレを挿入した。ついでセクレパン (エーザイ, 東京) 1U/kgを静注し、膵液分泌開始後5分毎4分画に分割して計20分間にわたり膵液を採取した^{9)~8)}。

手術ないし剖検が行われた膵癌症例の一部では、摘出標本のパラフィン包埋ブロックより組織標本を作製した。それにヘマトキシリン-エオジン染色を行い、検鏡下に癌組織を確認し、それを対照として無染色の連続切片から18G注射針にて癌組織のみを切り出して (マイクロダイセクション法), DNAを抽出し実験に供した。

III. DNA抽出

採取した膵液を遠心分離して得られた沈渣または膵癌組織, 培養細胞は、BowtellやJeanpièrreの方法を改変して処理し³⁴⁾³⁵⁾、フェノール/クロロホルム抽出, エタノール沈殿にてDNAを抽出し、260nm吸光度の測定により、定量した。

IV. PCR非ラジオアイソトープ—本鎖高次構造多型分析 (PCR nonradioisotopic-single strand conformation polymorphism analysis, nonRI-SSCP) 法

PCRのプライマーは、*p53* 遺伝子の突然変異が最も高頻度に認められるエクソン5.6.7.8の領域につき²²⁾³⁶⁾、各エクソンの上流, 下流のイントロン部分に設定し、エクソン5は210塩基対 (base pair, bp) エクソン6は144bp, エクソン7は144bp, エクソン8は165bpのPCR産物が得られるよう設計した (表1)。オリゴヌクレオチドは金沢大学遺伝子実験施設に委託し、DNA合成器サイクロン プラス (Milligan/Biosearch, Milford, USA) にて作製した。これらのプライマーを用い、抽出したDNAを鋳型として、PCRキット (Perkin-Elmer Cetus, Foster, USA) を用い、鋳型DNA約100 μ g, プライマー10pmol, AmpliTaq™ポリメラーゼ, 一部サンプルにはAmpliTaq Gold™ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus) 2.5単位にdNTP, PCR反応緩衝液, 超純水を加え全量10-50 μ lとして反応液を調製した。そしてサーマルサイクラーPJ1000 (Perkin-Elmer Cetus), またはTaKaRa™ MP MT3000 (宝酒造, 京都) を用いて、前加熱1分30秒, 変性95℃1分間, アニールリング52℃1分間, 伸長73℃1分間を1サイクルとして40サイクル行うPCR反応を行った。なおAmpliTaq Gold™ポリメラーゼ使用例には前加熱を9分間に延長し、45サイクルの反応とした。得られたPCR産物は2% Nusieve™ GTG アガロースゲル (FMC Bioproducts, Rockland, USA) を用い、Tris-氷酢酸-EDTA (Tris-HCl 40mM (pH8.0), 氷酢酸20mM, EDTA 2mM) 泳動用緩衝液にて電気泳動を行い、

Table 1. PCR primers for *p53* gene amplification

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Size amplified (bp)
Exon5	Sense	TTCTCTTCCTGCAGTACTC	210
	Antisense	CAGCTGCTCACCATCGCTAT	
Exon6	Sense	CACTGATTGCTCTTAGGTTCT	144
	Antisense	AGTTGCAAACCCAGACCTCAG	
Exon7	Sense	GTGTTATCTCCTAGGTTGGC	144
	Antisense	CAAGTGGCTCCTGACCTGGA	
Exon8	Sense	CCTATCCTGAGTAGTGTTAA	165
	Antisense	TCCTGCTTGCTTACCTCGCT	

エチジウムブロマイド(0.5 μ g/ml) 染色を行って単一のバンドが得られることにより増幅を確認した。このPCR産物5 μ lに0.05%ブロムフェノールブルー、0.05%キシレンシアノールを加えた95%ホルムアミド液5 μ lを加え、80 $^{\circ}$ C 10分間熱変性させた後、直ちに急冷し、5-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルパジェル™ NPU520L (アトー (株), 東京) または15%ポリアクリルアミドゲルパジェル™ NPU 15L (アトー) を用いて4 $^{\circ}$ C 150 V 10-12時間の条件で循環冷却恒温装置スーパースタットミニPID (アトー)、緩衝液循環式熱交換機テンコン (アトー) に接続した二連式ミニスラブゲルAE6410 (アトー) に

て50mM Tris-グリシン (Tris-HCl 50mM (pH8.3), グリシン 384mM) 電気泳動用緩衝液にて電気泳動を行った。その後ゲルに銀染色キット2D-銀染色試薬II (第一化学薬品, 東京) を用いて銀染色を行ってバンドを検出し、野性型と異なる泳動度を認めたバンドを変異バンドとした²⁹⁻³¹⁾。画像解析には画像解析装置デントグラフ (アトー) を用いた。

V. 直接シーケンス法による塩基配列の決定

1. 鋳型DNA

培養細胞株については、抽出したDNAを直接鋳型に用いた。膵液、膵癌組織から得られたDNAについては、nonRI-SSCP

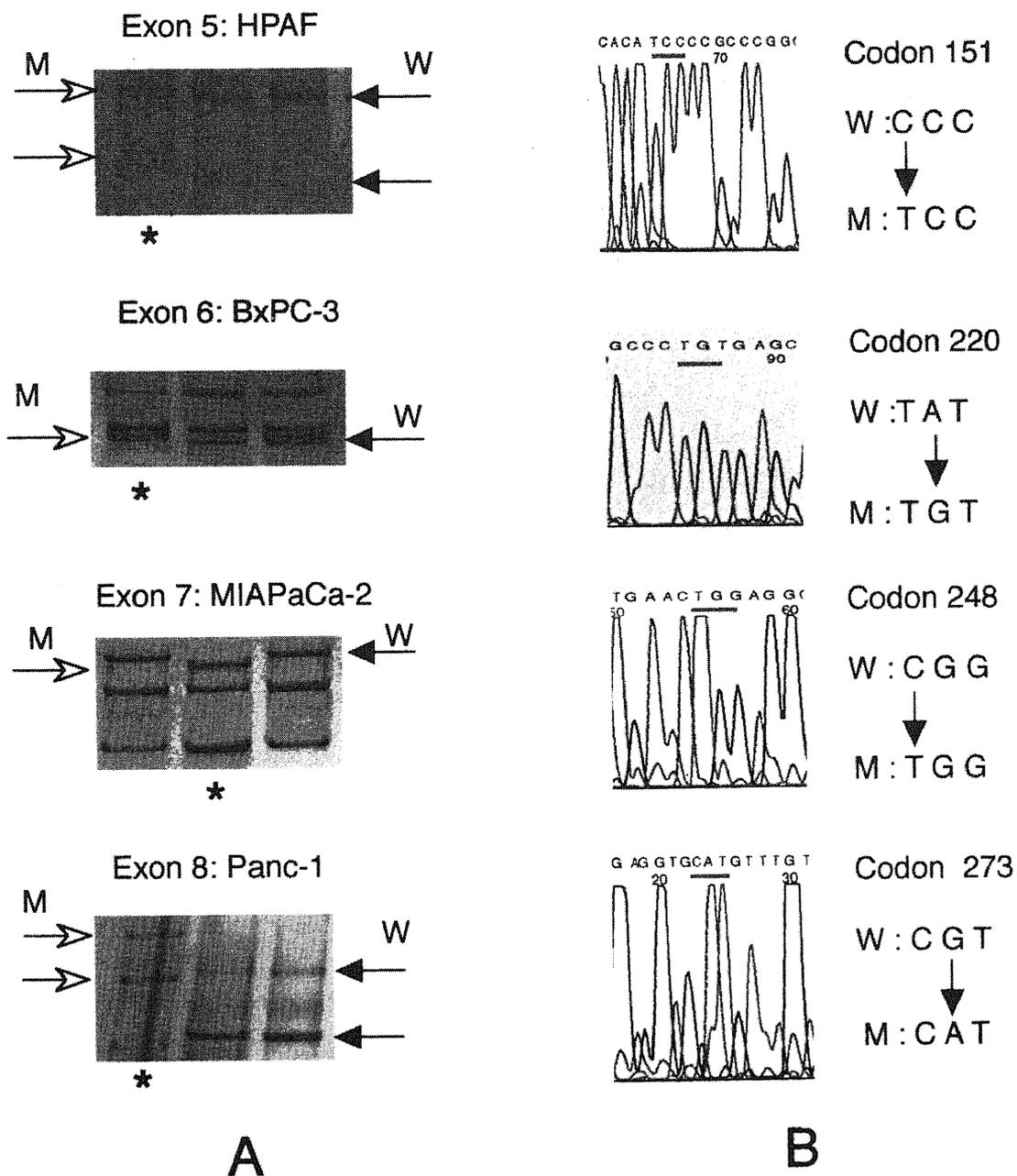


Fig. 1. NonRI-SSCP analysis of exon 5-8 of the p53 in pancreatic cancer cell line samples (A) and sequence analysis of the same samples (B). (A) DNA from cell line marked by star shows mutant bands (open arrows) which indicate different mobilities from wild type bands (closed arrows) on each exon. M, mutant; W, wild type. (B) Sequence analysis in pancreatic cancer cell line samples corresponding to Fig. 1.(A).

によって得られた変異バンドをカッターまたはフナゲルチップ (フナコシ, 東京) を用いて切り出し, 2.5%チオ硫酸ナトリウム及び1%フェリシアン化カリウムを混合した脱色液500 μ lにて5分間震盪し, 脱色した後, 超純水500 μ lにて5分間震盪洗浄を5回繰り返す, 最後に蒸留水30 μ lを加え, 80 $^{\circ}$ C 15分間加熱してアクリルアミドゲルよりPCR産物を抽出した. この抽出液または培養細胞株DNAを鋳型として同様のプライマーを用い, 前述と同様の条件で再度PCRを行い, DNAを増幅させ, PCR産物を得た. 得られたPCR産物は2% NusieveTM GTGアガロースゲル (FMC) にて30-45分間電気泳動を行い, PCR産物

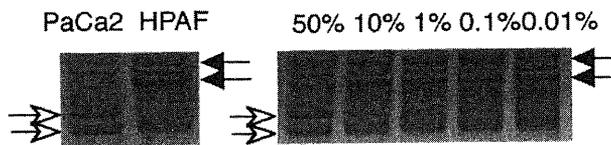


Fig. 2. Sensitivity of nonRI-SSCP analysis for *p53*. To investigate the sensitivity of nonRI-SSCP analysis for *p53*, DNA samples from MIAPaCa2 (mutant in exon 7) was mixed with the wild type DNA of HPAF (no mutant in exon 7) at constant ratios of the wild type DNA and used as the template for PCR. Mutant band (open arrows) was detectable at 0.1% of the mutant in the wild type (closed arrows).

と未反応のプライマーを分離し, PCR産物のバンドのみをカッターまたはフナゲルチップ (フナコシ) を用いて切り出した. 切り出したゲル片をDNA抽出膜TaKaRa Suprec-01 (宝酒造) を用いて, Tris-EDTA (10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA) 緩衝液を加え, 遠心操作を3回繰り返す, DNAの精製を行った. 得られた精製cDNAは260nm吸光度を測定してDNA量を算出し, 鋳型DNAとしてシーケンス反応に供した.

2. シークエンス反応

鋳型DNA約100ngに, ダイ・ターミネーターサイクルシーケンス反応キット (Perkin-Elmer Cetus) の反応液9.5 μ l, 鋳型DNAに一致したエクソンのPCRに用いたものと同じのプライマー3.5pmol, 超純水を適量加えて全量20 μ lとして反応液を調製した. これにTaKaRaTM MP PT3000 (宝酒造) を用いて, 変性95 $^{\circ}$ C 1分間, アニーリング60 $^{\circ}$ C 15秒間, 伸長73 $^{\circ}$ C 4分間を1サイクルとして25サイクルのPCR反応を行った. 得られた反応液を精製用スピナラム Centri sep (Perkin-Elmer Cetus) を用いて未反応の過剰な蛍光色素を除去して精製し, 減圧乾燥した. これに色素加緩衝液 (ホルムアミド83%, EDTA16%, キシレンシアノール0.5%, ブルーデキストラン0.5%) 3.5 μ lないし4.5 μ lを加えて溶解した. これをサンプルとし, 尿素40%を加えた6.75% Long RangerTMアクリルアミドゲル (東洋紡, 東京) を作成し, 自動シーケンス解析装置 ABI 373A (Perkin-Elmer Cetus) によって2400W, 14時間の条件で電気泳動を行

Table 2. *p53* gene and K-ras gene mutations in pancreatic juice from patients with pancreatic cancer

Case no.	Age (year)	Sex	Location	Size (TS)	Stage	<i>p53</i> mutation			<i>K-ras</i> mutation	
						SSCP (exon)	Codon	Sequence	PCR-RFLP	HPA pattern
1	58	M	H	2	III	-			+	Asp
2	70	F	H	2	III	+	(5)		+	Asp
3	70	M	H	2	IVb	+	(7)		-	-
4	74	M	B	4	IVb	+	(7)		+	Asp
5	52	M	B	3	III	-			+	Asp
6	69	M	T	3	IVb	-			-	-
7	79	M	B	3	IVb	+	(8)		+	Asp
8	78	M	H	4	III	-			+	-
9	48	F	B	4	IVb	-			+	Asp
10	72	M	B	3	IVb	+	(8)		+	Cys, Asp
11	51	M	B	4	IVb	+	(8)		+	Arg
12	47	M	H	3	IVb	+	(6)		+	Asp
13	44	F	B	1	I	-			-	-
14	45	M	T	2	IVb	-			+	-
15	51	M	H	2	II	+	(6)		+	Asp
16	70	M	H	3	IVa	+	(5)	156 CGC→CAC	-	-
17	65	F	B	4	IVa	-			+	-
18	61	M	H	2	III	-			+	Asp
19	60	M	H	4	IVb	-			+	Asp
20	82	M	T	3	IVb	-			+	Asp
21	83	M	H	3	IVb	+	(7)	248 CGG→CCG	+	Asp
22	71	F	H	2	IVb	-			+	-
23	74	F	T	3	IVb	-			+	Asp
24	51	M	H	3	IVb	-			+	Asp
25	70	F	H	2	IVa	+	(5)	144 CAG→TAG	+	Arg
26	74	M	B	2	IVb	-			nd	-

SSCP, single strand conformation polymorphism; RFLP, restriction fragment length polymorphism; HPA, hybridization protection assay; M, male; F, female; H, head; B, body; T, tail; TS1 \leq 2.0cm, 2.0cm<TS2 \leq 4.0cm, 4.0cm<TS3 \leq 6.0cm, 6.0cm<TS4; +, mutation; -, no mutation; nd, not done; Arg, arginine; Asp, aspartic acid; Cys, cysteine.

うシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。

VI. K-ras 遺伝子コドン 12 変異の検討

1. PCR-RFLP 法

鋳型DNAはnonRI-SSCPに用いたものと同様のものを用いた。PCRプライマーは膵癌においてK-ras 遺伝子変異の大多数を占めるコドン12の上流、及び下流のイントロンに、制限酵素BstNIの認識するCCTGGを含むような人工的な不一致を含んで設定し⁴⁹⁾、これにより135bpのPCR産物が得られるよう設計した(センス: 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3', アンチセンス: 5'-TAATATGTCGACTAAAACAAGATTTACCTC-3'。下線はK-ras塩基配列に対する不一致を示す)。PCR反応は前述の方法に準じ変性95℃1分, アニーリング52℃1分, 伸長73℃1分の条件で40サイクルにて行った。得られたPCR産物をBstNIにて60℃12時間処理した。そしてこれらのサンプルを3% Nusieve™ GTG アガロースゲル(FMC)にて1×Tris-ホウ酸-EDTA(Tris 90mM, ホウ酸90mM, EDTA 2.5mM)電気泳動用緩衝液にて50V, 4時間電気泳動を行った。変異の無い野生型DNAはBstNI処理により106bpと29bpのフラグメントに分かれるが、変異を有するDNAは消化されず135bpのまま残存す

るため、この電気泳動で106bpに一致するバンドを野生型、135bpに一致するバンドを変異陽性と判定した⁴⁹⁾。

2. ハイブリダイゼーションプロテクションアッセイ (hybridization protection assay, HPA) 法

この方法の原理は、アクリジニウムエステル (acridinium-ester, AE) によって標識したDNAプローブを用いて、プローブに一致した塩基配列を有する場合にはAEは塩基間に挿入 (intercalation) されるのに対し、不一致がある場合には挿入されない。この状態で加水分解反応を行うと、塩基が一致している場合は挿入されることによりAEが加水分解から保護されるが、ミスマッチを有する場合は、AEが加水分解により失活する。そして加水分解から保護されたAEを過酸化水素下で化学発光させ、ルミノメーターで検出するというものである⁴⁹⁾。

方法は、K-ras 遺伝子コドン12を前述の方法に準じPCRにより増幅させ、100℃10分間熱変性した後、PCR産物10μlにAE標識を行った野生型 (GGT: グリシン) 及びコドン12の変異型6種類 (AGT: セリン, CGT: アルギニン, TGT: システイン, GAT: アスパラギン, GCT: アラニン, GTT: バリン) に一致した計7種類のDNAプローブ50μlを各ター本ずつのチューブ

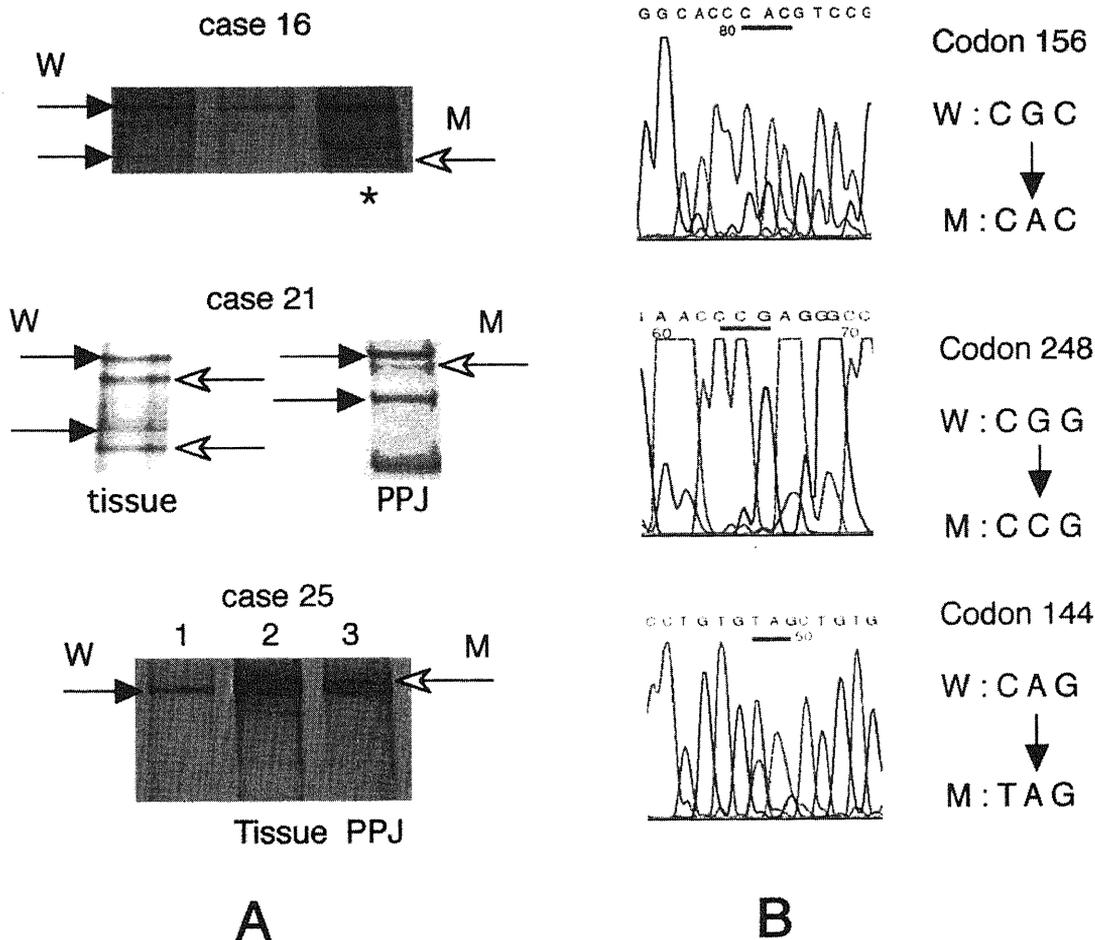


Fig. 3. NonRI-SSCP analysis of p53 in PPJ from patients with pancreatic cancer (A) and sequence analysis of the same samples (B). (A) Mutant bands were found as extra bands (open arrows) above or beneath bands of wild type (closed arrows). Star mark indicates DNA from the PPJ of case 16. In case 21 and 25 (column 2, 3), mutant bands were found at the same mobility position in DNA samples from both PPJ and cancer tissue. (B) Sequence analysis of the p53 of PPJ from patients with pancreatic cancer corresponding to Fig. 3. (A). In case 21 and 25, same sequence changes were observed in PPJ and cancer tissue samples. M, mutant; W, wild type.

にて添加し、65℃、15分間ハイブリダイゼーションを行った。そして各チューブに加水分解用緩衝液(トリトンX-100 10-50ml/l, ホウ酸ナトリウム 0.15-0.20mol/l) 250 μ lを加え、65℃、5分間加水分解反応を行った後、急冷し、2種類の検出反応液(I: 0.1%過酸化水素, 1mmol/l硝酸, II: 1mol/l水酸化ナトリウム)を順次加えて化学発光をルミノメーターLeader 1 (Gen-Probe, Inc, San Diego, USA)にて測定した¹⁹⁾。

成 績

I. 培養細胞株における *p53* 遺伝子の検討

基礎検討として、4種のヒト由来膵癌細胞株を用いて、nonRI-SSCP法にて *p53* 遺伝子変異について検討した。図1. (A) に示すようにHPAFはエクソン5, BxPC-3はエクソン6, MIAPaCa2はエクソン7, Panc-1はエクソン8に野生型 *p53* 遺伝子と移動度の異なるバンドの出現を認めた。これらのバンドよりDNAを抽出、精製し、直接シーケンス法により、分析するとHPAFはコドン151にCCC→TCC (プロリン→セリン), BxPC-3はコドン220にTAT→TGT (チロシン→システイン), MIAPaCa2はコドン248にCGG→TGG (アルギニン→トリプシン), Panc-1はコドン273にCGT→CAT (ヒスチジン→アルギニン)へと変化する点突然変異を確認した(図1. (B))⁴⁰⁾。これらにより変異バンドが点突然変異を反映することが確認された。

更に、泳動度の異なる2種類の培養細胞株即ちエクソン7において変異を有するMIAPaCa2とエクソン7で変異を有さない

HPAFを用いて、本法の検出感度を以下のごとく検討した。HPAFより抽出したDNAに対し、MIAPaCa2より同様に抽出したDNAがそれぞれ50%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%の割合となり、かつ両者のDNAを合わせた量が一定となるように2種のDNAを混合した。これを鋳型DNAとしてPCR反応を行い、nonRI-SSCP法にて分析すると図2に示すように上方のHPAF由来のバンドに対し下方のMIAPaCa2由来の変異バンドはDNA濃度0.1%まで確認された。

II. 膵液における *p53* 遺伝子の検討

膵癌患者26例より内視鏡下経乳頭的に採取した膵液においてnonRI-SSCP法で *p53* 遺伝子の変異について検索したところ、表2の如くエクソン5で3例、エクソン6で2例、エクソン7で3例、エクソン8で3例に変異バンドが認められた。結局、膵癌全体では26例中11例(42.3%)が変異陽性であった。一方、粘液産生膵腫瘍(腺腫)4例及び慢性膵炎患者16例から採取した膵液においては、検索したいずれのエクソンにおいても *p53* 遺伝子の変異バンドは検出されなかった。

上記の異常バンドを検出した症例の内3例につき直接シーケンス法にて塩基配列を検討し得た(図3)。症例16はエクソン5のコドン156にCGC→CAC (アルギニン→ヒスチジン)の点突然変異を認めた。症例25はエクソン5のコドン144にCAG→TAGへの変化を認めた。これはグルタミンから停止コドンへ変化するナンセンス変異であった。症例21はエクソン7のコドン248がCGG→CCG (アルギニン→プロリン)への変異を認めた。上記3例中2例はG:C→A:Tへの変化であり、また同様に2例はシトシン、グアニンがこの順に配列するCpGサイトの変異であった。症例18, 21, 22, 23, 25においては、マイクロダイセクション法にて組織標本から抽出したDNAについて *p53* 遺伝子の解析を行ったところ、何れも膵液標本のものとは一致した。膵液中変異陽性であった症例21, 25についてはnonRI-SSCPにて膵液と同様の変異バンドを認め、シーケンスの結果も一致していた。一方膵液中変異陰性であった症例18, 22, 23では変異バンドは認められず、念のために施行したシーケンス分析でも、野生型の *p53* 遺伝子塩基配列を示した。

次いで、膵液中 *p53* 遺伝子変異の有無と臨床病理学的事項との関連について検討した(表3)。腫瘍径との関係についてみると、2cm以下の小膵癌であるTS₁は1例のみでしか検討し得なかったが、*p53* 遺伝子変異は陰性であった。2cm以上の膵癌では *p53* 遺伝子変異の有無と腫瘍径の間には一定の傾向は認められなかった。臨床病期との関係でも進行度Iは1例しかなかったが、*p53* 遺伝子変異の有無との間には特定の関連性は見られなかった。更に、腫瘍の占拠部位との関係を見ても、一定の傾向は明らかではなかった。

Table 3. Relationship between *p53* gene mutation in pancreatic juice and the size, clinical stage and location of pancreatic cancers

Characteristic	No. of patients with <i>p53</i> mutation		
	+	-	
Size	TS ₁	0	1
	TS ₂	4	5
	TS ₃	5	5
	TS ₄	2	4
Stage	I	0	1
	II	1	0
	III	1	4
	IV	9	10
Location	H	5	7
	B	4	5
	T	1	4

+, mutation; -, no mutation.

Table 4. Comparison between *p53* gene and *K-ras* gene mutations in the patients with pancreatic cancer

Methods for <i>K-ras</i> analysis	<i>K-ras</i> mutation	No. of patients with <i>K-ras</i> mutation	No. of patients with <i>p53</i> mutation	
			+	-
PCR-RFLP	+	21	9	12
	-	4	2	2
HPA	+	17	9	8
	-	9	2	7

+, mutation; -, no mutation.

Ⅲ. 膵液中 K-ras 遺伝子コドン 12 の変異に関する検討.

p53 遺伝子を検討した膵癌患者の膵液の同一の検体について、p53 遺伝子と共に K-ras 遺伝子コドン 12 の変異についても検討した。PCR-RFLP 法では、症例 26 では検討し得なかったが、表 2 に示す如く膵癌症例 25 例中 21 例 (84.0%) に変異バンドを認めた。また、HPA 法では測定結果は相対光度単位 (relative light unit, RLU) として表示され、既報¹¹⁾の如く 10,000RLU をカットオフ値に設定すると、膵癌 26 例中 17 例 (65.3%) が変異陽性と判定された。変異パターンではアスパラギンが 15 例と圧倒的に多く、アルギニンが 2 例、システインが 1 例に認められた。この内、症例 10 は表 2 に示す如く 2 種の変異が同時に認められた。

Ⅳ. 膵液中 p53 遺伝子と K-ras 遺伝子コドン 12 変異の有無に関する比較検討

膵癌患者膵液の、同一検体で p53 遺伝子変異と K-ras 遺伝子変異の有無を比較した結果を表 4 に示した。K-ras 遺伝子の分析を PCR-RFLP で行った場合には、p53、K-ras 両者遺伝子共に変異陽性を示したのは 25 例中 9 例であり、両者共陰性のものは 2 例であった。また、p53 遺伝子のみ陽性が 2 例に見られ、K-ras 遺伝子のみ陽性は 12 例であった。そして両者いずれかが陽性であったものは全体の 25 例中 23 例で、併用による陽性率は 92.0% であった。

HPA 法により K-ras 遺伝子进行分析した場合には、p53 遺伝子、K-ras 遺伝子両者共に変異陽性を示したのは 26 例中 9 例であり、両者共陰性のものは 7 例であった。また、p53 遺伝子のみが陽性を示したものが 2 例に見られ、K-ras 遺伝子のみ陽性は 8 例であった。そして両者いずれかが陽性であったものは全体の 26 例中 19 例で併用による陽性率は 73.1% であった。

考 察

膵癌の早期診断には多くの努力が傾注されているにも拘わらず有効な診断体系が確立されていない¹⁾。その最も大きな理由の一つとして臨床的に生検が困難で、確実な質的診断が得られ難い点が挙げられる。この様な点を克服しようとして、これまで教室では膵液中の各種腫瘍マーカーの測定や、脱落して膵液中に混入する癌細胞から DNA を抽出し、K-ras 遺伝子コドン 12 の変異の有無を検討することなどで膵癌診断の向上に寄与する検査法を開発をしようとしてきた⁶⁻¹⁰⁾。本研究はその一環として、現在各種癌の発癌過程において最も普遍的で重要な役割を果たすとされている癌抑制遺伝子 p53 の変異を内視鏡下経乳頭的に採取した膵液で検討することが、膵癌の診断に如何に有用であるかを明らかにしようとしたものである。

p53 遺伝子のヒト癌における変異率についてみると、膵癌における K-ras 遺伝子を別として、他の癌抑制遺伝子、癌遺伝子に比べ際立って高い変異頻度を示し、且つ広範囲な癌で見られる。1994 年 Greenblatt ら²⁰⁾のまとめた文献的集計によると、消化器癌組織では食道癌 279 例中 45%、胃癌 314 例中 41%、大腸癌 960 例中 50%、肝細胞癌 716 例中 29%、膵癌 170 例中 44% という変異率が報告されている。今回の著者らの膵癌の膵液中の検討では 26 例中 11 例、42.3% という p53 遺伝子の変異検出率が得られた。これは、上記の膵癌組織のそれに匹敵する成績であり、膵液中に含まれる癌細胞の少ないことを考慮すれば、非常に良好な検出率とも云えよう。しかし、1994 年以後の報告では、膵癌で 50% 以上に p53 遺伝子変異率を認めている場合

が多く^{5),20),21)}、最近の Rozenblum ら⁹⁾の報告では、膵癌の 76% (31/41) と非常に高い p53 遺伝子の変異率が報告されている。これは、マイクロダイセクション法により組織より癌細胞を慎重に選択し、非癌細胞の混入を極力少なくした材料から DNA を抽出する方法の普及、及び分析法の感度や精度の向上による面が大きいと思われる。膵液の検出においてもこのような方向で種々の工夫を行えば、検出率をもっと向上することも期待できよう。

膵癌の K-ras 遺伝子変異が、エクソン 1 コドン 12 に殆ど集中して起こるのに対し、p53 遺伝子にはこのようなホットスポットが存在しない。しかし、ヒトからカエルまで高度に保存されているドメイン II-V をコードするエクソン 5-8 (コドン 128-306) に変異が集中すると言われており^{20),22)}、従来の多くの p53 遺伝子変異を検討した研究は専らエクソン 5-8 に集中しているため、そのような文献を多く含む集計では約 98% がこの領域に変異が見られる²³⁾。しかし、p53 の全領域について検討した論文に限って集計すると、p53 遺伝子変異陽性癌 560 例中エクソン 5-8 に含まれる変異は全体の 87% で、残りはエクソン 4 には 8%、エクソン 10 に 4% の変異が見られている²³⁾。従って、膵液中 p53 遺伝子の変異の検討においても、エクソン 5-8 に変異の見られない場合には、エクソン 4 と 10 についても検討すれば検出率は更に向上するものと思われる。一方、体液中に p53 遺伝子変異を検出し、癌の DNA 診断に応用しようとする試みには、肺癌における喀痰の検討にて 15 例中 2 例に変異陽性を検出し⁴⁾、また、膀胱癌における尿をサンプルとした検討にて 18 例中 11 例に変異陽性を検出した報告⁴⁰⁾があるが、今回の著者の検討はこれらに充分匹敵するものである。膵液中より p53 遺伝子を検出し、膵癌の診断に応用しようとした報告は内外を通じて未だ無く、今回の著者の検討が初めてである。

膵癌においては、胃癌、大腸癌の場合と異なり、生検が殆ど不可能で、腫瘍が小さくなればなる程、画像では良悪性の鑑別が困難となり、早期診断には大きな限界がある。このような問題を解決しようとして、膵液中の細胞診やブラッシング細胞診が以前から行われてきたが、膵液中の蛋白分解酵素の影響などで細胞が変性しやすいためか、細胞診の中でも判定が最も困難で、報告者により陽性率の差が大きく、しかも頭部領域に比較し、体尾部癌での陽性率が低いことなどから広く普及するに至っていない⁴¹⁻⁴³⁾。Ishimaru ら⁴⁰⁾は、ERCP にて主膵管の狭窄を認めた場合、その部位のブラッシングを行い、得られた細胞に p53 蛋白免疫染色を行い、膵癌 20 例中 18 例 (90%) に染色陽性を認め、一方慢性膵炎 8 例には 1 例も染色陽性を認めなかったと報告している。この方法は従来の細胞診の判定が鏡検者の主観的判断に由来しているのに対し、免疫染色という客観的な方法を導入した点は利点であるが、細胞核が少しでも染色されれば陽性と判定することに大きな問題がある。p53 蛋白染色法には、抗体が野生型蛋白と変異蛋白の構造を区別できない、非癌細胞にも散発的に染色されるものがあり、染色パターンから陽性、陰性の判定に客観性が保ちにくい、ナンセンス変異や欠失により蛋白が産生されない場合は検出できない⁴⁰⁾、などの欠点がある。実際に p53 蛋白染色陽性と判定されても、塩基配列を検討すると野生型である例も認められる。これらのことより、最近では当該細胞の 20% 以上に細胞核が染色された時に、p53 蛋白過剰発現と表現され、染色陽性と判定されるべきだとする意見が多い。また、ブラッシング法は、該当部位にブラシ

を挿入できる場合には、細胞が多量に得られる利点があるが、膵管開口部から離れた部位になるほど該当部位までブラシの挿入が難しくなり、成功率は低くなる。採取部位は殆ど主膵管に限られ、分枝由来の小膵癌などの膵野型膵癌のブラッシングは不可能、などの欠点もある。この点、著者の膵液中の脱落細胞からDNAを抽出する方法では、理論的には膵管のいずれの部位から脱落した癌細胞でも検討が可能である。また、*p53* 遺伝子変異を直接検出するため、免疫染色で問題となる偽陽性はない。しかし、得られた細胞の内、正常細胞が圧倒的多数で癌細胞が極少数であった場合、変異遺伝子が正常遺伝子に希釈され、遺伝子異常が検出感度以下となる可能性はある。いずれにしても、ブラッシング細胞診が容易に可能な場合には、その利点を大いに活用すべきであろう。また、*p53* 蛋白染色の有用な点も利用することは大切である。すなわち、膵液の細胞沈渣のスメアにまず *p53* 蛋白の免疫染色を行い、陽性となった細胞のみをマイクロダイセクションによって分離し、また、染色されない場合には沈渣の全体からDNAを抽出して *p53* 遺伝子の変異に関する分析をすれば、その検出率はより向上するものと思われる。

p53 遺伝子変異が発癌のどの時期に発現するかに関しては、臓器により様々な相違が報告されている。大腸癌に関しては Vogelstein ら⁵²⁾ は腺腫-癌シークエンスの過程で *APC*, *K-ras*, *p53*, *DCC* など複数の遺伝子異常が集積し、発癌過程の進展することを提唱した。このモデルにおいて、*p53* 遺伝子は腺腫から明らかな癌へと進行する段階で変異が生ずるとされている。一方、Mori ら⁵³⁾ は、腺腫を経ない *de novo* の大腸癌においては、正常粘膜から癌が発生する際の早期のイベントとして *p53* 遺伝子変異が認められると述べている。また、扁平上皮癌の内、肺癌の中には様々な段階の組織変化、すなわち軽度、中等度、高度ディスプラジア、上皮内癌、進行癌が同時に見られることがあり、これらを検討すると、組織学的に異型度を有する部位は既に *p53* 遺伝子変異が見られ⁵⁴⁾、更に一部の口腔癌や食道癌においては担癌患者の非癌部粘膜に既に *p53* 遺伝子変異を認めているなど^{55,56)}、扁平上皮癌においては発癌過程の極めて早期に *p53* 遺伝子変異の生じることが推定されている。膵癌の発癌ではどの段階で *p53* 遺伝子変異が生ずるのかについて未だ十分な研究が集積されていないが、Scarpa ら²⁹⁾ や Berrozpe ら²⁷⁾ は膵癌の原発巣より転移巣で *p53* 遺伝子変異の陽性率が高いと報告している。また、Nakamori ら⁵⁷⁾ は臨床病期IVでより多くの *p53* 遺伝子変異を認め、さらに分化度もより低分化でより変異が多いことを挙げ、*p53* 遺伝子変異は、発癌の比較的進行した時期に発現し易いのではないかと述べている。しかし、大腸癌などでは腺腫内に発生した極早期の癌を含め種々の段階のサンプルについて検討する機会が多いのに対し、通常の膵癌ではこのような早期病変を入手する機会に恵まれず、膵癌の初期病変や、いわゆる前癌病変における *p53* 遺伝子変異の検索が蓄積されていない。但し、膵癌の特殊型であるが、その腺腫-癌シークエンスのモデルではないとも言われている粘液産生膵腫瘍についてみると、今回の著者の膵液での検討では膵管内乳頭腺腫であった4例には *p53* 遺伝子変異は認められなかった。また、Hoshi ら⁵⁸⁾ は同腫瘍につき良性群については *p53* 遺伝子変異を認めなかったと報告しているが、Kaino ら⁵⁹⁾ は、病理学的に腺腫と確認された2例に *p53* 遺伝子変異が発現していると報告している。また、Sessa ら⁶⁰⁾ は粘液産生膵腫瘍26例を組織学的悪

制度別に *p53* 蛋白染色を検討したところ、膵管内乳頭腺腫4例には陽性例はなかったが、境界病変とされた膵管内乳頭腫瘍で22% (2/9)、膵管内乳頭癌で29% (2/7)、粘液浸潤を伴う乳頭癌で40% (2/5)、腺管内浸潤を伴う乳頭癌で100% (1/1) に *p53* 蛋白過剰発現を認めている。以上のような報告からみると、頻度はそう高くないが、境界病変から既に *p53* 遺伝子の変異が生じ、進展するに従い漸増するのではないとも思われる。また、先述したように、他の臓器癌では発癌のかなり早期に *p53* 遺伝子変異の起こることからすれば、膵癌で前癌病変も含めた早い時期に *p53* 遺伝子変異の生ずる場合もかなりあるように思われる。しかし、今回の著者の検討では、このような早期の癌について検討する機会がなかったため、この点については今後、種々の病変において膵液採取の症例を増やして明らかにしていきたい。慢性膵炎の、*p53* 遺伝子の発現について検討した報告は少ないが、組織サンプルにおいて検索した15例では全例が陰性であり⁶¹⁾、また、慢性膵炎患者の膵管ブラッシングにより得られた細胞における *p53* 蛋白免疫染色においても、全例陰性である⁵⁰⁾。今回の著者の慢性膵炎16例の膵液における検討でも *p53* 遺伝子は全例陰性であった。以上のように、粘液産生膵腫瘍以外の非癌性膵病変で *p53* 遺伝子変異の発現することはなく、膵液中 *p53* 遺伝子変異の検出は癌特異性は極めて高いものと考えられる。

今回 *p53* 遺伝子変異の検出法に用いた nonRI-SSCP 法は、検出サンプルの塩基の長さとして、300bp 程度までが可能であるが、120bp 程度の長さが最適とされている⁶²⁾。著者の実験ではエクソン5が210bpと若干長めのcDNAを用いているが、15%と濃度の濃いゲルを用い、10時間以上の長時間の泳動を行うことによって明瞭に泳動度の差を検出し得た。また、SSCP法は泳動時のゲル温度によって一本鎖DNAの泳動度に差が生じ、変異バンドの分離能が変化するため³⁹⁾、用いるサンプルやゲルに応じた至適温度を設定する必要がある。今回の実験では、種々の温度にて電気泳動を試み、至適温度は4℃であるという結果を得た。用いた2連式ミニスラブ電気泳動槽は泳動中、緩衝液を温度可変式熱交換機を介し、泳動槽の中を環流させることにより泳動槽内をこの温度に保つことが可能であった。従来SSCPの検出はオートラジオグラフィが用いられてきたが、ラジオアイソトープ (radioisotope, RI) を用いなければならず、専用の実験室が必要であること、現像に時間がかかることなどの欠点があった。本研究では、RIの代わりに銀染色を用いた nonRI-SSCP法にて試みた。銀染色は、RIを用いずに行うことが出来るため、通常の実験室で検出が可能であり、その検出感度においてRIに遜色が無い、約2時間ほどで染色が終了する、廃液処理も容易なことなど多くの利点がある。Suzuki ら³⁹⁾ はオートラジオグラフィを用いたSSCPの検出感度は変異型DNAの割合が3-5%としているが、今回著者の用いた条件下での異常バンドの検出感度は、培養細胞株を用いた検討であるが、図2に示した如く正常DNAに対し変異型DNAの割合が0.1%に含まれるまで検出可能であった。これは、理論的には正常細胞500個に癌細胞1個が含まれる程度でも検出可能であることを意味しており、極めて鋭敏な検出能といえる。

シークエンス反応については、鋳型DNAにPCR産物を用いたが、この反応を正確に行なうためにはPCR産物から未反応のプライマーを取り除く精製を如何に行うかが最も重要な点である。著者らのアガロースゲルを用いてPCR産物を精製する

方法はやや煩雑であり、ゲルからのDNAの回収率も約40%とやや低い、電気泳動にて未反応プライマーはほぼ完全に除去することが出来るため、非常に純度の高い精製が可能であった。そして、このような方法で精製を行ったために、シーケンス反応の際にも一連のPCR反応で用いてきたものと同一のプライマーを用いることが可能であった。一般にシーケンス反応の際には、プライマーの干渉を防ぐために、最初のPCR反応のプライマーの位置よりも10bpほど内側に新しいプライマーを設定する必要がある。しかし、今回行った実験系におけるプライマーは各エクソンのイントロン部分に設定し、かつSSCPの解析が可能となるよう、PCR産物が200bp程度になるように設計しているが、これより内側にプライマーを設定するとエクソン部分の一部プライマーがかかってしまい、この部分のシーケンスの解析が出来なくなる可能性がある。著者は、上述したような精製を充分に行うことによりプライマーの除去が十分可能であったためにプライマーの変更を行うことなしに良好な結果を得ることであった。ただ、今回の検討では、使用した膵液サンプルの約半数は過去に採取され、少量ずつ分注して冷蔵庫に保存してあったが、各種腫瘍マーカーや*K-ras*遺伝子などの分析に使用され、サンプルの余裕がなかったり、ゲルから回収し、精製中に枯渇したものもあったため、直接シーケンス法により塩基配列の変異を確認し得たのは3例のみに止まった。

膵癌の癌関連遺伝子を分析して膵癌の診断に応用しようとするアプローチとして、既に*K-ras*遺伝子について広く行われているので、これとの関連で膵液中*p53*遺伝子を分析する意義を論じることが重要である。一般に、単一の遺伝子異常がある癌で高頻度に起こることは希であるが、膵癌では*K-ras*遺伝子コドン12の点突然変異が75-100%と例外的に高頻度に発現する²⁰⁻²⁵。当教室ではこれに注目し、当初アレレル特異的オリゴヌクレオチド (allele specific oligonucleotide, ASO) プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーション法にて膵液中*K-ras*遺伝子コドン12の変異を分析したところ、膵癌で55% (11/20) に陽性で、慢性膵炎18例では何れも陰性であった⁹。その後、内外で多くの報告があり¹³⁻¹⁷、中には検出感度の高い方法で分析すると、100%に検出し得たという成績もみられ^{13,16}、当教室でもPCR-RFLP法で81% (21/26) という*K-ras*遺伝子変異の陽性率を得ている¹⁰。しかし、検出法の感度を上げると、慢性膵炎でも約20-30%に*K-ras*遺伝子コドン12の変異が陽性になることが判明し、*K-ras*遺伝子変異の癌特異性が大きな問題になっている。膵管内乳頭腫瘍やその腺腫内癌でも*K-ras*遺伝子変異が高率にみられるのに加え、Yanagisawaら^{18,63}は慢性膵炎組織の一部に見られる粘液細胞過形成上皮に*K-ras*遺伝子コドン12の変異が高頻度に見られることから、粘液細胞過形成-腺腫-癌腫のシーケンスの概念を分子的側面より支持するものと述べている。これらのことより、良性疾患の膵液に見られる*K-ras*遺伝子の変異はこのような過形成上皮の混入したことを反映すると考えられるようになってきている。しかし、慢性膵炎に伴う過形成は膵管上皮の一部にしか存在しないため、膵液中にそのような上皮に由来した*K-ras*遺伝子の変異があっても、正常上皮に由来した多くの野生型*K-ras*遺伝子に希釈され、検出されにくく、検出感度の高い分析法を用いた時のみに陽性になるのであろう。これに対して、膵癌では癌細胞の絶対量が多いため、*K-ras*遺伝子変異を有する膵癌細胞の膵液への混入する割合が高くなり、検出され易いと考えられ

る。教室では、*K-ras*遺伝子コドン12に対応したプローブにアクリジニウムエステルを標識し、膵癌より抽出したDNAのPCR産物を反応させ、生じる化学発光より*K-ras*遺伝子変異の有無を定量的に測定できるHPA法を開発している¹⁰。この方法で測定したHPA値は、膵癌では著明な高値を示す場合が多いのに対し、慢性膵炎ではPCR-RFLP法で陽性を示した例でも殆どが低値を示すという成績が得られている。つまり、検出感度の高い定性的な方法では慢性膵炎でも*K-ras*遺伝子変異はかなり検出されるが、HPA法のように定量的に測定し、従来の多くの腫瘍マーカーのように適切なカットオフ値を設定することにより、癌特異性の高い指標として用いることが出来ると考えられている。

今回の著者の膵癌における*K-ras*遺伝子コドン12変異の検出率は、PCR-RFLP法が84.0%であるのに対し、HPA法では65.3%であった。前述のように検出感度の高いPCR-RFLP法では陽性率は高いが、偽陽性は少なからず見られるので、PCR-RFLP法の84.0%は癌のスクリーニング的な意味を有することになろう。一方、HPA法では陽性率は65%と劣るが、癌特異性には優れており、癌の質的診断的な有用性は高いと考えられる。また前述したように膵癌における*p53*遺伝子変異は*K-ras*遺伝子変異に比して、陽性率は低いが、慢性膵炎では認められず、極めて癌特異性が高いと考えられる。更に、*p53*遺伝子と*K-ras*遺伝子コドン12の変異の有無を対比すると、PCR-RFLP法、HPA法何れの場合にも*p53*遺伝子のみ陽性が2例ずつに認められ、両者を併用すると、それぞれ84.0%→92.0%、69.2%→73.1%に陽性率が上昇した。この事はスクリーニング法、特異的診断法何れの目的に使用するにしても、両者を併用することは診断率の向上をもたらすことを示すものであり、膵液中*p53*遺伝子変異を分析することの意義の重要性が窺えるといえよう。

結 論

膵癌患者26例、粘液産生膵腫瘍4例、慢性膵炎16例より内視鏡下経乳頭的に純膵液を採取した沈渣よりDNAを抽出し、*p53*癌抑制遺伝子の変異の検出を試みた。さらに*K-ras*癌遺伝子変異の有無とも比較し、以下の知見を得た。

1. nonRI-SSCP法の検出感度は培養細胞株を用いた検討で、正常DNAに対して変異型DNAの割合が0.1%まで変異バンドの検出が可能であった。

2. nonRI-SSCP法による膵液中*p53*遺伝子変異は膵癌患者の42.3% (26例中11例) に認められた。3例で塩基配列が決定され、2例はミスセンス変異、1例は停止コドンへの変異であった。一方、粘液産生膵腫瘍 (腺腫) 4例、慢性膵炎16例のいずれにも*p53*遺伝子変異は認められなかった。

3. 膵癌患者の*p53*遺伝子変異の有無と臨床病理学的事項との関連を検討したが、特定の関連性は認められなかった。

4. *K-ras*遺伝子変異分析では、膵癌患者においてPCR-RFLP法では84.0% (25例中21例)、HPA法では65.3% (26例中17例) に*K-ras*遺伝子変異が検出された。

5. *p53*遺伝子と*K-ras*遺伝子変異の有無を組み合わせると、*K-ras*遺伝子分析をRFLP法で行った場合には膵癌25例中両者陽性9例、*K-ras*遺伝子か*p53*遺伝子のみ陽性はそれぞれ12例と2例であり両者を組み合わせると、92.0% (25例中23例) が陽性となった。HPA法により*K-ras*遺伝子分析を行った

場合には、両者陽性9例、*K-ras* 遺伝子か *p53* 遺伝子のみ陽性はそれぞれ8例と2例であり、両者を併用すると、73.1% (26例中19例) が陽性となった。

以上より、膵癌における膵液中 *p53* 遺伝子変異の癌特異性は非常に高く、*K-ras* 遺伝子変異陰性例にも *p53* 遺伝子変異陽性例が見られ、*K-ras* 遺伝子変異と組み合わせることにより膵癌の遺伝子診断の向上することが期待される。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導と御校閲を賜りました恩師澤武紀雄教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に終始御助言と御支援を賜りました金沢大学がん研究所内科渡辺弘之先生をはじめ全ての教室員の方々、および研究支援推進員黒瀬麻里殿に深く御礼申し上げます。本稿の内容の一部は第54回日本癌学会総会 (1995年、京都) および第94回日本内科学会総会 (1997年、大阪) にて発表した。

文 献

- 1) Poston GJ, Gillespie J, Guillou PJ. Biology of pancreatic cancer. *Gut* 32: 800-812, 1991
- 2) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Peeruchou M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-*K-ras* genes. *Cell* 53: 549-554, 1988
- 3) Smit VT H B M, Boot AJM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. *K-ras* codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 16: 7773-7782, 1989
- 4) Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of *ras* gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 100: 233-238, 1991
- 5) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathway in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57: 1731-1734, 1997
- 6) Takemori Y, Sawabu N, Ohta H, Satomura Y, Watanabe H, Yamakawa O, Kidani H, Takahashi H, Wakabayashi T. Evaluation of cancer - associated carbohydrate antigen (NCC-ST-439) measurement in pure pancreatic juice collected by endoscopic aspiration. *Dig Endosc* 2: 141-147, 1990
- 7) Wakabayashi T, Sawabu N, Takemori Y, Satomura Y, Ohta H, Watanabe H, Yamakawa O, Takahashi H, Watanabe K, Konishi F. Diagnostic significance of cancer - associated carbohydrate antigen (CA19-9) concentrations in pancreatic juice collected by endoscopic aspiration and immunohistochemical study in chronic pancreatitis. *Pancreas* 8: 151-158, 1993
- 8) Ohta H, Sawabu N, Takemori Y, Kidani H, Wakabayashi T, Satomura Y, Watanabe H, Motoo Y, Okai T, Takahashi H. Measurement of sialylated stage-specific embryonic antigen-1 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 15: 35-41, 1994
- 9) Watanabe H, Sawabu N, Ohta H, Satomura Y, Yamakawa O, Motoo Y, Okai T, Takahashi H, Wakabayashi T. Identification of *K-ras* oncogene mutations in pure pancreatic juice of patients with pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res* 84: 961-965, 1993
- 10) Watanabe H, Sawabu N, Songur Y, Yamaguchi Y, Yamakawa O, Satomura Y, Ohta H, Motoo Y, Okai T, Wakabayashi T. Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas* 12: 18-24, 1996
- 11) Watanabe H, Miyagi C, Yamaguchi Y, Satomura Y, Ohta H, Motto Y, Okai T, Yoshimura T, Tsuji Y, Sawabu N. Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay: A simple method for the determination of the types of point mutations. *Jpn J Cancer Res* 87: 466-474, 1996
- 12) Wakabayashi T, Sawabu N, Watanabe H, Morimoto H, Sugioka G, Takita Y. Detection of *K-ras* point mutation at codon 12 in pure pancreatic juice collected 3 years and 6 months before clinical diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 91: 1848-1851, 1996
- 13) Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki R K, Sninsky J J. Detection of *ras* gene mutation in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 53: 2472-2474, 1993
- 14) Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Kyogoku A, Nose H, Shimada K, Ohkura H, Ohtsu H, Yoshida S, Shimosato Y. Detection of point mutations in the *K-ras* oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 73: 1589-1594, 1994
- 15) Berthélemy P, Bouisson M, Escourrou J, Vaysse N, Rumeau JL, Paradyrol L. Identification of *K-ras* mutation in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 123: 188-191, 1995
- 16) Trümper LH, Bürger B, von Bonin A, Hintze A, von Blohn G, Pfreundschuh M, Daus H. Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by polymerase chain reaction from pancreatic secretion. *Br J Cancer* 70: 278-284, 1994
- 17) Uehara H, Nakaizumi A, Baba M, Ishii H, Tatsuta H, Kitamura T, Ohigashi H, Ishikawa O, Takenaka A, Ishiguro S. Diagnosis of pancreatic cancer by *K-ras* point mutation and cytology of pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 91: 1616-1624, 1996
- 18) Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y. Frequent c-*Ki-ras* oncogene activation in mucinous cell hyperplasia of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 53: 953-956, 1993
- 19) Tada M, Ohashi M, Shiratori M, Okudaira T, Komatsu Y, Kawabe T, Yoshida H, Machinami R, Kishi K, Omata M. Analysis of *K-ras* gene mutation in hyperplastic duct cell of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology* 110: 227-231, 1996.
- 20) Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Gerogiev GP. A variation in the structure of the protein coding region of the human *p53* gene. *Gene* 70: 245-252, 1988
- 21) Nigro JM, Baker S J, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins F, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B. Mutation in the *p53* gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705-708, 1989
- 22) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. *p53* mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53, 1991
- 23) Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC.

- Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clue to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878, 1994
- 24) Barton CM, Staddon SL, Huges CM, Hall PA, O'sullivan C, Klöppel G, Theis B, Russel RCG, Neoptolemos J, Williamson RCN, Lane Dp, Lemoine NR. Abnormalities of the p53 tumor suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 64: 1076-1082, 1991
- 25) Kondoh S, Nakamura M, Harima K, Noguchi T, Akiyama T, Okita K. Aberration of the p53 gene in human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Gastroenterol Jpn* 28: 134, 1993
- 26) Scarpa A, Paola C, Mukai K, Zamboni G, Oda T, Iacono C, Hirohashi S. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol* 142: 1534-1543, 1993
- 27) Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int. J Cancer* 58: 1185-191, 1994
- 28) Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Renzani GN. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 54: 1556-1560, 1994
- 29) Redston MS, Caldas C, Seymour AB, Hruban RH, da Costa L, Yeo CJ, Kern SE. p53 mutations in Pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 54: 3025-3033, 1994
- 30) DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman ST, Polak M, van den Berg FM, Allison DC, Cameron JL, Offerhaus, GJA. Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol* 101: 684-688, 1994
- 31) Zhang SY, Agarwal P, Sorling F, Obara T, Ura H, Namiki M, Klein-Azanto AJP. Immunohistochemical analysis of p53 expression in human pancreatic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 118: 150-154, 1994
- 32) Christopher JN, Rall CJN, Yan YX, Graeme-Cook F, Beauchamp R, Yandell DW, Povoski SP, Rustgi AK. Ki-ras and p53 mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 12: 10-17, 1996
- 33) Japan Pancreas Society. Classification of Pancreatic Carcinoma, 1st English ed, p3-14, Kanehara & Co Ltd, Tokyo, 1996
- 34) Bowtell DDL. Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochemistry* 162: 463-465, 1987
- 35) Jeanpièrre M. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Neucleic Acids Res* 15: 9611, 1987
- 36) Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991
- 37) Orita M, Iwahana H, Kanzawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770, 1989
- 38) 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.
- 39) Suzuki K, Sekiya T, Hayashi K. Allele-specific polymerase chain reaction: a method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. *Anal Biochem* 192: 82-84, 1991
- 40) Ainsworth PJ, Surh LC, Coulter-Makie MB. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Neucleic Acids Res* 19: 405-406, 1991
- 41) Oto M, Miyake S, Yuasa Y. Optimization of nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislabs gel electrophoresis apparatus. *Anal Biochem* 213: 19-22, 1993
- 42) Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, Thomas DM, Gilbertson J, Foster C. Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinoma demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res* 51: 3497-3502, 1991
- 43) Arnold Jr H, Hammond PW, Wresse WA, Nelson NC. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 35: 1588-1594, 1989
- 44) Simon B, Weinel R, Hohne M, Watz J, Schmidt J, Kortner G, Arnold R. Frequent alterations of the tumor suppressor genes p53 and DCC in human pancreatic carcinoma. *Gastroenterology* 106: 1645-1651, 1994
- 45) Mao L, Hruban R H, Boyle J O, Tockmann M, Sidransky, D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 54: 1634-1637, 1994
- 46) Sidransky D, von Eschenbach A, Tsai YC, Jones P, Summerhayes I, Marshall F, Paul M, Green P, Hamilton S R, Frost P, Vogelstein B. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science* 252: 706-709, 1991
- 47) Mitchell ML, Carney CN. Cytologic criteria for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Clin Pathol* 82: 171-6, 1985
- 48) Goodale RL, Gajil-Peczalaka K, Dressel T, Samuelson J. Cytologic studies for the diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer* 47: 1652-1655, 1981
- 49) Nakaizumi A, Tastuta M, Uehara H, Yamamoto R, Takenaka A, Kishigami Y, Takemura K, Kitamura T, Okuda S. Cytologic examination of pure pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 70: 2610-2614, 1992
- 50) Ishimaru S, Itoh, M, Hanada K, Tsuchida A, Iwao Y, Kajiyama G. Immunocytochemical detection of p53 protein from pancreatic duct brushing in patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 77: 2233-2239, 1996
- 51) Hall P, Lane D P. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *J. Pathol* 172: 1-4, 1994
- 52) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532, 1988
- 53) Mori T, Nagase H, Aoki T, Arakawa H, Nishihara T, Mori S, Nakamura Y. The APC (adenomatous polyposis coli) gene: a novel mutation in an FAP patient and a Ddel polymorphism in 5' noncoding region. *Hum Mutat* 2: 240-243, 1993
- 54) Nuorva K, Soini Y, Kamel D, Autio-Harmanen H, Risteli L, Risteli J, Vahakangas KH, Paakko P. Concurrent p53 expression

in bronchial dysplasias and squamous cell lung cancer. *Am J Pathol* 142: 725-732, 1993

55) Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, Correo R, Eby YJ, Ruppert JM, Sidransky D. The incidence of *p53* mutation increases with progression of head and Neck cancer. *Cancer Res* 53: 4477-4480, 1993

56) Bennett W, Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, He A, Zhu S, Kusters I, Resau JH, Trump BF, Lane BP, Harris CC. *p53* mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. *Cancer Res* 52: 1783-1787, 1993

57) Nakamori S, Yashima K, Murakami Y, Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Yaefashi S, Konishi Y, Sekiya T. Association of *p53* gene mutation with short survival in pancreatic adenocarcinoma. *Jpn J Cancer Res* 86: 174-181, 1995

58) Hoshi T, Imai M, Ogawa K. Frequent *K-ras* mutations and absence of *p53* mutations in mucin producing tumors of the pancreas. *J Surg Oncol* 55: 84-91, 1994

59) Kaino M, Kondoh S, Okita S, Ryoza S, Hatano S, Sihiraishi K, Kaino S, Akiyama T, Okita K, Kawano T. *p53*

mutations in two patients with intraductal papillary adenoma of the pancreas. *Jpn J Cancer Res* 87: 1195-1198, 1996

60) Sessa F, Solcia E, Capella C, Bonato M, Scarpa A, Zamboni G, Pellegata NS, Ranzani G. N, Rickaert F, Kloppel G. Intraductal papillary- mucinous tumours represent a distinct group of pancreatic neoplasms: an investigation of tumour cell differentiation and *K-ras*, *p53* and *c-erbB-2* abnormalities in 26 patients. *Virchows arch* 425: 357-367, 1994

61) Casey G, Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Lopez ME, Buchler M, Beger HG, Korc M. *p53* mutations are common on pancreatic cancer and are absent in chronic pancreatitis. *Cancer Lett* 69: 151-160, 1995

62) Hayashi K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutation in the genomic DNA. *PCR methods Appl* 1: 34-38, 1991

63) Yanagisawa A, Kato Y, Ohtake K, Kitagawa T, Ohashi K, Hori M, Takagi K, Sugano, H. *c-Ki-ras* point mutations in ductectatic type mucinous cystic neoplasm of the pancreas. *Jpn J Cancer Res* 82: 1057-1060, 1992

Detection of Mutations of *p53* Tumor Suppressor Gene in Pancreatic Juice and Its Application to Diagnosis of Patients with Pancreatic Cancer Yasushi Yamaguchi, Department of Internal medicine, Cancer Research Institute, Kanazawa University Kanazawa 920 — *J. J. Med Soc.*, **106**, 533 — 544 (1997)

Key words *p53*, *K-ras*, pancreatic cancer, pancreatic juice, genetic diagnosis

Abstract

Because the difficulty in obtaining biopsy specimens from patients with pancreatic cancer (PC) is a great restriction for early and differential diagnosis, in contrast to gastric cancer and colorectal cancer, genetic diagnosis in pure pancreatic juice (PPJ) is expected to be useful in the diagnosis of PC. Primarily, detection of mutations of *K-ras* codon 12 in PPJ has been tried. Actually detection of *K-ras* mutation has a high sensitivity, but, recently, not a few false positives have been reported. To improve the genetic diagnosis using PPJ, detection of mutation of *p53* tumor suppressor gene in PPJ was studied. PPJ samples were taken from the orifice of the papilla Vater using a duodenal endoscope. Furthermore, to verify the usefulness of this method, *K-ras* mutations at codon 12 were also studied for the same sample and a comparison between them was made. NonRI-SSCP assay was used for detection of *p53* mutation. With culture cell line DNA, the mutant band could be detected in the sample containing only 0.1% mutant within the wild type. Of the twenty six cases of PC, *p53* mutations were detected in 11 cases (42.3%). In direct sequencing analysis, three cases harbored point mutations. Two had missense mutations and one changed to stop codon. On the other hand, no mutations were seen in four cases with mucin producing tumor of the pancreas (adenoma) or 16 cases with chronic pancreatitis. In *K-ras* analysis with PCR-RFLP which had a high sensitivity in spite of some false positives, 84.0% of PC cases (21/25) were mutation positive. By HPA which was a quantitative method having the advantage of high specificity for cancer, mutation was detected in 65.3% of PC cases (17/26). Using combination assay with *p53* and *K-ras* mutation, genetic abnormalities were seen in 92.0% with PCR-RFLP and 73.1% with HPA. In both methods, *p53* alone was positive in two cases. From these results, the specificity of *p53* mutation for PC is very high, and some cases exhibit only *p53* mutation without *K-ras* mutation. Therefore, to enhance the genetic diagnosis of PC, simultaneous analysis of *p53* and *K-ras* mutation is suggested.