

大腸癌における蛍光標識固定細胞内ハイブリダイゼーション法で検索した染色体の数的異常とp53蛋白の核内蓄積および染色体17p,および18qの欠失に関する研究

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/2297/9132

大腸癌における蛍光標識固定細胞内ハイブリダイゼーション法で 検索した染色体の数的異常と p53 蛋白の核内蓄積および 染色体 17p, および 18q の欠失に関する研究

金沢大学がん研究所外科部 (主任: 磨伊正義教授)

黄 承 東

大腸癌細胞が核 DNA 異数倍体を有することは周知の事実である。本研究では、まず癌抑制遺伝子 p53 の異常が染色体の不安定性を来し、大腸進行癌の核 DNA 異数倍体をもたらす可能性を検討した。続いて、染色体 7, 8, 10, 17 および 18 の数的異常を蛍光標識固定細胞内ハイブリダイゼーション (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 法で検索し、さらに p53 の遺伝子座のある 17p および DCC 遺伝子座のある 18q の異型接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH) を検出した。p53 の点突然変異の結果、合成される蛋白は多くの場合、その半減期が延長するため核内に蓄積し、免疫染色で検出可能となる。本研究では、p53 蛋白の核内異常蓄積は60例中32例 (53.3%) に認められ、これは抗増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体を用いて調べた細胞の増殖活性および画像解析装置で調べた核 DNA の異数倍体とそれぞれ有意の相関を示した (それぞれ $p < 0.01$)。染色体 7, 8 および 10 の数的異常は29例中27例に見られ、その全例が複製数 3 から 7 に至るポリソミーであり、腫瘍間および腫瘍内の不均一性が顕著であった。18番染色体のモノソミーは7例に認められ、このうち1例では17番染色体のモノソミーも同時に存在した。6例中3例の染色体18モノソミーには 18q の LOH が認められ、DCC 遺伝子の半接合体が強く疑われた。18番染色体のモノソミーは進行大腸癌に比較的高頻度に認められ大腸癌の発症および増殖・進展を知る良好な染色体マーカーとなると結論された。

Key words chromosomal aneuploidy, FISH, allelic loss, p53 overexpression, colorectal carcinoma

病理形態学は「核のクロマチンの増量」や「核の大小不同」といった癌細胞に共通した核の特徴や、ある種の癌細胞に特徴的な核の形態を過去数世紀にわたって記載してきた。またその後1960年代より始まったフローサイトメトリー¹⁾による細胞核 DNA 量の測定や1980年代より導入された画像解析²⁾の技術は核 DNA 量や核の大きさ、形態をより客観的に計測することを可能にして、癌の悪性度や、増殖・進展、予後との関係に関する多くの情報を提供してきた。

一方、近年の分子生物学の進歩は、数々の癌遺伝子、癌抑制遺伝子の発見をもたらし、これらの癌遺伝子の増幅や癌抑制遺伝子の欠失はもとより、これらの遺伝子の点突然変異をも検出することを可能にした³⁾。しかしこの形態学と分子生物学の接点にある細胞遺伝学においては一部の造血器腫瘍における特定の染色体数や構造の異常が解明されている以外^{4)~6)}、充実性腫瘍における染色体の変化はいまだ不明の点が多い。その理由の一つは従来の染色体分染法 (chromosome band analysis) による染色体構造解析では細胞を培養し、核分裂中間期に導入する必要があり、充実性腫瘍ではこの操作が困難かつ煩雑であるのみ

ならず、培養操作自体によるカリオタイプ (karyotype) の変化も認められたためである^{7)~10)}。しかし、ヒト染色体のセントロメアとその近傍には α -サテライト (satellite) と呼ばれる個々の染色体に固有な 5 から 10 個のヌクレオチドの約 10^4 回に及ぶ繰り返し配列があることが知られるようになり⁸⁾、このセントロメア特異的 α -サテライト配列をプローブに用いる固定細胞内ハイブリダイゼーションと免疫蛍光色素法とを組み合わせた蛍光標準固定細胞内ハイブリダイゼーション (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 法は分裂間期のみならず休止期の細胞の染色体数も計測することを可能とした。現在、この FISH 法を用いた研究は緒についたばかりであり、充実腫瘍では膀胱癌^{10)~11)}、脳腫瘍¹²⁾、大腸癌¹³⁾、乳癌^{14)~16)}、卵巣癌^{17)~18)}、頭頸部癌¹⁹⁾、胃および食道癌^{20)~21)}、前立腺癌²¹⁾ などについて報告があるが、まだ、特定の癌における固有の染色体数変化について一致した意見はない。

これまでのヒト癌細胞における遺伝子異常の研究において、現在最も普遍的にその異常の知られている癌抑制遺伝子 p53 はさまざまな機能を有することが報告されている^{22)~23)}、その

平成 6 年 12 月 16 日 受付, 平成 7 年 2 月 24 日 受理

Abbreviations: AP, aneuploidy; bp, base pair; CDPK, cyclin dependent protein kinase; DAPI, diaminophenylindole; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; FITC, fluorescence isothiocyanate; LOH, loss of heterozygosity; NON-AP, non-aneuploidy; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI, propidium iodide; SUS-AP, suspicious aneuploidy; VNTR, variable number of tandem repeat

中で最も注目されるのは細胞増殖の監視 (checkpoint) 機能への関与である。これは DNA に損傷を受けている細胞の核分裂サイクルの G1 期から S 期への進行を抑制する機能であって^{24)~26)}、この機能が破綻すると DNA 異常を有する細胞が容易に分裂増殖するため、次々と他の遺伝子異常や染色体異常が増幅されやすい状態 (genetic instability²⁴⁾, chromosomal instability²⁶⁾) が惹起され、ひいては核異形度の強い、すなわち核 DNA の異数倍体細胞が出現することが推察されるが、まだその詳細は不明な点が多い。本研究では、進行大腸癌を対象に増殖期細胞の指標として増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の免疫組織化学的染色と、画像解析装置を用いた核 DNA 量測定を行い、p53 遺伝子の異常が細胞増殖活性の増加を伴って核 DNA の異数倍体をもたらしている可能性がないかを検討した。次に、FISH 法を用いて p53 遺伝子の存在する17番染色体の数的異常と大腸癌で高頻度の異常を指摘されている癌抑制遺伝子 *DCC* の局在する第18番染色体、およびすでに各種の癌において染色体数異常の報告のある第7⁷⁾⁹⁾¹¹⁾¹⁶⁾¹⁷⁾²⁰⁾、8¹³⁾²⁰⁾、10²⁰⁾ 番染色体の数異常を FISH 法で検索した。さらにサザンハイブリダイゼーション³¹⁾³²⁾および PCR 法を用いて増幅した DNA を使って染色体の異型接合性 (loss of heterozygosity, LOH) をみる PCR-LOH 法³³⁾³⁴⁾³⁵⁾を用いて、p53 遺伝子、*DCC* 遺伝子がそれぞれ局在する第17染色体短腕 (17p) および第18染色体長腕 (18q) の欠失について検索し、相互の関係を解析した。

対象および方法

I. 対象

金沢大学がん研究所附属病院外科で、1992年から1993年に切除された進行大腸癌60例 (パラフィン包埋材料24例、新鮮切除

Table 1. Definition of DNA ploidy pattern

Ploidy pattern	Definition
NON-AP	The DNA value of stemline is inside $2C \pm CV$ of reference cells.
SUS-AP	The DNA value of stemline is inside, $i \pm CV$ of reference cells ($i=4C, 8C, 16C$)
AP	The DNA value of stemline is not inside, $i \pm CV$ of reference cell ($i=2C, 4C, 8C, 16C$)

2C, DNA content of normal diploid cell; CV, coefficient of variation.

Table 2. Primers sets used in PCR-LOH assays

Primer set	Priming region	Amplicon size (base pairs)	Polymorphism type	Primer sequences
1.	pYNZ22	170-870	VNTR	5'-CGAAGAGTGAAGTGCACAGG-3' 5'-CACAGTCTTTATTCTTCAGCG-3'
2.	<i>DCC</i>	396	MspI RFLP	5'-TGCACCATGCTGAAGATTGT-3' 5'-AGTACAACACAAGGTATGTG-3'
3.	<i>DCC</i>	150-210	VNTR	5'-GATGACATTTTCCCTCTAG-3' 5'-GTGTTATTGCCTTGAAAAG-3'

材料36例)を対象とした。新鮮材料では、手術後直ちに0.1から0.8gの癌組織と正常組織を採取し、癌細胞浮遊液の作製とDNAの抽出に用いた。ホルマリン固定パラフィン包埋材料からは、Hedleyら³⁶⁾の方法によって単離細胞浮遊液を調整した。すなわち、ミクロトームにより60 μ m前後の切片を数枚薄切し、キシレンによる脱パラフィン後、アルコール希釈系列により親水化し、0.5%ペプシンにより1時間消化した。新鮮材料はハサミを用いて細切後、0.1%コラゲナーゼ (和光純薬、東京)を加えた5%牛胎仔血清を含む最小基本培養液 (ICN Biomedicals, 東京)中で1時間消化した後、50 μ mナイロンメッシュにて濾過し、リン酸緩衝生理食塩水溶液で洗浄を行った。細胞浮遊液はカルノア固定液 (メタノール3:酢酸1)中で、冷凍庫内 (-20 $^{\circ}$ C)に保存した。

II. 画像解析装置による核DNA量の測定

癌組織と正常粘膜より作製した細胞浮遊液をシラン塗装したスライドガラス (DAKO, Glostrap, Denmark)上の離れた部位にそれぞれ塗抹し、Feulgen染色を行った。細胞核DNA量分布パターンはMIMAMED DNA画像分析機 (Leitz, Wetzlar, Germany)³⁾を用い、正常大腸上皮細胞核100個を対照として、癌細胞200個を測定して決定した。細胞核DNA量分布パターンの判定に際しては同装置に内蔵のコンピュータソフトIDORISにより表1の判断基準で決定した。すなわち細胞内DNA量により非異数倍体 (non-aneuploid, NON-AP)、疑異数倍体 (suspicious aneuploid, SUS-AP)、および異数倍体 (aneuploid, AP)の3群に分類した。

III. p53蛋白およびPCNAの免疫染色

FISH用およびDNA抽出用の組織を採取した部分に最も接近した部分のパラフィン包埋切片を用いて、p53蛋白に対するポリクローナル抗体CM-1 (500倍希釈, Novocastra, Newcastle, England), RSP53 (1000倍希釈, ニチレイ, 東京)およびPCNAに対するモノクローナル抗体PC-10 (500倍希釈, DAKO)を用いた免疫染色を行った。p53免疫染色とPCNA免疫染色には同一ブロックの連続切片を用い、抗原の同定にはストレプトアビジン・ビオジン・ペロキシンダーゼ法を用いた³⁸⁾³⁹⁾。

p53免疫染色の評価は暗褐色に染色される核を計測し、20%~50%の癌細胞の核が染色された症例をp53弱陽性、50%以上の癌細胞の核が染色された症例をp53強陽性とし、陽性核が20%以下の症例はp53陰性とした。

PCNA免疫染色の評価するにあたってはp53陽性症例では、PCNA染色切片上でp53陽性部分に一致した領域で500個の癌細胞核を数えた。またp53陰性症例ではPCNA染色切片上で、任意の3か所を選びそれぞれ160, 160, 180個の癌細胞を数

えた。細胞核にジアミノベンチジンの明瞭な発色が見られるものを標識陽性とし、標識率50%以上(250個以上に陽性)を示す症例を PCNA 陽性とした。

IV. FISH 法による第7, 8, 10, 17および18番染色体数の計測

新鮮材料から調整した癌細胞および正常粘膜上皮細胞をシラン塗装スライド上に塗抹したものをを用いた。ビオチン標識あるいはジゴキシゲニン標識 α -セントロメアプローブは Oncor 社 (Gaithersburg, USA) より購入したものをを用いた。FISH 法は同社の指示に従って行った⁹⁾。すなわち、細胞を塗抹したスライドを RNase で1時間処置後エタノールで脱水した後、70°C で2分間変性し、同じく熱変性したプローブと37°C で一晩で反応させた。反応したプローブの検出にはフルオレッセンスイソシアナート (fluorescence isothiocyanate, FITC) 標識ストレプトアビジン (100倍希釈, Vector, Burlingame, USA), あるいはローダミン標識抗ジゴキシゲニンヤギ Fab 分画 (10倍希釈, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用い、必要な場合はビオチン化抗ストレプトアビジンヤギ抗体 (100倍希釈, Vector), ローダミン標識抗ヤギ IgG-ラバ抗体 (100倍希釈, Chemicon International, Temecula, USA) を用いて免疫組

織化学的増幅⁴⁰⁾を行った。また Sauter ら⁴¹⁾の方法に従って第17染色体をローダミン, 第18染色体を FITC で二重標識を行った。核染色はプロピジウムイオダイド (propidium iodide, PI), あるいはジアミノフェニールインドール (diaminophenylindole, DAPI) を用いて行い、観察は落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス, 東京) を使用した。

V. p53 遺伝子およびDCC 遺伝子のLOH の検討

1. DNA の抽出

DNA はフェノール・クロロホルム法⁴²⁾を用いて抽出した。

2. pYNZ22 を用いたサザンハイブリダイゼーション

p53 遺伝子座のある 17p13.1 の近傍 17p13.3 に対する多型的 DNA プローブ pYNZ22³¹⁾³²⁾ を使ってサザンハイブリダイゼーションを行った。10 μ g のゲノム DNA を 40U の制限酵素 Msp I を用いて消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロン膜へ転写し、型の如くプレハイブリダイゼーション, ハイブリダイゼーション, 洗浄を行いオートラジオグラフィを施行した⁴³⁾。pYNZ22 はがん研究財団 (東京) を通じて入手し、ランダムプライミング法⁴⁴⁾を用いて³²P で標識した。

3. PCR-LOH 法による分析

pYNZ22 領域内の変数くりかえし (variable number of

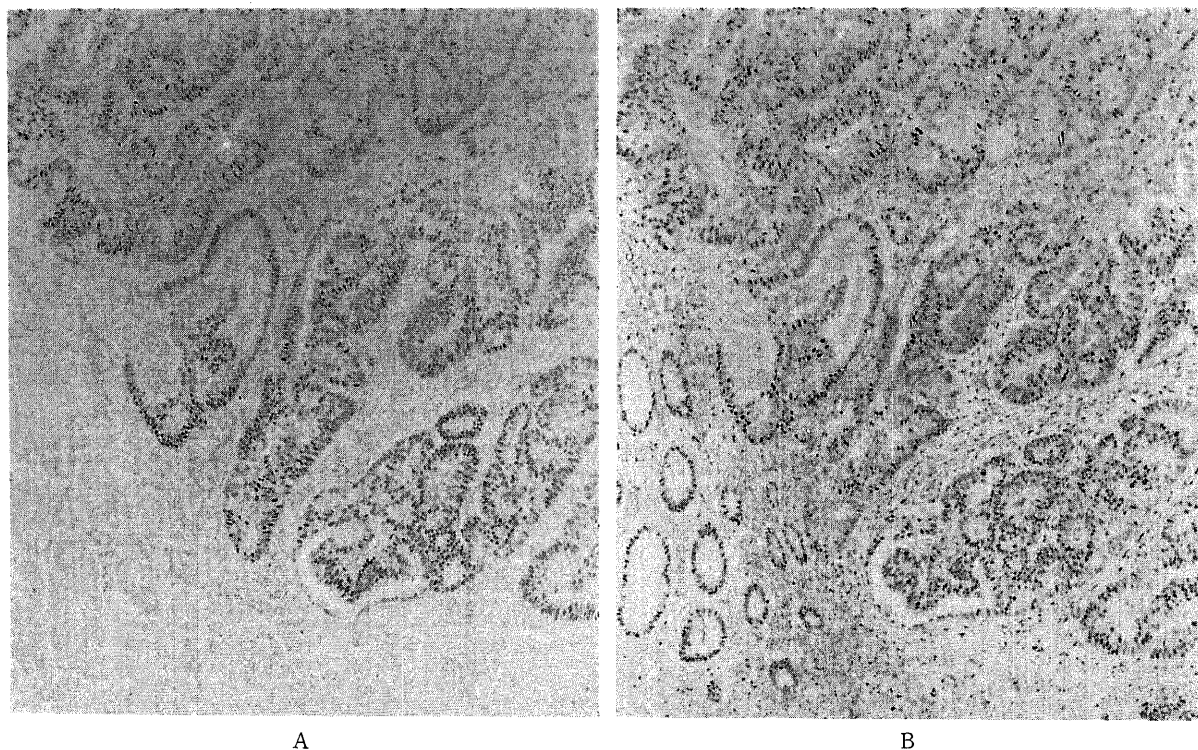


Fig. 1. Photomicrographs of p53 (A) and PCNA (B) immunoreactivities in serial sections (case 23) ($\times 60$).

Table 3. Correlation* between overexpression of p53 and DNA ploidy pattern in colorectal carcinoma

p53 overexpression	Number of cases	
	AP&SUS-AP	NON-AP
Positive	29	3
Negative	12	16

* Fisher's exact probability test, $p < 0.01$

Table 4. Correlation* between overexpression of p53 and PCNA in colorectal carcinoma

p53 overexpression	Number of cases	
	PCNA-positive**	PCNA-negative
Positive	31	1
Negative	10	18

* Fisher's exact probability test, $p < 0.01$

** PCNA-positive, labeling index $> 50\%$

tandem repeat, VNTR) 領域³⁹, 18q21.3 にある VNTR 領域⁴⁰, および18q21.3 内の多型的 (polymorphic) Msp I 部分を含む M2 領域³⁹を, 表 2 に示すオリゴヌクレオチドプライマーを用いて, PCR により増幅し, 前 2 者はそのまま, 後者は Msp I による消化を行い 2.5% アガロース上に電気泳動した.

VI. 統計学の処理法

確率 (p) の検定はフィッシャーの直接確率計算法により算出し⁴¹, 危険率 1% 未満をもって有意と判定した.

成 績

I. p53 蛋白の過剰発現と核 DNA 量

MIAMED DNA 画像解析機を使った核 DNA 量分布パターンの分析では AP, SUS-AP および NON-AP がそれぞれ 24 例, 17 例, 19 例であった. 2 種の抗 p53 蛋白抗体を用いた免疫染色の結果はほぼ同様で, 癌細胞の核に限局して黒褐色のジアミノベンチジンの反応が見られた (図 1A). p53 陽性細胞の分布はさまざまで, 癌細胞のほとんどすべてが陽性であるものや, 陽性

細胞の胞巣と陰性細胞の胞巣がモザイク状に分布するものや, 胞巣内に陽性細胞が散在するものが認められた. 正常粘膜の上皮細胞および間質の細胞に陽性細胞は見られなかった. 画像解析で見た核 DNA 量分布パターンの異常と, p53 蛋白の陽性率の結果を表 3 に示した. 両者の間には有意な相関が見られた ($p < 0.01$).

II. p53 蛋白の過剰発現と PCNA 陽性率との相関

PCNA に対する免疫反応も p53 と同様に核に局在して見られた (図 1B). 癌細胞以外では腺窩基底部の増殖帯の細胞および粘膜固有層のリンパ濾胞の胚中心の細胞が陽性であった. 正常粘膜上皮の PCNA 陽性率は $30.3 \pm 7.2\%$ (平均 \pm 標準偏差 $n=60$) であった. 50% を境として陽性, 陰性に分けると, 表 4 に示すとおりで, これは p53 蛋白の過剰発現と有意の相関を示した ($p < 0.01$).

III. FISH 法による染色体数の計測

使用した 5 種類の染色体プローブ, いずれでもそれぞれのセントロメア領域は休止期核内に赤色 (ローダミン標識) あるい

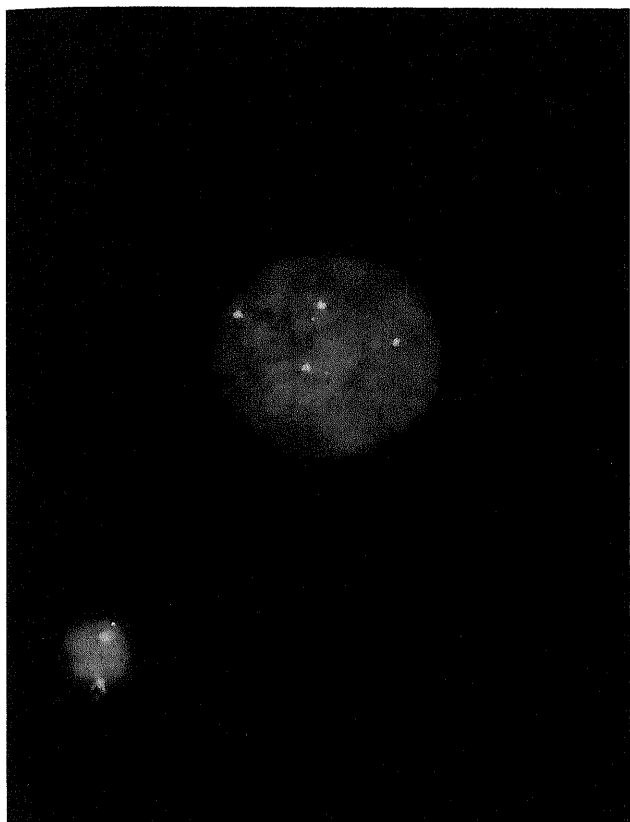
Table 5. Chromosomal copy numbers determined by FISH analysis, DNA ploidy and immunoreactivities to p53 and PCNA of 31 colorectal adenocarcinoma

Case number	Chromosome					Ploidy ^{a)}	p53 ^{b)}	PCNA ^{c)}
	7	8	10	17	18			
1.	2	2/3	2	2/3	2/3/4	A	+	+
2.	2/3/4/5/6	2/3/4/5	2/3/4	2/3/4	2	SA	+	+
3.	2/3/5	2/3	2	2/3	1	A	-	+
4.	2	2/3	2	2	2	N	-	-
5.	2/3	2	2	2/3	2	SA	+	+
6.	2/3	2	2	2	2	N	-	-
7.	2	2	2	1/2	1/2	N	-	-
8.	2/3/4	2/3	2/3	2/3/4	2	A	-	+
9.	2/3	2	2	2	1/2	N	-	-
10.	2/3	2/3/4	2/3	2/3/4	2	A	+	+
11.	4/5	2	2/3/4	2/3/4	2	SA	+	+
12.	2	2	2	2	1/2	N	-	-
13.	2/3/4/5	2/3/4/5	2/3/4	2/3/4	2	N	+	+
14.	2/3/4/5	2/3/4/5	2/3/4/5/6	2/3/4/5	2	A	+	+
15.	2/3	2	2	2	2	A	-	-
16.	2/3/4	2/3/4	2/3	2/3/4	1/2	A	+	+
17.	2/3	2/3	2	2/3	2	A	+	+
18.	2/3/4	2/3	2	2/3	2/3	N	+	-
19.	2/3	2	2	2	2	A	-	+
20.	2/3/4	2/3/4	2	2	2/3/4	SA	-	+
21.	2/3/4	2/3/4	2	2	2	N	-	-
22.	2	2	2	2	2	N	-	-
23.	3/4	7	2/3	2/3/4	2	A	+	+
24.	2/3	2	2	2	2	N	-	-
25.	2	2/3	2	2	2	N	-	+
26.	2/3/4	2/3/4	2/3	2/3/4	2/3	SA	-	-
27.	2/3	1/2	2	2	1/2	A	+	+
28.	2	2/3/4	2/3	2/3/4	2	A	+	+
29.	2/3	2/3	2	2	2	A	-	+
30.	2/3	2/3	2	2	1/2	SA	-	-
31.	2/3/4/5	2/3	2/3/4	2/4	2	A	-	-

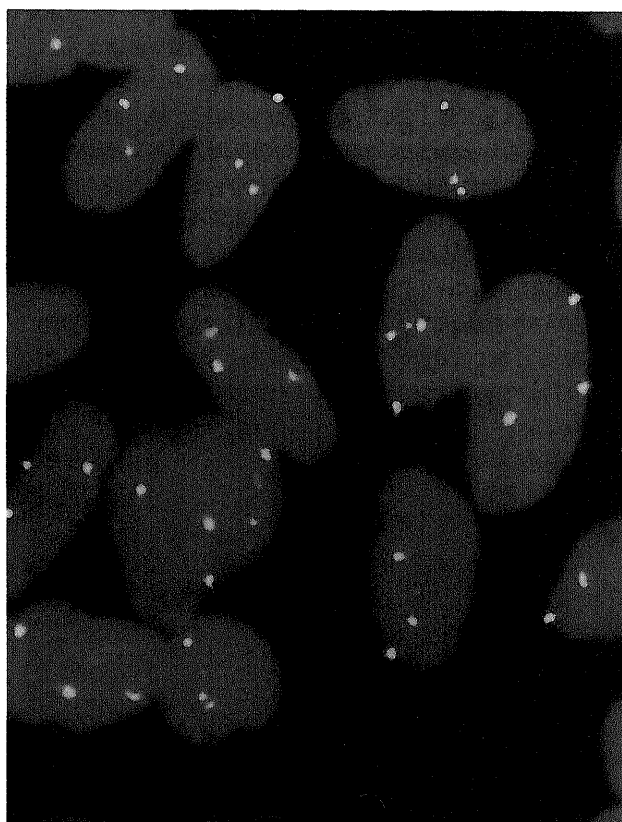
a) Ploidy patterns: A, aneuploid; SA, suspicious aneuploid; N, non-aneuploid.

b) p53 immunoreactivity: +, positive cells $\geq 50\%$; +, $20\% \leq$ positive cells $< 50\%$; -, positive cells $< 20\%$.

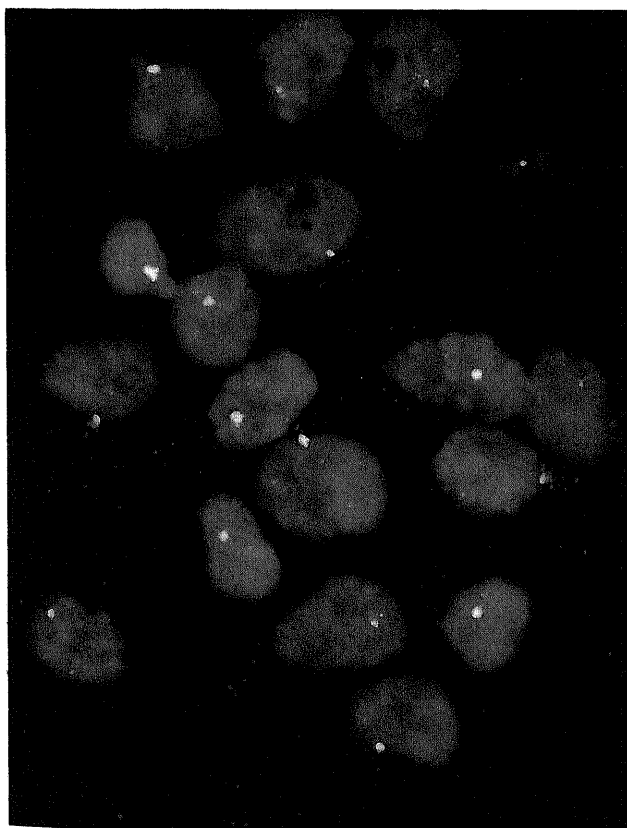
c) PCNA immunoreactivity: +, positive cells $\geq 50\%$; -, positive cells $< 50\%$.



A



B



C

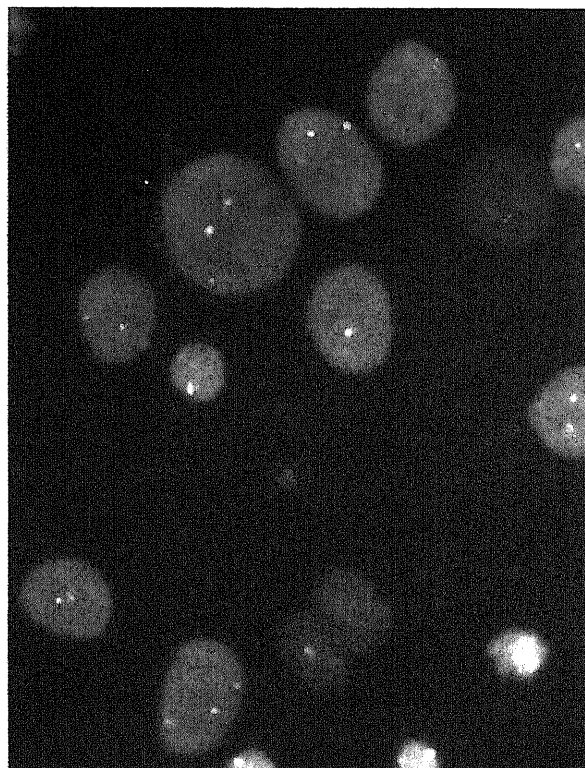


Fig. 3.

Fig. 2.

は緑色 (FITC 標識) の明瞭なシグナルとして認められた。正常粘膜上皮細胞およびリンパ球細胞を用いた細胞 1 個あたりのシグナルの平均値は、0 個 $0.7 \pm 1.5\%$ 、1 個 $11.9 \pm 24.4\%$ 、2 個 $89.4 \pm 6.8\%$ 、3 個 $1.3 \pm 1.5\%$ 、4 個が $0.1 \pm 0.2\%$ であり 5 個以上は認められなかった。本研究では癌細胞で 45% 以上の細胞にシグナルの減少が見られた場合を有意の減少とみなし、モノソミーのクローンが存在すると判断し、10% 以上の細胞にシグナルの増加が認められた場合を有意の増加としポリソミーのク

ローンがありと判断した。結果は表 5 に示す如くである。第 7, 8, 10 染色体の数的異常はすべてポリソミーで、トリソミーからヘキサソミー (hexasomy) までに及んでおり、かつ腫瘍間での差異が大きく、また同一腫瘍内での不均一性も顕著であった (図 2A, B)。染色体 17 のモノソミーは 1 例 (症例 7)、染色体 18 のモノソミーは 6 例 (症例 3, 7, 9, 12, 16 および 30) について観察された (図 2C)。染色体 17, 18 に対するプローブを使って二重標識を行った結果、症例 3, 7, 9, 12, 16 および 30 では同一核内に 18 番染色体のシグナル 1 個と 17 染色体の

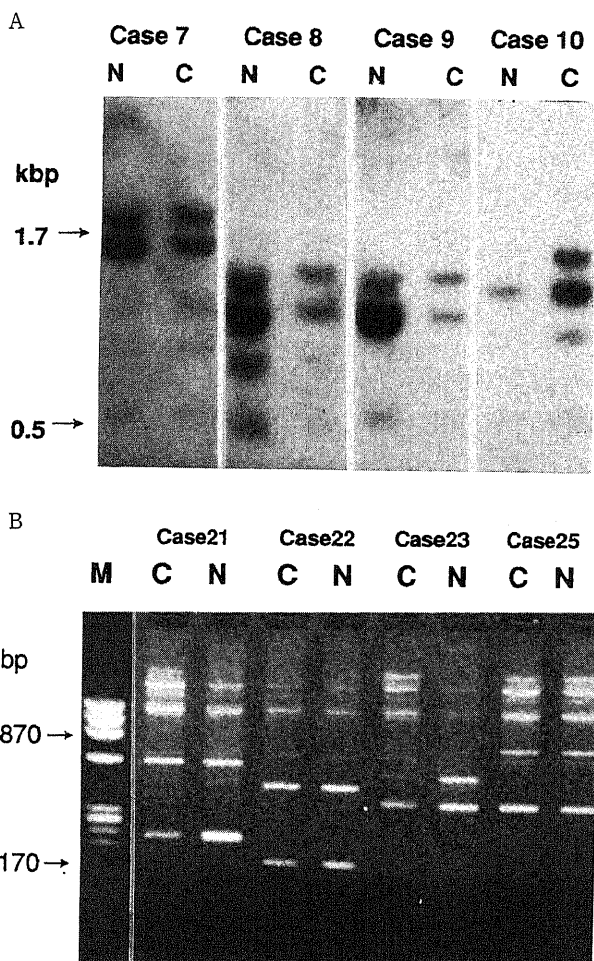


Fig. 4. Representative cases of LOH at 17p13.3 on colon carcinomas detected by Southern blot hybridization with pYNZ 22 (A) and electrophoresis of PCR-product of highly polymorphic VNTR segment pYNZ 22 (B). (A) A spectrum of the polymorphic MSPI-restriction fragments ranging from 0.5 to 1.4 kbp is shown in autoradiograph. In cases 7 and 8 LOH is found. In case 9 LOH is not found and case 10 is uninformative. (B) Two bands between 170bp and 870bp are found in normal tissues. In case 23 the larger band is lost in cancer tissue. M, $\Phi \times 174$ /Hae III marker fragments; C, carcinoma; N, normal tissue.

Table 6. LOH of p53 gene and DCC gene

Case number	p53 polymorphic sites		DCC polymorphic sites	
	VNTR ^a		VNTR ^b	M2 ^c
	A	B		
1.	He	He	Ho	Ho (c)
2.	He	He	Ho	Ho (c)
3.	LOH	He	LOH	Ho (c)
4.	He	He	Ho	Ho (c)
5.	He	Ho	Ho	Ho (c)
6.	LOH	He	LOH	He
7.	LOH	LOH	*LOH	Ho (c)
8.	LOH	Ho	Ho	Ho (c)
9.	He	He	*LOH	He
10.	U	Ho	LOH	Ho (c)
11.	He	Ho	Ho	Ho (c)
12.	He	Ho	*LOH	Ho (c)
13.	He	He	LOH	Ho (c)
14.	He	He	LOH	LOH
15.	U	He	*LOH	Ho (c)
16.	LOH	He	*Ho	Ho (c)
17.	He	He	Ho	He
18.	He	He	He	Ho (c)
19.	LOH	He	He	He
21.	LOH	He	He	He
22.	He	Ho	Ho	He
23.	LOH	LOH	Ho	Ho (c)
25.	He	He	He	Ho (c)
26.	LOH	LOH	LOH	LOH
27.	N	He	*Ho	Ho (c)
28.	He	He	LOH	He
29.	U	He	LOH	Ho (c)
30.	He	He	*Ho	Ho (c)
31.	LOH	LOH	Ho	LOH

a) VNTR polymorphism was detected by Southern hybridization using pYNZ22 (A) and PCR-LOH (B).
 b) c) Both VNTR and M2 polymorphism were detected by PCR-LOH.
 Abbreviations: He, heterogenous; LOH, loss of heterozygosity; U, uninformative; Ho (c), homogeneously cut; *, case with chromosome 18 monosomy in FISH; N, not test.

Fig. 2. Examples of FISH on nuclear smears of colon cancer using centromere-specific probes. The probes were detected by FITC and nuclei were counterstained by propidium iodide. ($\times 600$). (A) Four cancer nucleus with 4 signals and a lymphocytic nucleus with 2 signals are shown. (B) Case 17 shows a clone of cancer cells with three centromeric copies of chromosome 8. (C) FISH of the chromosome 17 in case 7 demonstrates a clone of cancer cells with single centromeric copy of chromosome 17.

Fig. 3. Two colour-FISH of chromosome 17 (rhodamine detection, red signals) and chromosome 18 (FITC detection, green signals). Nuclei were counterstained with DAPI. Detection of two red spots and one green signal in single nuclei indicates the presence of corresponding chromosomes in the nuclear structures (case 27).

シグナル 2 個を示す細胞集団が確認された (図 3)。

IV. 17 番染色体短腕の欠失

pYNZ22 を用いたサザンハイブリダイゼーション法の検索を行った 29 例中 26 例 (89.7%) で、正常粘膜 DNA に 500 から 1700 塩基対 (base pairs, bp) の間に 2 本のバンドが見られ、異種接合性が認められた。癌 DNA でこのうち一方のバンドの明らかな減弱、消失の認められたもの 12 例 (46.2%) を LOH 陽性とした。代表的な症例を図 4A に示した。PCR-LOH では 29 例のうち 23 例が異種接合性、すなわち 170bp から 870bp の間に 2 本のバンドがみられ、そのうち 4 例、17.4% に LOH が認められた。代表的な症例を図 4B に示した。サザンハイブリダイゼーション法および PCR-LOH 法による 17p の LOH の結果は表 6 に示

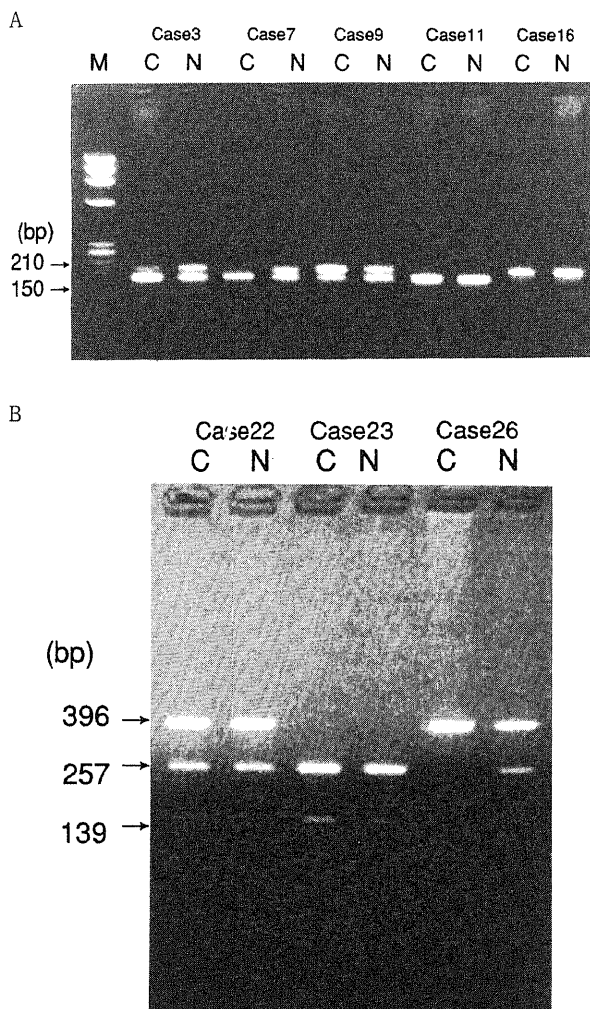


Fig. 5. PCR-LOH of *DCC* gene in colon carcinomas. Representative cases of LOH at VNTR (A) and M2 (B) are shown. (A) spectrum of alleles from 150 to 210 bp is generated by PCR. In cases 3, 7 and 9 strong allelic imbalance is seen in carcinomas but not in normal tissues. Cases 11 and 16 are uninformative. (B) Amplification of the MSP 1 RFLP site within *DCC* gene produced a segment 396 bp long; cleavage results in fragments 257 and 139 bp long. In case 22 heterozygosity is not lost in cancer tissue. In case 26 cleaved (257+139 bp) alleles found in normal tissues are lost in carcinoma, thus LOH is positive. Case 23 is uninformative because DNAs are homogeneously cut by Msp I. C, carcinoma; N, normal tissue.

すとうりであるが、PCR-LOH ではサザンハイブリダイゼーション法で検出できる対立遺伝子の変化の一部のみを検出できることを示している。

V. 18 番染色体長腕の欠失

正常組織の DNA を用いた VNTR 領域の増幅では 29 例中 17 例 (58.6%) で 150bp と 210bp の間に 2 つのバンドが見られ、異種接合体と考えられ、この 17 例中一方のバンドが癌 DNA で著しく減弱している 11 例 (64.7%) を LOH 陽性とした (図 5A). M2 部分の増幅では 29 例全例で癌部、非癌部 DNA から 396bp のオリゴヌクレオチドが合成された。MspI 消化によって正常 DNA に 396bp のバンドに加えて 257 と 139bp に切断されたバンドの確認できた 10 例を異種接合体とし、そのうち癌 DNA で 257bp の 396bp のバンドの消失していた 3 例を LOH 陽性とした (図 5B). 癌 DNA で 396bp バンドの消失したものは認めなかった。VNTR, M2 の両者あるいは一方に異種接合性の見られた 19 例中、LOH のみられた 13 例 (68.4%) を 18q21.3 の欠失とした (表 6)。

考 察

癌抑制遺伝子 *p53* は様々な癌で高頻度にミスセンス突然変異が起こることが知られており、その結果合成される *p53* 蛋白は多くの場合、その半減期が延長するため核内に蓄積し、免疫染色で検出可能となる^{46,47}。本研究ではこの事実を利用して、パラフィン包埋切片でも *p53* 蛋白の検出可能である抗体 CM-1 および RSP53 を用いて *p53* 蛋白の核内蓄積を免疫組織化学的に調べた結果、*p53* 蛋白陽性例は 32 例、53.3% に見られた。この結果を MIMAMED DNA 画像解析機を用いた核 DNA 量の測定結果と比較する *p53* 核内蓄積陽性群では陰性群に比して AP および SUS-AP の症例が有意に多かった ($p < 0.001$)。さらに *p53* の核内異常蓄積と 50% 以上の PCNA 標識率とは有意差をもって ($p < 0.01$) 正の相関を示した。すなわち本研究の成績は間接的ではあるが、*p53* の点突然変異が、染色体不安定 (chromosomal instability) を伴って核 DNA 異常をもたらすという仮説を強く支持するものであろう。同様の所見は他の研究者によって、肝癌⁴⁸、神経膠細胞腫⁴⁹ および肺癌⁵⁰ について報告されている。PCNA は DNA ポリメラーゼ σ の補酵素であり細胞増殖サイクルに従って増減することがわかっており、抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色では G1-S 期の細胞核が強く染色され、休止期の細胞核は陰性となる。このため PCNA は ³H-チミジン、プロモデオキシウリジン (bromodeoxy uridine), Ki-67 あるいは DNA ポリメラーゼ α と同様の増殖細胞のマーカーの一つとして用いられてきた^{39,40-50}。しかし、最近細胞増殖のメカニズムが明らかにされにつれて、PCNA が細胞増殖により直接的に関係していることがわかってきた⁵¹。細胞増殖サイクルの各段階は数種のサイクリン依存性蛋白リン酸化酵素 (cyclin dependent protein kinase, CDPK) によって制御されているが、Waga ら⁵² によって発見された CDPK に対する抑制因子の一つ p21 は、*p53* によって発現誘導を受けており、PCNA と直接結合する事により細胞増殖を抑制することが明らかになってきた。Dulic ら⁵³ は培養細胞を用いた実験で野生型の *p53* を有する細胞を γ 線照射して DNA 損傷を起こすと p21 が合成され、DNA の複製が抑制されるが、変異型 *p53* を有する細胞を γ 線照射しても、この抑制が効かないことを証明している。

次に核 DNA 量の異常と染色体の数的異常の関係について検討した。DNA 画像解析では NON-AP と判断された症例が11例あったが、FISH 法による染色体分析では10症例で、検索した5種類の染色体のうち少なくとも一種類の染色体について数的変化が認められた。従って、FISH 法による染色体分析は画像解析と比べて癌細胞の核の異常を知るためのより鋭敏な検査法と言えよう。画像解析が核 DNA の総量を計測しているのに対し、実際には染色体の増加も減少も起こっていること、また、染色体1個の DNA 量は総ゲノムの極く一部にしかすぎない。例えば第22番染色体1個の DNA 量は総ゲノムの0.68%である¹²⁵⁴ことを考えれば、このことは容易に理解ができる。

大腸癌における染色体の解析は染色体分染法でもすでに行われており⁵⁵⁻⁵⁷、Muleris ら⁵⁵は大腸癌11例について検討し、全例で17染色体の短腕が傍セントロメア領域より切断され転位を起こしていること、また10例で18番染色体の転位を伴わない相対的欠失があったことを報告している。一方抽出した DNA を用いたサザンハイブリダイゼーション法や PCR-LOH 法では、p53 遺伝子のある 17p⁽¹¹⁸¹⁵⁸⁻⁶²⁾、および DCC 遺伝子のある 18q^(15863/64)が大腸癌で高頻度に欠失していることがわかってい。本研究でもほぼ諸家の報告に一致して、17p の LOH は 51.7%、18q の LOH は 63.2%に見られた。今回の FISH 法による染色体の検索では個々の腫瘍の間、あるいは同一腫瘍内での染色体数の変化の多様性が大きかったが、染色体 7、8 および 10に見られた変化はすべてポリソミーであった。注目すべきことは18染色体のモノソミーが7例見られたことであり、そのうち1例は17染色体のモノソミーを伴っていた。FISH 法ではプローブの核内への浸透の不良、細胞核調整の過程での DNA の欠損、核 DNA の変性の不良が原因で、シグナル数の減少が見られることが報告されている¹²⁵⁵。しかし本研究ではモノソミーと判定した7症例では1例を除いて二重標識により同一核に18染色体のダイソミーが認められたので、これらの手技上の原因によるアーチファクトの可能性は考えられない。セントロメア領域のモノソミーは必ずしも短長腕を含めた染色体全体のモノソミーを意味しない⁸⁹⁽⁹¹³¹⁸⁾とされているが、今回認められた染色体18モノソミーの7例のうち PCR-LOH で異種接合体であった4例中3例で 18q21.3 の LOH が認められ、少なくともこれらの3症例では18染色体長腕の欠失を伴っていることを示している。このことは FISH 法で見た染色体18のモノソミーが 18q21.3 上の遺伝子 DCC の半接合体を間接的に知る手段となりうることを示している。セントロメア特異性プローブを用いた FISH 法ではサザンハイブリダイゼーション法や PCR-LOH 法と異なり個々の細胞単位の染色体変化を知ることができ、また組織切片への応用が可能である。最近 Micale ら⁶⁵は α -セントロメア特異性プローブを使った FISH 法を乳癌組織に応用し、癌とその近傍の乳管上皮の過形成を示す領域に共通に染色体16、17、18のモノソミーが、また浸潤癌とその近傍の非浸潤癌に共通に1番染色体のポリソミーが頻繁に見られることより、これらの染色体異常がそれぞれ乳癌の発癌、あるいは乳癌の増殖・進展を知るよい標識になるとしている。今回の研究では染色体18のモノソミーが大腸癌の発癌、増殖・進展の解明に有用なマーカーになる可能性が高いことが示唆された。

結 論

大腸癌細胞核の異常を細胞形態学的手法(画像分析による核

DNA 量の測定)、細胞遺伝学的手法(FISH 法による染色体数の増減)および分子生物学的手法(p53 蛋白の異常核内蓄積、PCNA 標識率、p53 遺伝子と DCC 遺伝子座の欠失)を使って解析を試み、以下の結果を得た。

1. p53 蛋白の異常核内蓄積と、PCNA 標識率および核 DNA の異数倍体、疑異数倍体とはいずれも有意の正の相関が認められ ($p < 0.01$)、p53 の突然変異が染色体の不安定性を惹起して、核異常を増幅している可能性が示唆された。
2. 染色体数の変化は腫瘍間の差異および同一腫瘍内での不均一性が高かった。染色体 7、8、10にみられた数的異常はすべて染色体数の増加であった。一方染色体18には比較的高頻度(24%)にモノソミーが認められた。
3. p53 遺伝子座のある 17p および DCC 遺伝子座のある 18q の LOH はそれぞれ 51.7%、63.2%に見られた。
4. 染色体18のモノソミーが認められた7例中4例に 18q の欠失が認められ、これらの症例では、DCC 遺伝子の半接合体が存在する可能性が高かった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師磨伊正義教授に深甚の謝意を捧げます。また終始御指導、御助力を頂きました金沢大学第一病理大井章史助教授に深く感謝いたします。最後に本研究の遂行にご協力頂きました金沢大学がん研究所外科講座員に厚く御礼を申し上げます。

なお、本論文の一部は第六回日本消化器癌発生研究会、第十二回 DNA 研究会、第五十三回日本癌学会において発表した。

文 献

- 1) 御供泰治: 歴史。フローサイトメトリー(太田和雄、野村和弘、高木 滋編)、第3版、5-10 頁、蟹書房、東京、(1990)。
- 2) Auffermann, W., Repges, R. & Böcking, A.: Rapid diagnostic DNA cytometry with an automatic microscope and a TV image-analysis system. *Anal. Quan., Cytol.*, **6**, 179-188 (1984)。
- 3) Böcking, A., Auffermann, W., Vogel, H., Schlöndorff, G. & Goebels, R.: Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. *Cancer*, **56**, 1600-1604 (1985)。
- 4) Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kerm, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. M. & Bos, J. L.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Eng. J. Med.*, **319**, 525-532 (1988)。
- 5) Borrow, J., Goddard, A. D., Sheer, D. & Solomon, E.: Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science*, **249**, 1577-1580 (1990)。
- 6) Shimizu, K., Miyoshi, H., Kozu, T., Nagata, J., Enomoto, K., Maseki, N., Kaneko, Y. & Ohki, M.: Consistent disruption of the AML1 gene occurs within a single intron in the t (8; 21) chromosomal translocation. *Cancer Res.*, **52**, 6945-6948 (1992)。
- 7) Van Dekken, H., Pizzolo, J. G., Kelsen, D. P. & Melamed, M. R.: Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by in situ hybridization with a set of chromosome

- specific DNA probes. *Cancer*, **66**, 491-497 (1990).
- 8) Wolman, S. R.: Fluorescence in situ hybridization: a new tool for the pathologist. *Hum. Pathol.*, **25**, 586-590 (1994).
- 9) Waldman, F. M., Carroll, P. R., Kerschmann, R., Cohen, M. B., Field, F. G. & Mayall, B. H.: Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res.*, **51**, 3807-3813 (1991).
- 10) Poddighe, P. J., Ramaekers, F. C. S., Smeets, A. W. G. B., Vooijs G. P. & Hopman A. H. N.: Structural chromosome 1 aberrations in transitional cell carcinoma of the bladder: interphase cytogenetics combining a centromeric, telomeric, and library DNA probe. *Cancer Res.*, **52**, 4929-4934 (1992).
- 11) Hopman, A. H. N., Moesker, O., Smeets, A. W. G. B., Pauwels, R. P. E., Vooijs, G. P. & Ramaekers, F. C. S.: Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. *Cancer Res.*, **51**, 644-651 (1991).
- 12) Arnoldus, E. P. J., Noordermeer, I. A., Peters, A. C. B., Voormolen, J. H. C., Bots, G. T. A. M., Raap, A. K. & van der Ploeg, M.: Interphase cytogenetics of brain tumors. *Genes Chromosom. Cancer*, **3**, 101-107 (1991).
- 13) Steiner, M. G., Harlow, S. P., Colombo, E. & Bauer, K. D.: Chromosome 8, 12, and 17 copy number in Aster-coller stage C colon cancer in relation to proliferative activity and DNA ploidy. *Cancer Res.*, **53**, 681-686 (1993).
- 14) Delvilee, P., Thierry, R. F., Kievits, T., Kolluri, R., Hopman, A. H., Willard, H. F., Pearson, P. L. & Cornelisse, C. J.: Detection of chromosome aneuploidy in interphase nuclei from human primary breast tumors using chromosome specific repetitive DNA probes. *Cancer Res.*, **48**, 5825-5830 (1988).
- 15) Matsumura, K., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O., Chen, L., Smith, H. S., Pinkel, D., Gray, J. & Waldman, F. M.: Detection of chromosome 17p loci in breast cancer cells detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.*, **52**, 3474-3477 (1992).
- 16) Yoshimi, N., Shibuya, C., Morishita, Y., Tanaka, T. & Mori, H.: The numerical aberrations of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization in human breast cancers. *Acta Pathol. Jpn.*, **43**, 730-735 (1993).
- 17) Gibas, Z & Talerman, A.: Analysis of chromosome aneuploidy in ovarian dysgerminoma by flow cytometry and fluorescence in situ hybridization. *Diagn. Mol. Pathol.*, **2**, 50-56 (1993).
- 18) Taruscio, D., Carcangiu, M. L. & Ward, D. C.: Detection of trisomy of 12 on ovarian sex cord stromal tumors by fluorescence in situ hybridization. *Diagn. Mol. Pathol.*, **2**, 94-98 (1993).
- 19) Voravud, N., Shin, D. M., Ro, J. Y., Lee, J. S., Hong, W. K. & Hittelman, W. N.: Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head neck multistage tumorigenesis. *Cancer Res.*, **53**, 2874-2883 (1993).
- 20) Rao, P. H., Mathew, S., Lauwers, G., Rodriguez, E., Kelsen, E. P. & Caaganti, R. S. K.: Interphase cytogenetics of gastric and esophageal adenocarcinomas. *Diagn. Mol. Pathol.*, **2**, 264-268 (1993).
- 21) Visakorpi, T., Hyytinen, E., Kallioniemi, A., Isola, J. & Kallioniemi, O-P.: Sensitive detection of chromosome copy number aberrations in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Pathol.*, **145**, 624-630 (1994).
- 22) Levine, A. J., Momand, J. & Finlay, C. A.: The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **351**, 453-456 (1991).
- 23) Harris, C. C.: p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science*, **262**, 1980-1981 (1993).
- 24) Hartwell, L.: Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, **71**, 543-546 (1992).
- 25) Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V. & Kastan, M. B.: Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 7491-7495 (1992).
- 26) Lane, D. P.: p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-17 (1992).
- 27) Livingstone, L. R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T. & Tlsty, T. D.: Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*, **70**, 923-935 (1992).
- 28) Ullrich, S. J., Anderson, C. W., Mercer, W. E. & Appella, E.: The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J. Biol. Chem.*, **267**, 15259-15262 (1992).
- 29) Yin, Y., Tainsky, M. A., Bischoff, F. Z., Strong, L. C. & Wahl, G. M.: Wild-type p53' restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell*, **70**, 937-948 (1992).
- 30) Lu, X. & Lane, D. P.: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell*, **75**, 765-778 (1993).
- 31) Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolfe, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hofe, M., Kumlin, E. & White, R.: Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, **235**, 1616-1621 (1987).
- 32) Nakamura, Y., Ballard, L., Leppert, M., O'Connell, P., Lathrop, P. M., Lalouel, J. M. & White, R.: Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pYNZ22) on chromosome 17p [D17S30]. *Nucl. Acid Res.*, **16**, 5707 (1988).
- 33) Horn, G. T., Richards, B. & Klinger, K. W.: Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 2140 (1989).
- 34) Huang, Y., Boynton R. F., Blount, P. L., Silverstein, R. J., Yin, J., Tong, Y., McDaniel, T. K., Newkirk, C., Resau, J. H., Sridhara, R., Reid, B. J. & Meltzer, S. J.: Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor

- genes in human esophageal cancers. *Cancer Res.*, **52**, 6525-6530 (1992).
- 35) Parry, P. J., Markie, D., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Vogelstein, B. & Bodmer, W. F.: PCR-based detection of two MspI polymorphic sites at D18S8. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 6983 (1991).
- 36) Hedley, D. W., Friedlander, M. L., Taylor, I. W., Rugg, C. A. & Musgrove, E. A.: Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 1333-1335 (1983).
- 37) Naora, H.: Microspectrophotometry of cell nucleus stained by feulgen reaction. *Exp. Cell Res.*, **8**, 259-278 (1955).
- 38) Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577-580 (1981).
- 39) Ooi, A., Hayashi, H., Katsuda, S. & Nakanishi, I.: Gastric carcinoma cells with endocrine differentiation show no evidence of proliferations. *Hum. Pathol.*, **23**, 736-741 (1992).
- 40) Speel, E. J. M., Schutte, B., Ramaekers, F. C. S. & Hopman, A. H. N.: The effect of avidin-biotin interactions in detection system for in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 135-141 (1992).
- 41) Sauter, G., Deng, G., Moch, H., Kerschmann, R., Matsumura, K., De Vries, S., George, T., Fuentes, J., Carroll, P., Mihatsch, M. J. & Waldman, F. M.: Physical deletion of the p53 gene in bladder cancer. Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Pathol.*, **144**, 756-766 (1994).
- 42) Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.: Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. *Molecular Cloning*, 2nd. ed., vol 3, pE.1-E.39, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1987.
- 43) Oda, Y., Tanaka, M. & Nakanishi, I.: Relation between the occurrence of K-ras gene point mutations and genotypes of polynophic N-acetyltransferase in human colorectal carcinomas. *Carcinogenesis*, **15**, 1365-1369 (1994).
- 44) Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.: Random Oligonucleotide Primers for Synthesis of Uniformly Labeled DNA Probes. *Molecular Cloning*, 2nd. ed., vol 2, p13-17, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1987).
- 45) 長田 理: Macintosh-医学-統計マニュアル, 第1版, 235頁, 真興交易医書出版部, 東京, 1994.
- 46) Levine, A. J., Momand, J. & Finlay, C. A.: The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, **351**, 453-456 (1991).
- 47) Yandell, D. W. & Thor, A. D.: p53 analysis in diagnostic pathology. Biologic implications and possible clinical applications. *Diagn. Mol. Pathol.*, **2**, 1-3 (1993).
- 48) Saegusa, M., Takano, Y., Kishimoto, H., Wakabayashi, G., Nohga, K. & Okudaira M.: Comparative analysis of p53 and c-myc expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinomas-an enhanced immunohistochemical approach. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **119**, 737-744 (1993).
- 49) Haapasalo, H., Isola, J., Sallinen, P., Kalimo, H., Halin, H. & Rantala, I.: Aberrant p53 expression in astrocytic neoplasms of the brain: association with proliferation. *Am. J. Pathol.*, **142**, 1342-1351 (1993).
- 50) Ebina, M., Steinberg, S. M., Mulshine, J. L. & Linnoila, R. I.: Relationship of p53 overexpression and up-regulation of proliferating cell nuclear antigen with the clinical course of non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, **54**, 2496-2530 (1994).
- 51) Prines, J.: p21 inhibits cyclin shock. *Nature*, **369**, 520-521 (1994).
- 52) Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. & Stillman, B.: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinase controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, **369**, 574-578 (1994).
- 53) Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J. & Reed, S. I.: p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, **76**, 1013-1023 (1994).
- 54) Mendelsohn, M. L., Mayall, B. H., Bogart B., Moore, II, D. H. & Perry, B. H.: DNA content and DNA-based centromeric index of the 24 human chromosomes. *Science*, **179**, 1126-1129 (1973).
- 55) Muleris, M., Salmon, R. J., Zafrani, B., Girodet, J. & Dutrillaux, B.: Consistent deficiencies of chromosome 18 and of the short arm of chromosome 17 in eleven cases of human large bowel cancer a possible recessive determinism. *Ann. Génétique*, **28**, 206-213 (1985).
- 56) Couturier-Turpin, M. H., Couturier, D., Nepveux, P., Louvel, A., Chapuis, Y. & Guerre, J.: Human chromosome analysis in 24 cases of primary carcinoma of the large intestine: contribution of the G-banding technique. *Br. J. Cancer*, **46**, 856-869 (1982).
- 57) Reichmann, A., Martin, P. & Levin, B.: Chromosomal banding patterns in human large bowel cancer. *Int. J. Cancer*, **28**, 431-440 (1981).
- 58) Kern, S. E., Fearon, E. R., Tersmette, K. W. F., Enterline J. P., Leppert M., Nakamura, Y., White, R., Vogelstein, B. & Hamilton, S. R.: Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA.*, **261**, 3099-3103 (1989).
- 59) Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Wilson, 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).
- 60) Campo, E., de la Calle-Martin, O., Miquel, R., Palacin, A., Romero, M., Fabregat V., Vives, J., Cardesa, A. & Yague, J.: Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal

carcinomas. *Cancer Res.*, 51, 4436-4442 (1991).

- 61) Iino, H., Fukayama, M., Maeda, Y., Koike, M., Mori, T., Takahashi, T., Kikuchi, Y. R., Miyaki, M., Mizuno, S. & Watanabe, S.: Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. *Cancer*, 73, 1324-1331 (1994).
- 62) Cunningham, J., Lust, J. A., Schaid, D. J. Bren, G. D., Carpenter, H. A., Rizza, E., Kovach, J. S. & Thibodeau, S. N.: Expression of p53 and 17p allelic loss in colorectal carcinoma. *Cancer Res.*, 52, 1974-1980 (1992).
- 63) Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kem, S. E., Simons, J. W., Ruppert J. M., Hamilton, S. R.,

Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B.: Identification of a chromosome 18q gene that altered in colorectal cancers. *Science*, 247, 49-56 (1990).

64) Kikuchi-Yanoshita, R., Konishi, M., Fukunari, H., Tanaka, K. & Miyaki, M.: Loss of expression of the DCC gene during progression of colorectal carcinomas in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.*, 52, 3801-3803 (1992).

65) Micale, M. A., Visscher, D. W., Gulino, S. E. & Wolman, S. R.: Chromosomal aneuploidy in proliferative breast disease. *Hum. Pathol.*, 25, 29-35 (1994).

Chromosomal Anosomy of Colorectal Carcinoma Detected by FISH in Relation to p53 Overexpression and 17p and 18q Allelic Losses Huang Cheng-Dong, Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Juten Med Soc.*, 104, 283—293 (1995)

Key words chromosomal anosomy, FISH, allelic loss, p53 overexpression, colorectal carcinoma

Abstract

Abnormal total nuclear content of DNA (aneuploidy) as noticed in histological observation is a well known finding in colorectal carcinomas. In this study, first the hypothesis that aberration of tumor suppresser gene p53 induces chromosomal instability and consequently produce nuclear aneuploidy of colon cancer was challenged and then the DNA aneuploidy was analyzed in the viewpoint of chromosomal numerical changes using chromosome-specific probes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Furthermore the results were compared with the loss of heterozygosity of chromosome 17p13.3 and 18q21.3. It is known that point mutations of the tumor suppresser gene p53 result in the formation of abnormal mutant protein with a prolonged half-time. Using antibodies against p53 protein (RSP53 and CM-1), overexpression of p53 protein can be detected in 53.3% (32/60) of advanced colorectal carcinoma. The p53 overexpression was significantly correlated both with high proliferating activity determined by immunohistochemical proliferating cell nuclear antigen staining ($P<0.01$), and with aneuploidy measured with a combined microscope and TV image analysis system ($P<0.01$). For the numerical chromosome analysis, FISH was performed using chromosomes 7, 8, 10, 17 and 18-specific centromeric α satellite repeat DNA probes on 31 cases of nuclear smears freshly prepared from surgical specimens. All the numerical aberrations of chromosomes 7, 8 and 10 were polysomy with copy numbers ranging 3 to 6, and inter- and intra-tumoral heterogeneities were marked. One case showed monosomy of chromosome 17 and 18, and 6 cases had monosomies of chromosome 18. Associated deletion of 17p and 18q could be detected in the chromosome 17 monosomy, and in 3 of the chromosome 18 monosomies respectively by loss of heterozygosity of 17p13.3 and 18q21.3. It is suggested that the relatively frequent chromosome 18 monosomy may be a useful FISH marker in studying tumorigenesis and cancer progression of colorectal carcinomas.