

# 大腸腫瘍におけるK-ras遺伝子の点突然変異と腫瘍細胞増殖能に関する臨床病理学的研究

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: 田中, 松平 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8312">http://hdl.handle.net/2297/8312</a>

## 大腸腫瘍における K-ras 遺伝子の点突然変異と腫瘍細胞増殖能に関する臨床病理学的研究

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

田 中 松 平

(平成4年1月22日受付)

59症例の大腸腫瘍 (癌53病変, 腺腫21病変) についてポリメラーゼ・チェーン反応 (polymelase chain reaction, PCR) およびドットプロットハイブリダイゼーション法を用いて K-ras 癌遺伝子の12, 13および61コドンの点突然変異の有無を検索した。また抗増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)/サイクリン (cyclin) モノクローナル抗体 (19A2) を用いて組織学的に腫瘍細胞の標識率を算出し、腫瘍の増殖能を評価した。癌では42症例中12症例 (28.6%) に12コドンあるいは13コドンに点突然変異を、腺腫では15症例中3症例 (20.0%) に同じく12コドンあるいは13コドンに点突然変異を認められた。対照正常粘膜には点突然変異を認めなかった。PCNA/サイクリン標識率は癌、腺腫でそれぞれ $57.1 \pm 11.0\%$ ,  $55.0 \pm 10.0\%$ であった。これらの値は正常粘膜 ( $46.0 \pm 6.6\%$ ) に比べて有意に高かった ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ )。K-ras 点突然変異の有無と臨床病理学的な検討では、点突然変異陽性群は陰性群に比べて年齢が高く ( $p < 0.05$ )、また、静脈侵襲の頻度が高かった (5/12対1/30,  $p < 0.005$ )。癌における PCNA/サイクリン標識率と臨床病理学的検討では、左半結腸に発生した癌の標識率は他の部位に比べて有意に高かった ( $p < 0.05$ )。分化度の低下と間質への浸潤度の増加につれて PCNA/サイクリン標識率が高くなるという傾向がみられた ( $p < 0.05$ )。大腸癌においては、K-ras 点突然変異と PCNA/サイクリン標識率との間に統計学的な相関はなかった。むしろ、K-ras 点突然変異と静脈侵襲、細胞増殖活性と間質への浸潤、とそれぞれ別個の因子として癌の進展に関与しているものと思われ、これらは独立した予後因子になりうると考えられた。

**Key words** K-ras point mutation, proliferation rate, proliferating cell nuclear antigen/cyclin, clinicopathological analysis, colorectal cancer and adenoma

大腸癌は、現在までのところ、少なくとも3段階の進展過程を経て発生すると考えられている。すなわち、まず最初に大腸粘膜上皮の局所的な増生が起こり、小さな腺管腺腫が発生する。次いで、そのなかで強い異常増殖能を獲得した腺腫は増大し、異型性も増してくる。そして、最終的には、周囲組織への破壊・浸潤性増殖および遠隔転移といった癌の性格を有する腫瘍になるというものである (腺腫-癌相関)<sup>1,2)</sup>。最近、大腸癌発生過程における種々の遺伝子の異常に関する研究が急速に進行し、癌発生の分子機構が明らかにされつつある。なかでも癌遺伝子の一つである K-ras 遺伝子の点突然変異が高率に大腸癌で証明されて注目をあびた<sup>3-5)</sup>。この点突然変異は、癌発生過程の第2段階、すなわち腺腫の時期に生ずると報告されている<sup>4)</sup>。培養細胞へのヒト癌遺伝子の DNA の導入や動物実験などの ras 遺伝子産物に関する研究から、変異 ras 遺伝子によってコードされる変異 ras 蛋白は細胞増殖のシグナル伝達を促し、細胞の異常増殖を引き起こすことがわかっている<sup>6)</sup>。大腸腺腫における K-ras 遺伝子の変異は、腺腫の発育を促進し、癌発生に一役を担っていると考えられている<sup>7)</sup>。しかし、K-ras 遺

伝子の変異を生ずることにより、実際に大腸腫瘍のどの時期に、どの程度の細胞増殖率が増し、腫瘍の進展や生物学的態度に影響を与えるのかについての臨床医学における研究はなされてい

本研究では、大腸腫瘍における K-ras 遺伝子の点突然変異の有無と腫瘍細胞の増殖率に着目し、両者の関連について臨床病理学的事項を含めて解析し、さらに臨床的に予後決定因子となりうるかどうかを統計学的に検討した。

### 対象および方法

#### 1. 対 象

1990年6月から1991年4月までに小松市民病院外科、有松中央病院外科および石川済生会病院で経内視鏡的あるいは手術的に切除された大腸腫瘍59症例、74病変を対象とした (表1)。男性33例、女性26例で、腺腫21病変、早期大腸癌11病変、進行大腸癌42病変であった。腺腫および早期癌ともに平坦型あるいは陥凹型腫瘍はなかった。1症例に複数腫瘍を認めたものは K-ras 点突然変異を認めた症例を代表として選び、1症例1病

Abbreviations: ABC-Po, avidin-biotin complex-peroxidase; CV, coefficient of variance; E. V. G., elastica van Gieson; GAP, GTPase activating protein; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; H & E, hematoxylin and eosin; LI, labeling index; PBS, phosphate buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PCR, polymelase chain reaction; SLE, systemic lupus erythematosus

Table 1. The cases of colorectal carcinomas and adenomas examined

Sample (No.)	Age (yr)	Sex	Location	Length (cm)	Macro	Pathology	Depth	INF	by	v	n	P	H	M	Ras mutation	Codon	PCNA (%)	PCNA CV (%)	
Cancer																			
1T	81	Male	S	4.5	1	well diff.	M	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	+	12 GAT	failure	failure	
3T	57	Female	A	11	3	poorly diff.	S	$\gamma$	0	0	0	0	0	0	-		failure	failure	
4T	65	Female	S	2.2	IV	well diff.	SM	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		failure	failure	
7T	79	Female	A	6	3	well diff.	SS	$\gamma$	1	0	0	0	0	0	-		failure	failure	
8-1T	47	Male	R	3.3	1	well diff.	PM	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	-		52.2	23.2	
8-4T			S	2.5	2	mod. diff.	PM	$\beta$	1	0	0	0	0	0	-		51.1	15.3	
8-5T			S	19	2	well diff.	PM	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		51.9	15.4	
8-6T			S	1.8	III	well diff.	SM	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		63.4	10.7	
8-8T			C	4.1	3	mod. diff.	SS	$\gamma$	2	1	1	0	0	0	-		58.8	14.9	
9T	63	Male	C	8	2	well diff.	S	$\gamma$	1	0	1	1	0	0	-		failure	failure	
10T	50	Female	C	6	3	mucinous	S	$\gamma$	2	0	2	1	0	ovarium	-		failure	failure	
12T	74	Female	R	2.5	IV	well diff.	SM	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	-		failure	failure	
13T	61	Female	A	5.5	2	well diff.	S	$\beta$	1	0	0	0	0	0	-		failure	failure	
15-1T	61	Female	S	1.8	IV	well diff.	M	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	-		failure	failure	
16T	43	Male	R	4.7	2	well diff.	PM	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		lost	lost	
17-1T	71	Male	A	4.5	1	mod. diff.	A1	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	-		31.1	28.8	
17-3T			A	8.7	1	well diff.	A1	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		46.1	18.7	
18T	64	Male	R	3.3	2	mod. diff.	S	$\beta$	0	0	0	1	0	0	-		54.4	15.1	
20T	75	Male	A	8.2	2	well diff.	A2	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		52.6	16	
21T	52	Male	A	8	2	well diff.	A2	$\alpha$	1	0	0	0	0	0	-		36.5	12.3	
22T	79	Male	Ra	4.7	2	mod. diff.	SS	$\beta$	1	0	0	0	0	0	+	13 GTC	59.2	19.3	
23T	60	Male	A	4.6	2	well diff.	A1	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	-		57.6	13	
25T	51	Female	A	3.2	2	poorly diff.	SS	$\beta$	1	0	1	0	0	0	-		lost	lost	
27T	65	Male	S	0.8	III	well diff.	M	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	-		50	16	
28T	74	Female	S	2.8	1	well diff.	SM	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		53.3	12.7	
29T	66	Female	T	4.2	2	well diff.	SS	$\gamma$	1	1	0	0	0	0	+	12 GTT	73.4	22.6	
31T	70	Male	A	6	2	well diff.	SS	$\beta$	0	0	0	0	1	0	+	13 GAC	38.8	30.6	
32-1T	68	Male	S	12.5	2	well diff.	PM	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	+	13 AGC	53.8	22.7	
32-3T			D	2.8	2	well diff.	SS	$\beta$	2	0	0	0	0	0	+	13 GTC	73.6	15.3	
34T	79	Female	R	3.9	1	well diff.	SS	$\beta$	0	0	0	0	0	0	+	12 GAT	51	2.53	
35T	66	Female	S	4.5	2	mod. diff.	PM	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		65.5	23.1	
36-1T	75	Male	S	3.5	2	poorly diff.	SS	$\gamma$	0	0	0	0	0	0	-		52.9	20.6	
36-2T			S	2	2	mod. diff.	SS	$\beta$	1	0	1	0	0	0	-		55.4	26.9	
37T	75	Male	A	7.2	3	well diff.	SS	$\alpha$	0	1	0	0	3	0	+	12 GAT	48.8	27.7	
38T	62	Female	A	6	3	mod. diff.	SI	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	-		55.9	24.7	
43T	38	Female	D	3	3	well diff.	SS	$\beta$	1	0	0	0	0	0	-		59.3	18.9	
44-1T	78	Female	A	2	1	well diff.	M	$\alpha$	0	0	0	0	0	0	+	13 GAC	63.1	9.38	
44-2T			D	3.8	1	poorly diff.	PM	$\beta$	0	0	0	0	0	0	-		62.6	6.03	



変に単純化して統計学的処理を行った。次いで、複数病変を認めた症例を対象として、K-ras の点突然変異率と腫瘍細胞の増殖率の2項目に関して、単発の病変しか認めなかった症例に比べて異なる特徴を有するかどうかを検討した。

## II. 方 法

以下、特に会社名の記載のない試薬類は和光純薬工業株式会社(大阪)から購入した。

### 1. 新鮮切除標本の取り扱いと病理組織学的検索

新鮮切除標本の一部を、病理診断に支障のない程度で切除し、これを半割した。一方を液体窒素にて凍結し、DNA抽出用に $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。もう一方はメタカルン固定液(メタノール6, クロロホルム3, 酢酸1)にて固定し、後に述べる増殖率算定のための免疫染色用とした。対照の正常大腸粘膜に対しても同様な処理を行った。以上の実験材料を採取した後の標本は10%緩衝ホルマリンにて固定し、大腸癌取り扱い規約<sup>8)</sup>に従って、病理組織学的診断用に標本を切り出し、ヘマトキシリンとエオジン(hematoxylin and eosin, H & E)染色および、静脈侵襲の診断用にエラスチカ・ワンギーソン(elastica van Gieson, E. V. G.)染色を施した。

肉眼型および組織学的診断は大腸癌取り扱い規約<sup>8)</sup>に従った。浸潤増殖様式による分類は胃癌取り扱い規約<sup>9)</sup>に従って行った。

### 2. DNA 抽出

大腸腫瘍および正常粘膜からのDNA抽出はHerrman & Frislauf<sup>10)</sup>の方法に従った。すなわち、組織片0.06~1.8gをホモジナイズ用緩衝液(10mM Tris-HCl, 60mM NaCl, 10mM disodium ethylene diamine tetraacetate-2H<sub>2</sub>O, EDTA, 1mM ethylglycol-bis-N,N,N',N'-tetraacetic acid, EGTA, 0.5% Triton X-100, 150mM スペルミン, 150mM スペルミジン, pH 7.4) 2~15ml中にてホモジナイズしたものを4°Cで1500回転, 10分間遠心した。沈殿物をプロテアーゼK緩衝液(10mM Tris-HCl, 20mM NaCl, 25mM EDTA, 1% SDS, 500μg/ml プロテアーゼK, pH 7.5; プロテアーゼK, Boehringer Mannheim, F. R. G.)に浮遊させて, 50°Cで2時間, インキュベートした後, さらに一晩, 37°Cでインキュベートした。これにフェノール(1M Tris-HCl, pH 8にて飽和ずみ)を加え, 10分間振盪混和した後, 3000回転, 30分間遠心し, 上清のみを別試験管に移した。等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール(25:24:1)を加え, 10分間振盪混和, 3000回転, 30分間の遠心を繰り返す, また上清のみを別試験管に移した。これに等量のクロロホルム・イソアミルアルコール(24:1)を加え, 同様の抽出操作を繰り返した。次いで2.5倍量のエタノールを加え,  $-20^{\circ}\text{C}$ にて1時間保存し, 凝集した線維状物を別の試験管に移し, 半乾燥させた。これにプロテアーゼK緩衝液2mlを加え, 再び, 一晩, 37°Cにてインキュベートした。その後, RNase A (10mg/ml, Boehringer Mannheim)を加え, 37°Cで1時間, インキュベートした。再度, プロテアーゼKにて蛋白分解処理し, フェノール抽出を行い, エタノールにて凝集させDNAを抽出した。

3. ポリメラーゼ・チェーン反応 (polymelase chain reaction, PCR) およびドットプロットハイブリダイゼーションによる K-ras 遺伝子変異の検出

K-ras 遺伝子の12, 13および61コドンに関して点突然変異の有無を検索するために12, 13コドンと61コドンをそれぞれ含む111塩基配列に対して, PCR法<sup>11,12)</sup>を用いて特異的に増幅した。

各標本より抽出したDNA 0.5μgに一对の増幅用プライマー30pmolと, デオキシアデノシン三リン酸(deoxyadenosine-triphosphate, dATP), デオキシグアノシン三リン酸(deoxyguanosine-triphosphate, dGTP), デオキシチミジン三リン酸(deoxythymidine-triphosphate, dTTP), デオキシシチジン三リン酸(deoxycytidine-triphosphate, dCTP)を各10nmolおよびTaqポリメラーゼ(Perkin-Elmer Cetus, CA, USA) 2.5単位を反応緩衝液(100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%ゼラチン, pH 8.3)に加えて50μlとした。DNA Thermal Cycler(Perkin-Elmer Cetus)を使用して, 変性を96°C, アニリングを56°C, DNAの合成伸長を74°Cで行い, これを1サイクルとして40サイクル行った。PCRの試薬はClontech社(CA, USA)製 onco-lyzer PCR core kitおよびpri-mate amplimer setを使用した。PCR後, 9μlを2%アガロースゲルにて電気泳動し, 紫外線照射による111塩基の長さを持つ蛍光バンドを確認した後, 20μlをドットプロットハイブリダイゼーション用に使用した。

増幅したDNAをニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell, NY, USA)上にMinifold II(Schleicher & Schuell)を使用してスロットし, 80°Cで, 2時間, ベイキングし固定した。K-ras 遺伝子の第12, 13, 61の各コドンに関して点突然変異を生じた場合に起こりうる正常型アミノ酸以外の塩基配列は第12, 13コドンではそれぞれ6種類で, 第61コドンでは7種類存在するため, 第12コドンに対して7枚, 第13コドンに対して7枚, 第61コドンに対して8枚のニトロセルロース膜に増幅DNAを全例スロットした。また正常型を含めて計22種類のプローブを使用してドットプロットハイブリダイゼーションを施行した。ハイブリダイゼーションに際してClontech社製muta-lyzer oligonucleotide probe panelを使用し, Clontech社のプロトコールに従い, アイソトープ<sup>32</sup>Pで標識した各プローブの濃度を $1 \times 10^6$ cpm/mlに調節してハイブリダイゼーションを42°Cで一晩行った。洗浄は3M塩化テトラメチルアンモニウムを用いて63°C, 20分を2回行った。オートラジオグラムは増感紙を使用し, 1時間の露光で行った。

4. 抗ヒト増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)/サイクリン(cyclin)抗体(19A2)を用いた免疫組織化学

抗ヒトPCNA/サイクリンマウスIgM抗体(19A2)はAmerican Biotech(Plantation, FL, USA)製を使用した。免疫染色はGownら<sup>13)</sup>の方法に従い, avidin-biotin complex-peroxidase(ABC-Po)法にて行った。メタカルン固定, パラフィン包埋切片を脱パラ, アルコール系列において脱水し, 0.1%アザイドの入った0.1%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼのブロックを行った後, 非特異的応答を抑制するために, 10倍希釈のヤギ正常血清を30分, 室温にて反応させた。一次抗体として8000倍希釈の19A2を4°Cにて一晩反応させた後, 二次抗体として400倍希釈のビオチン化抗マウスヤギIgM抗体(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)を30分, 室温にて反応させた。次いで, ABC-Po(Vector Laboratories, Burlingame)を30分反応させた。各反応の後に冷0.05Mリン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline, PBS)にて10分間, 3回の洗浄を行った。発色は0.05M Tris緩衝液(pH 8.0)にジアミノベンチジンを溶解したものに過酸化水素水を加えて行った。今回, 白黒写真で撮影しても陽性細胞が判定できるように

Hsu らの方法<sup>14)</sup>に従い、ジアミノベンチジン反応液に塩化ニッケルを加えてニッケル増感を行った。核染色はメチルグリーンにて行った。

#### 5. PCNA/サイクリン標識率の算出

PCNA/サイクリン免疫染色陽性の核は均一にあるいは斑状、核小体は黒褐色に染まった。染色態度は各標本によって異なり、同一標本上でも染色される濃度に濃淡のバラツキが認められたので、濃淡に関係なく弱陽性を含め陽性と判定して陽性細胞を数えた。腺腫および癌の PCNA/サイクリン標識率は 5 視野を 50 倍で白黒フィルムに撮影し、5 倍に焼き付けた写真で、陽性腫瘍細胞数/総腫瘍細胞数 (%) を算出した。5 視野の

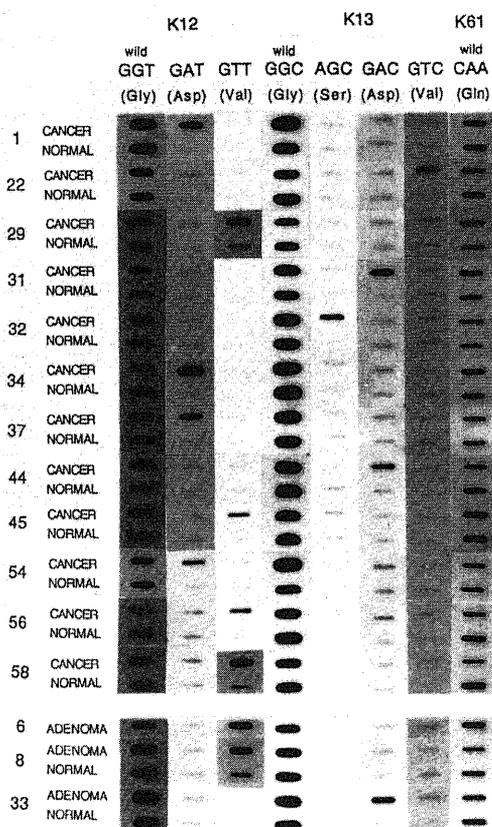


Fig. 1. Panel of point mutations in codon 12, 13 and 61 of the K-ras oncogene (K12, K13 and K61) in colorectal cancers and adenomas. One hundred thirteen amplified DNA fragments are dotted onto two different membranes, and each membrane is hybridized to 22 kinds of oligonucleotide probes. The numbers on the left side are case number. Each pair of tumor DNA and normal mucosa DNA except for case 6 is tested. Positive signals of samples are detected by the oligonucleotide probes corresponding to the wild type sequence GGT (all samples showed positive signals); the mutated GAT sequence, four positive cases (Patients 1, 34, 37, and 54); the mutated GTT sequence, six positive cases (Patients 6, 8, 29, 45, 56, and 58) of K12; the wild type sequence GGC (all samples showed positive signals); the mutated AGC sequence, one positive case (Patient 32); the mutated GAC sequence, three positive cases (Patients 31, 33, and 44); the mutated GTC sequence, one positive case (Patient 22) of K13; the wild type sequence CAA (all cases showed positive signals) of K61, respectively.

選び方は顕微鏡のテーブル上の定規を利用して、標本上に m 行 n 列の格子を想定し、乱数表を使用して無作為に 5 視野を抽出した。ただし抽出した視野に 50% 以上腫瘍細胞がない場合や標本作成上の人工的破損や腫瘍壊死がみられた場合はこの視野を除外し、良好な視野が得られるまで抽出作業を続けた。なお血管内の好中球は常に陰性であった。正常粘膜では腺管が縦断されているものを 5 腺管選び、同様に標識率を算出した。

#### 6. 統計学的解析

得られた計算値は全て平均値±標準偏差 (standard deviation, SD) にて表記した。癌、腺腫、正常粘膜の 3 群間の平均値の差の検定には Bartlett 検定を行い、等分散の場合、1 元配置分散分析法を用い、異分散の場合、Kruskal-Wallis' one way analysis of variance with Hollander-Wolfe's multiple comparison を用いた。臨床病理学的諸因子として、年齢、性別、腫瘍占拠部位、腫瘍最大径、腫瘍の肉眼的分類、大腸癌の進行程度、組織学的分類、組織学的深達度、癌の浸潤増殖様式、組織学的リンパ管侵襲、組織学的静脈侵襲、組織学的リンパ節転移、肝転移、腹膜転移、その他の臓器転移を対象とした。各項目毎に、連続量に対しては Scheffé's multiple 検定を、離散量に対しては  $\chi^2$  検定または Fisher 直接確率計算法を行い、K-ras 点突然変異陽性群と陰性群とを比較した。臨床病理学的因子の各項目毎に 2 群あるいは数群に分け、それぞれの PCNA/サイクリン標識率を算出し各項目で差が生じるかどうかを検討した。

PCNA/サイクリン標識率における、癌、腺腫、正常粘膜の 3 群間の標識率のバラツキ度を検討するために F 値 ( $F = SD_1^2 / SD_2^2$ , ただし  $SD_1 > SD_2$  とする) を計算し、F 検定を行った。さらに同一標本における 5 視野間の標識率のバラツキ度を数値化するために変動係数 (coefficient of variance, CV) ( $CV = 100 \times SD / \text{平均値}$ ) を求め、癌、腺腫、正常粘膜の 3 群間で差が生じるかどうかを検討した。

検定は両側検定で行い、有意水準を 5% とした。

#### 成 績

##### I. K-ras 遺伝子の第 12, 13 および 61 コドンの点突然変異

K-ras 遺伝子の点突然変異を検索し得た大腸癌 42 例中 12 例、28.6% に点突然変異を認めた。腺腫に関しては 15 例中 3 例、20.0% に点突然変異を認めた (図 1)。その内訳は、第 12 コドンに関しては、癌 8 症例、腺腫 2 症例の計 10 症例に、第 13 コドンに関しては、癌 4 症例、腺腫 1 症例の計 5 症例に点突然変異を認めた。第 61 コドンに関しては点突然変異は認めなかった。点突然変異の認められた症例では、コドンの GG 対の 2 番目の G が A に変化している G-A トランジションが 15 症例中 7 症例、46.7% に認められた。正常粘膜で点突然変異を認めたものはなかった。

##### II. PCNA/サイクリン標識率

###### 1. 正常大腸粘膜

各症例において数えた総細胞数は 554 個から 1839 個であった。正常腺管では PCNA/サイクリン陽性細胞が下 2/3 に分布し、下 1/3 が強く染色され中 1/3 では染色性が薄くなるという規則性が認められた (図 2)。正常大腸粘膜の平均 PCNA/サイクリン標識率は  $45.9 \pm 6.6\%$  であった。また、正常粘膜の CV 値は  $12.4 \pm 4.5\%$  であった (表 2)。

###### 2. 癌

各症例において癌細胞を、4196 個から 8935 個数えた。核にお

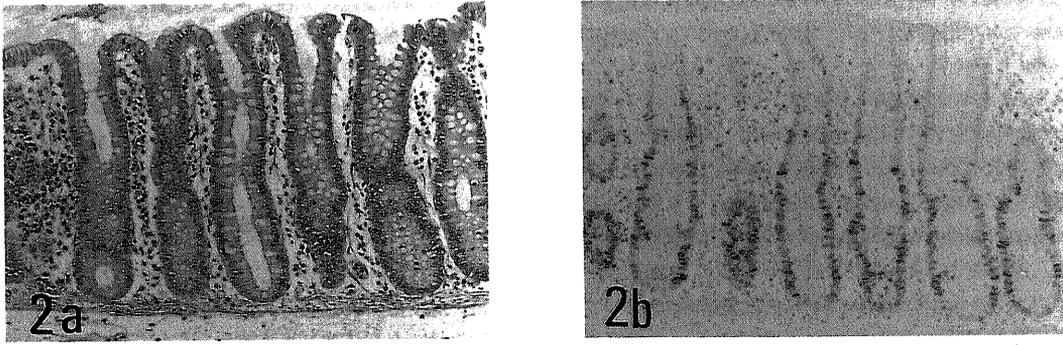


Fig. 2. Two adjacent sections of normal colon mucosa stained with H & E (a) and immunostained for PCNA/cyclin (b). The positive staining for PCNA/cyclin is restricted to the cell nucleus in the lower and middle thirds of the crypt. In the lower third of the crypt there are more PCNA/cyclin-positive cells in number which are denser than in the middle third of the crypt (counterstained with methyl green,  $\times 50$ ).

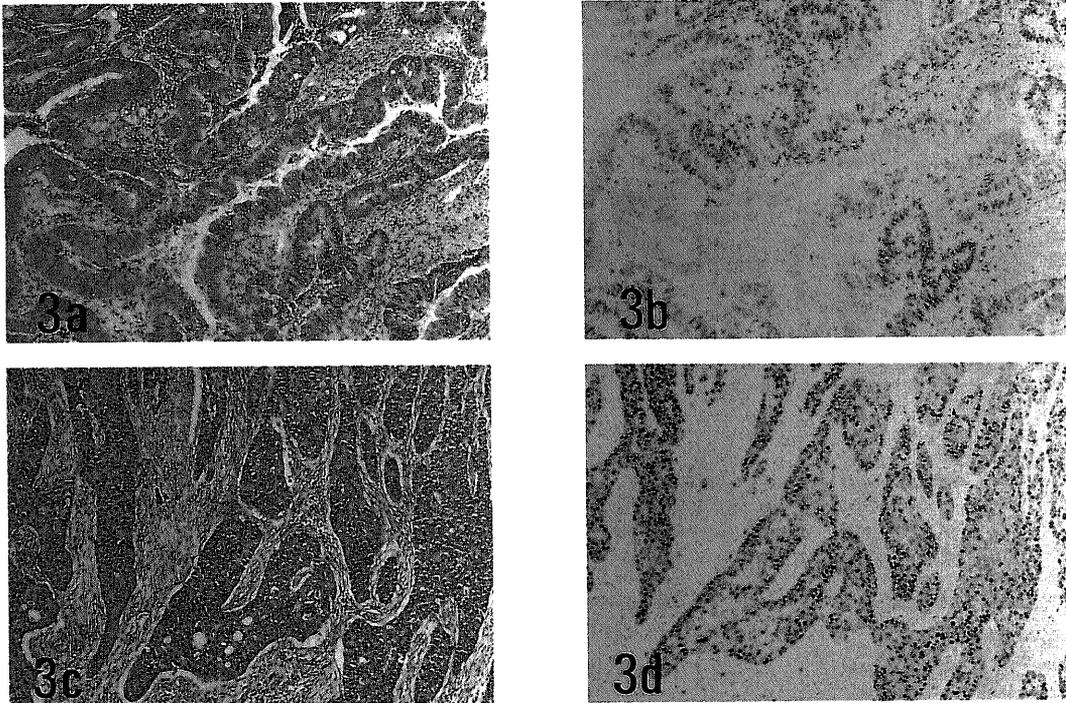


Fig. 3. H & E (a, c) and immunoperoxidase (b, d) stainings of colorectal carcinomas for PCNA/cyclin using monoclonal antigen 19A2. Immunoreactive (dark brown in the figures) and unstained (light green) nuclei can be easily identified. H & E-stained section (a) of a well-differentiated adenocarcinoma, with corresponding PCNA/cyclin immunolocalization (b), demonstrating irregular distribution of reactive cell nucleus group ( $\times 25$ ). H & E-stained section (c) of a poorly-differentiated adenocarcinoma, with corresponding PCNA/cyclin immunolocalization (d) demonstrating a tumor with a high proliferative grade ( $\times 25$ ).

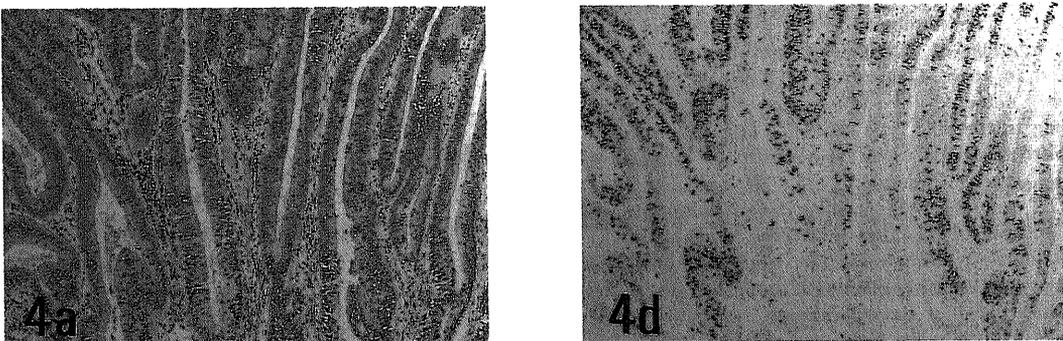


Fig. 4. Two adjacent sections of tubular adenoma with moderate atypia stained with H & E (a) and immunostained for PCNA/cyclin (d), demonstrating relatively regular distribution of reactive cell nuclei ( $\times 25$ ).

ける PCNA/サイクリンの染色性は一様でなく、その分布も正常腺管でみられた規則性は失われていた。腫瘍-正常粘膜の境界部や最深部など場所による PCNA/サイクリン標識率に差はみられなかった (図 3)。PCNA/サイクリン標識率は 57.1% であった。癌の PCNA/サイクリン標識率は正常粘膜のそれと比較して有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。その範囲は 31.1% から 76.4% で、SD も 11.0% とバラツキが大きかった。正常粘膜と比較して癌の PCNA/サイクリン標識率はバラツキが大きかった ( $F = 2.77$ ,  $p < 0.05$ )。癌の CV 値は  $17.5 \pm 7.4\%$  で正常粘膜と比較して 5 視野間のバラツキが大きかった ( $p < 0.01$ ) (表 2)。

Table 2. Statistical analysis of PCNA/cyclin-positive cell incidence between cancer, adenoma and normal mucosa

		L.I.(%)		
Cancer	(n=32)	57.1±11.0	] NS* ] p<0.05* ]	p<0.01*
Adenoma	(n=12)	55.0±10.0		
Normal mucosa	(n=34)	46.0±6.6		
		F value		
Cancer-normal mucosa		2.77	p<0.05 †	
Adenoma-normal mucosa		2.27	NS †	
Cancer-adenoma		1.22	NS †	
		CV(%)		
Cancer		17.5±7.4	] NS* ] NS* ]	p<0.01*
Adenoma		16.8±5.4		
Normal mucosa		12.4±4.5		

\* Kruskal-Wallis' one way analysis of variance with Hollander-Wolfe's multiple comparison  
† variance ratio test (F test)

### 3. 腺腫

腺腫の染色態度は癌と比較して明らかな差は認めなかったが、PCNA/サイクリンで染色される核が均等に配置する傾向があった (図 4)。腺腫の PCNA/サイクリン標識率は  $55.0 \pm 10.0\%$  であった。この数値は癌と正常粘膜の間に位置し、腺腫の PCNA/サイクリン標識率と正常粘膜の PCNA/サイクリン標識率の間には統計学的な有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。しかしながら、腺腫の PCNA/サイクリン標識率と癌の PCNA/サイクリン標識率の間には  $p = 0.092$  と統計学的有意差は生じなかった。腺腫と正常粘膜の F 値は 2.27 で有意差はなく、腺腫と正常粘膜の間にはバラツキ具合で差は認められなかった。腺腫と癌の F 値は 1.22 で有意差はなく、腺腫と癌の間には変動係数に関して差は生じなかった (表 2)。

### Ⅲ. K-ras 点突然変異の臨床病理学的因子に関する検討

乳頭管状腺癌 42 症例および 15 腺腫 (絨毛状腺腫 1 症例、管状腺腫 14 症例) を対象として臨床病理学的諸因子に関して検討した。

#### 1. 大腸癌 (表 3A)

年齢に関して K-ras 点突然変異陽性群は  $72.9 \pm 7.6$  歳であるのに対して、K-ras 点突然変異陰性群は  $64.6 \pm 15.5$  歳であり、点突然変異陽性癌は有意に年齢が高かった ( $p < 0.01$ )。

病期による分類に関して明らかな統計学的有意差は認めなかったが、病期が進行するに従って K-ras 遺伝子の点突然変異率が高くなる傾向がみられた。点突然変異のある症例に組織学的静脈侵襲をみる事が多く、点突然変異の有無と組織学的静脈侵襲の有無との 2 因子に関して  $p < 0.005$  と統計学的有意差を認めた。その他の臨床病理学的因子と K-ras 点突然変異の有無との間に統計学的有意差は認められなかった。

#### 2. 腺腫 (表 3B)

Table 3A. Correlation between K-ras point mutation and clinicopathological characteristics in 42 cancer cases

		ras Mutations	No ras Mutations	P value
Age (mean, yr)		72.9±7.6	64.6±15.5	p<0.01*
Sex (male : female)		7 : 5	13 : 17	NS†
Location (Rt : Lt)		5 : 7	12 : 18	NS†
Tumor size (mean, cm)		5.5±2.6	4.4±2.3	NS*
Macroscopic feature (elevated : ulcerated)		3 : 9	10 : 20	NS†
Tumor stage	(No. of cases)			
I	14	3	11	
II	16	4	12	
III	6	2	4	
IV	0	0	0	
V	6	3	3	
Tumor differentiation	(No. of cases)			NS†
Poorly differentiated	4	0	4	
Moderately differentiated	13	5	8	
Well differentiated	24	7	17	
Depth of invasion (≤SM : ≥PM)		2 : 10	8 : 22	NS†
INF (α : β+γ)		4 : 8	10 : 20	NS†
ly (present : absent)		5 : 7	10 : 20	NS†
v (present : absent)		5 : 7	1 : 29	p<0.005†
n (present : absent)		3 : 9	5 : 25	NS†
Metastases (present : absent)		2 : 10	0 : 30	

Table 3B. Correlation between K-ras point mutation and clinicopathological characteristics in 15 adenoma cases

		ras Mutations	No ras Mutations	P value
Age at operation (mean, yr)		54.3±7.5	57.8±14.4	NS*
Sex (male: female)		3:0	9:3	
Location (Rt: Lt)		0:3	1:11	
Length (mean, cm)		1.9±2.2	1.3±0.6	NS*
Histology	(No. of cases)			
Villous adenoma	1	0	1	
Tubular adenoma with severe atypia	3	1	2	
Tubular adenoma with moderate atypia	5	0	5	
Tubular adenoma with mild atypia	6	2	4	

NS, not significant; SM, submucosa; PM, muscularis propria; Stage grouping according to Japanese research society for cancer of colon and rectum; INF, infiltrative growth at periphery of the tumor, classification according to Japanese research society for gastric cancer;  $\alpha$ , expanding type;  $\beta$ , intermediate type;  $\gamma$ , infiltrating type; ly, histological lymphoid invasion; v, histological vascular invasion; n, histological metastasis of lymph node

\* Scheffés multiple test

† Chi-square test

‡ Fisher's exact probability test

K-ras 点突然変異の有無と臨床病理学的諸因子との間に相関はなかった。

#### IV. PCNA/サイクリン標識率の各臨床病理学的項目における解析 (表 4)

##### 1. 癌

癌の占拠部位で右半結腸と左半結腸の2群に分けたところ、前者の PCNA/サイクリン標識率が  $51.9 \pm 12.5\%$  であるのに対して、後者の PCNA/サイクリン標識率は  $59.9 \pm 9.3\%$  と左半結腸癌の PCNA/サイクリン標識率が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。腫瘍長径の中央値、4.5cm を境に2群に分けたところ、4.5cm 未満の群の CV 値は  $13.5 \pm 7.1\%$  で、4.5cm 以上の群の CV 値は  $21.5 \pm 5.7\%$  であった。腫瘍径が 4.5cm 以上の群は5視野で PCNA/サイクリン標識率のバラツキが腫瘍径 4.5cm 未満の群に比べて大きくなるという傾向が認められた ( $p < 0.005$ )。

病理組織学的には、腫瘍の分化度が低くなればなるほど PCNA/サイクリン標識率が高くなるという傾向が認められた ( $p < 0.05$ )。深達度に関して粘膜下層以内にとどまっていた症例と固有筋層以下に浸潤していた症例の2群に分けて検討したところ、統計学的な有意差は生じなかったもの ( $p = 0.053$ )、CV 値に関して粘膜下層以内にとどまっている癌は  $12.3 \pm 3.7\%$  であるのに対して、固有筋層以下に浸潤している癌は  $18.8 \pm 7.5\%$  と、後者の CV 値が比較的高く、腫瘍が大きくなると核酸合成期前後にある細胞の分布にムラが生じる可能性が考えられた。癌の浸潤増殖様式による分類における PCNA/サイクリン標識率の検討では、癌巢が浸潤性の増殖を示すほど PCNA/サイクリン標識率がより高くなるという傾向がみられた ( $p < 0.05$ )。

##### 2. 腺腫

PCNA/サイクリン標識率と臨床病理学的諸因子との間に相関はなかった。

##### 3. 正常大腸粘膜

採取した部位で右半結腸と左半結腸に分けて検討したところ、CV 値に関して、前者が  $10.1 \pm 3.8\%$  であったのに対して、

後者は  $13.6 \pm 4.5\%$  と、左半結腸に位置した粘膜の方が5視野間の核酸合成期前後の細胞数にバラツキが認められた ( $p < 0.05$ )。

#### V. K-ras 遺伝子における点突然変異の有無と PCNA/サイクリン標識率との相関

##### 1. 癌

K-ras 遺伝子における点突然変異陽性群の PCNA/サイクリン標識率は  $57.6 \pm 9.2\%$  であるのに対して、点突然変異陰性群の PCNA/サイクリン標識率は  $57.8 \pm 13.0\%$  であった。K-ras 遺伝子における点突然変異陽性群の標識率と陰性群の標識率との間に有意差を認めなかった。また、F 値、CV 値の検討でも有意差は認めなかった (表 5)。

K-ras 遺伝子における点突然変異の有無に関する検索と PCNA/サイクリン標識率の算出の両方が施行できた31腺癌を対象として、組織学的静脈侵襲に関する検討を行った。K-ras 遺伝子における点突然変異を有する11症例中5症例 (45.5%) に組織学的静脈侵襲を認めたのに対して、K-ras 遺伝子における点突然変異を認めなかった20症例では組織学的静脈侵襲は1症例にしか認めなかった (5.0%)。

組織学的静脈侵襲を認めた癌 (31症例中6症例, 19.4%) の PCNA/サイクリン標識率は  $61.7 \pm 8.9\%$  であった。一方、組織学的静脈侵襲を認めなかった症例 (31症例中26症例, 80.6%) の PCNA/サイクリン標識率は  $54.3 \pm 8.7\%$  と組織学的静脈侵襲陽性癌が PCNA/サイクリン標識率が高い傾向にあったが、統計学的な有意差は生じなかった (Scheffés multiple test,  $p = 0.194$ )。

##### 2. 腺腫

11腺管腺腫のうち K-ras 遺伝子における点突然変異陽性症例は2症例で、PCNA/サイクリン標識率は  $52.8 \pm 8.9\%$  であった。K-ras 遺伝子における点突然変異陰性症例は9症例で PCNA/サイクリン標識率は  $49.6 \pm 8.2\%$  であった。この2群の PCNA/サイクリン標識率の間には統計学的有意差は認められなかった。また、F 値、CV 値に関する検討においても有意差は認められなかった (表 5)。

VI. 大腸腫瘍複数症例の検討

同時に癌あるいは腺腫が発見された7症例から、22病変を採取し、K-ras 遺伝子における点突然変異と PCNA/サイクリン標識率との検索を行った。表6にその一覧を示す。複数の大腸腫瘍を認めた症例における検討では、7症例中3症例、42.9%に K-ras 遺伝子における点突然変異が認められたのに対して、単発大腸腫瘍症例では51症例中12症例、23.5%に K-ras 遺伝子の点突然変異を認めたにすぎなかった。しかし、大腸腫瘍同時多発症例の例数が少く、統計学的有意差を認めるには至らなかった。PCNA/サイクリン標識率に関しては多発症例、単発

症例の間に統計学的有意差を認めなかった。

考 察

Ras 遺伝子は現在までヒトでは H-ras, K-ras, N-ras と名付けられた3種類が発見されている。その産物 (p21) は分子量約 21,000で細胞膜の細胞質側に局在する<sup>15)</sup>。ras 蛋白はグアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate, GTP) 結合蛋白をコードし、この蛋白は細胞の増殖および分化に関与することが知られている<sup>16)</sup>。大腸癌の K-ras 遺伝子の点突然変異は欧米では40%以上の頻度<sup>21,22)</sup>で起こり、特に ras 遺伝子の活性化は第12, 13,

Table 4. Correlation between PCNA/cyclin and clinicopathological variables

	No. of cases (%)	L.I. (%)	P value	F value	P value	CV (%)	P value
32 cancer cases							
Age (yr)							
<67	16 (50)	60.5±10.4	NS*	1.10	NS†	16.0±6.5	NS*
≥67	16 (50)	53.8±10.9				19.0±8.1	
Sex							
Male	17 (53.1)	54.4±11.7	NS*	1.46	NS†	19.4±6.8	NS*
Female	15 (46.9)	60.2±9.7				15.4±7.7	
Location							
Rt	11 (34.4)	51.9±12.5	p<0.05*	1.79	NS†	21.0±7.3	NS*
Lt	21 (65.6)	59.9±9.3				15.7±6.9	
Tumor size (cm)							
<4.5	15 (46.9)	60.7±11.2	NS*	1.25	NS†	13.5±7.1	p<0.005*
≥4.5	17 (53.1)	54.0±10.0				21.1±5.7	
Macroscopic feature							
elevated	9 (28.1)	54.5±14.3	NS*	2.23	NS†	14.5±8.4	NS*
ulcerated	23 (71.9)	58.2±9.6				18.7±6.8	
Tumor stage							
I	9 (28.1)	58.8±11.4	rs=-0.1192			13.8±6.4	rs=0.431
II	15 (46.9)	56.7±12.3	NS†			17.4±7.9	NS†
III	4 (12.5)	61.6±4.6				20.3±4.1	
IV	0 (0)						
V	4 (12.5)	50.5±8.9				23.5±7.0	
Tumor differentiation							
well diff.	17 (53.1)	55.2±11.4	rs=0.336			16.0±7.8	rs=0.284
moderately diff.	13 (40.6)	60.2±11.1	p<0.05†			20.4±5.7	NS†
poorly diff.	2 (6.3)	53.8±1.2				12.6±11.3	
Depth of invasion							
≤SM	6 (18.8)	59.2±13.7	NS*	1.70	NS†	12.3±3.7	NS (p=0.053)*
≥PM	26 (81.2)	56.7±10.5				18.8±7.5	
INF							
α	12 (37.5)	51.9±11.8	rs=0.373			51.9±11.8	rs=0.129
β	16 (50.0)	59.7±9.8	p<0.05†			59.7±9.8	NS†
γ	4 (12.5)	62.7±8.7				62.7±8.7	
ly							
present	10 (31.3)	58.9±9.6	NS*	1.49	NS†	18.0±5.9	NS*
absent	22 (68.7)	56.3±11.7				17.4±8.1	
v							
present	6 (18.8)	60.5±8.5	NS*	1.85	NS†	19.2±7.8	NS*
absent	26 (81.2)	56.4±11.5				17.2±7.4	
n							
present	5 (15.6)	61.2±4.1	NS*	8.34	NS†	20.4±3.5	NS*
absent	27 (84.4)	56.4±11.7				17.0±7.8	
Metastases							
present	4 (12.5)	50.4±9.0	NS*	1.52	NS†	23.5±7.0	NS*
absent	28 (87.5)	58.1±11.1				16.7±7.2	

## 12 adenoma cases

Age (yr)								
<56	6 (50)	52.7±10.0	NS*	1.05	NS†	15.8±7.0	NS*	
≥56	6 (50)	57.2±10.3				17.8±3.6		
Sex								
Male	9 (75)	53.6±8.5	NS*	3.03	NS†	16.2±5.9	NS*	
Female	3 (25)	59.2±14.8				18.5±3.8		
Location								
Rt	1 (8.3)	43.2				17.5		
Lt	11 (91.7)	56.0±9.7				16.7±5.7		
Tumor size (cm)								
<1.0	5 (41.7)	54.4±10.4	NS*	1.00	NS†	17.1±7.6	NS*	
≤1.0	7 (58.3)	55.4±10.4				16.5±3.9		
Macroscopic feature								
sessile	6 (50)	54.5±9.5	NS*	1.42	NS†	16.6±7.2	NS*	
peduncled	6 (50)	55.4±11.3				16.9±3.6		
Degree of atypia								
mild	6 (50)	52.1±13.1	rs=0.017			17.5±7.7	rs=-0.080	
moderate	3 (25)	52.9±6.5	NS†			17.1±2.6	NS†	
severe	3 (25)	50.3±4.9				17.9±9.9		

## 44 normal mucosas

Age (yr)								
<66	15 (44.1)	45.2±6.8	NS*	1.09	NS†	11.8±4.5	NS*	
≥66	19 (55.9)	46.5±6.6				13.0±4.6		
Sex								
Male	19 (55.9)	54.4±11.7	NS*	1.46	NS†	19.4±6.8	NS*	
Female	15 (44.1)	60.2±9.7				15.4±7.7		
Location								
Rt	11 (32.4)	47.1±6.7	NS*	1.79	NS†	10.1±3.8	p<0.05*	
Lt	23 (67.6)	45.4±6.7				13.6±4.5		

NS, not significant; SM, submucosa; PM, muscularis propria; Stage-grouping according to Japanese research society for cancer of colon and rectum; INF, infiltrative growth at periphery of the tumor, classification according to Japanese research society for gastric cancer;  $\alpha$ , expanding type;  $\beta$ , intermediate type;  $\gamma$ , infiltrating type; ly, histological lymphoid invasion; v, histological vascular invasion; n, histological metastasis of lymph node; rs, Spearman's rank correlation

\* Scheffé's Student t test

† variance ratio test

‡ Spearman's rank correlation test

Table 5. Statistic analysis of PCNA/cyclin labeling indices of K-ras point mutation positive and negative tumors

Cancer	No. of cases (%)	L.I. (%)	P value
ras mutation	11 (35.5)	57.6±9.2	NS*
no ras mutation	20 (64.5)	57.8±13.0	
		F value	P value
		1.99	NS†
		CV (%)	P value
		20.3±8.2	NS*
		16.7±6.3	
Adenoma	No. of cases (%)	L.I. (%)	P value
ras mutation	2 (18.2)	52.8±8.9	NS*
no ras mutation	9 (81.8)	49.6±8.2	
		F value	P value
		1.18	NS†
		CV (%)	P value
		13.6±1.1	NS*
		19.4±6.8	

\* Scheffé's Student t test

† variance ratio test

Table 6. The cases of multiple colorectal tumors

Sample	Age (yr)	Sex	Location	Length (cm)	Macro	Histology	Depth	INF	ly	v	n	P	H	Ras mutation	Codon	PCNA (%)	PCNA CV (%)	
8-1T	47	Male	R	3.3	1	well diff.	PM	$\alpha$	0	0	0	0	0	-		52.2	23.2	
8-2T			R	1.2	III	tub I								+	12 GTT	59.1	14.4	
8-3T			R	0.8	III	tub I								+	13 GAC	64.2	18.1	
8-4T			S	2.5	2	mod. diff.	PM	$\beta$	1	0	0	0	0	-		51.1	15.3	
8-5T			S	19	2	well diff.	PM	$\beta$	0	0	0	0	0	-		51.9	15.4	
8-6T			S	1.8	III	well diff.	SM	$\beta$	0	0	0	0	0	-		63.4	10.7	
8-7T			T	1.2	IV	tub I								-		64.8	13.5	
8-8T			A	4.1	3	mod. diff.	SS	$\gamma$	2	1	1	0	0	-		58.8	14.9	
8-9T			A	1.2	III	tub I								+	13 TGT	46.4	16.6	
8-10N			T											-		52.1	10.6	
15-1T*	61	Female	S	1.8	IV	well diff.	M	$\alpha$	0	0	0	0	0	-		failure	31.1	28.8
17-1T	71	Male	A	4.5	1	mod. diff.	A1	$\alpha$	0	0	0	0	0	-		no sample	40.1	15.5
17-1N			A											-		31	11.2	
17-2T			A	1.1	III	tub II								-		46.7	24.8	
17-2N			A											-		46.1	18.7	
17-3T			A	8.7	1	well diff.	A1	$\beta$	0	0	0	0	0	-		42.1	16.3	
17-3N			A											-		53.8	22.7	
32-1T	68	Male	S	12.5	2	well diff.	PM	$\alpha$	0	0	0	0	0	+	13 AGC	56.7	8.48	
32-1N			S											-		73.6	15.3	
32-3T			D	2.8	2	well diff.	SS	$\beta$	2	0	0	0	0	+	13 GTC	59.4	17.5	
32-3N			D											-		52.9	20.6	
36-1T	75	Male	S	3.5	2	poorly diff.	SS	$\gamma$	0	0	0	0	0	-		38.9	17.2	
36-1N			S											-		55.4	26.9	
36-2T			S	2	2	mod. diff.	SS	$\beta$	1	0	1	0	0	-		56.5	8.53	
36-2N			S											-		60.3	19.1	
41-1T	65	Male	S	1.1	IV	tub II								-		failure	63.1	9.38
41-2T			S	0.5	III	tub I								-		62.6	6.03	
44-1T	78	Female	A	2	1	well diff.	M	$\alpha$	0	0	0	0	0	+	13 GAC	70.6	9.21	
44-2T			D	3.8	1	poorly diff.	PM	$\beta$	0	0	0	0	0	-		48.9	9.71	
44-3T			D	2.8	1	poorly diff.	SM	$\alpha$	0	0	0	0	0	-				
44N			D											-				

A, ascending; T, transverse; D, descending; S, sigmoid; R, rectum; Macroscopic classification and histopathological diagnosis according to Japanese research society for cancer of colon and rectum; M, mucosa; SM, submucosa; PM, muscularis propria; SS(A1), subserosa; INF, infiltrative growth at periphery of the tumor, classification according to Japanese research society for gastric cancer; ly, histological lymphoid invasion; v, histological vascular invasion; n, histological metastasis of lymph node; P, peritoneal metastasis; H, hepatic metastasis

\* Two samples were taken from 15 case; 15-2T was an adenoma, but no data about ras mutation and PCNA/cyclin L.I.

61番目のアミノ酸に対応する塩基配列の突然変異によるものとされている<sup>1217)</sup>。すなわち、正常 ras 蛋白は細胞外シグナルを細胞内に伝えた後、GTP 分解酵素活性化蛋白 (GTPase activating protein, GAP) と結合し、自己の持つ GTP 分解酵素の活性化により素早く GTP→グアノシン二リン酸 (guanosine diphosphate, GDP) 交換反応が起こり、元の不活化 ras 蛋白に戻る。しかし、変異 ras 蛋白は GAP による脱リン酸化活性化促進が起こらないため、p21-GTP 型に長く留まり、増殖信号を継続して伝えてしまうと考えられている<sup>6)</sup>。その結果、変異活性型 ras 遺伝子は大腸腫瘍において増殖率を高め、癌発生の過程、特に腺腫の発生に関与していると考えられている<sup>4)</sup>。一方、大腸癌における腫瘍細胞の増殖能を評価する方法としては、フローサイトメトリーによる腫瘍細胞の DNA 量の測定があり、それによって示される細胞増殖活性は癌の病期や組織型に関係のない、別の予後因子となりうることを報告されている<sup>18)~20)</sup>。近年、Garcia ら<sup>21)</sup>は、腫瘍細胞を抗ヒト PCNA/サイクリンモノクローナル抗体を用いて免疫染色し、これを半定量的に解析した結果、DNA フローサイトメトリーによる解析結果ときわめて高い相関を示すことを報告した。そして、PCNA/サイクリンが増殖細胞のマーカーの一つとして有用であると結論した。そこで、本研究では、まず、大腸腫瘍における K-ras 遺伝子の点突然変異を分子生物学的手法を用いて解析し、K-ras 遺伝子の点突然変異の存在が腫瘍の異常細胞増殖活性につながったのかどうかについて、PCNA/サイクリン抗体を用いて免疫組織学的にその増殖能を検討した。次いで、K-ras 遺伝子の点突然変異および PCNA/サイクリン標識率と臨床病理学的諸因子との関連を検討し、これら二つの因子が予後決定因子となりうるか否かを統計学的手法を用いて検討した。

本研究において、K-ras 遺伝子12, 13, 61コドンにおける点突然変異は大腸癌42症例中12症例、28.6%に認められた。この陽性率は Vogelstein ら<sup>3)</sup>、Bos ら<sup>4)</sup>および Forrester ら<sup>5)</sup>が報告した約40%という数値より低かった。Kobayashi ら<sup>22)</sup>は日本人の肺癌を対象として67腺癌中10症例、15%に K-ras 遺伝子12コドンに点突然変異を証明したが、やはり、Rodenhuis ら<sup>23)</sup>の報告した31%よりも低値であった。原発臓器により癌の点突然変異率に差異はあると思われるが、K-ras 遺伝子の点突然変異率には人種によっても差が存在し、日本人の方が欧米人に比較して低率なのかもしれない。

点突然変異を認めた大腸腫瘍15症例のうち7症例と過半数近くが、点突然変異の型として GG 対の2番目のGがAに変異するトランジションであった。この型の変異は一般に化学発癌剤であるアルキル化剤の投与と関連して認められるものであり<sup>24)</sup>、大腸腫瘍においてもこの発癌物質が関与しているのかもしれない。K-ras 遺伝子における点突然変異の有無と臨床病理学的因子との統計学的検討では、年齢に関して、K-ras 遺伝子の点突然変異陽性群と陰性群との間に有意差を認めた (Scheffe's Student t test,  $p < 0.01$ )。高齢者は、アルキル化剤を含めたさまざまな発癌物質に長期間さらされる機会が多く、このため腺腫や癌の発生を増加させるのみならず、おそらくそれにつながる K-ras 遺伝子の点突然変異の危険性を増大させているものと推定される。

今回の研究では K-ras 遺伝子において点突然変異を認めた大腸癌に有意に組織学的静脈侵襲が多かった。また、K-ras 遺伝子に点突然変異を認めなかった大腸癌30症例においては1症例

も遠隔転移を認めなかったのに対して、K-ras 遺伝子に点突然変異を認めた大腸癌12症例中2症例に遠隔転移を認めたことは特筆すべきことであろう。さらに、K-ras 遺伝子の点突然変異陽性症例は病期が進行していることが多かった。Slebos ら<sup>25)</sup>は肺癌のなかの腺癌において、K-ras 遺伝子の12コドンの点突然変異を認めた患者の予後は、同部位の点突然変異を認めなかった患者の予後に比較して有意に5年生存率が悪かった ( $p = 0.002$ ) と報告している。また、Lubbert ら<sup>26)</sup>は、子供における急性リンパ球性白血病患者のなかで、N-ras 遺伝子の12あるいは13コドンにおける点突然変異を認める頻度は少ないものの、点突然変異を認めた症例は再発率が高く ( $p = 0.01$ )、寛解に導入できる率も低い傾向にあった ( $p = 0.07$ ) と報告している。したがって、K-ras 遺伝子の点突然変異は患者の予後に対して影響を与える因子である可能性がある。

近年の分子生物学の発達によって、細胞の癌化には癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の喪失が深く関与することが明らかにされた<sup>27)~33)</sup>。このうち大腸癌においては、K-ras 遺伝子の点突然変異が発癌の初期、initiation の段階で起こると考えられている<sup>4)</sup>。したがって、腺腫の発生には特に関与すると思われるが、本研究に示されるごとく、腺腫の K-ras 遺伝子点突然変異は20.0%、癌のそれは28.6%であり、欧米の腺腫、大腸癌での40%以上の陽性率とは大きな差異があった。これは腺腫-癌相関、すなわち、腺腫を経て癌へ発育増殖するという大腸癌が欧米では多く、逆に腺腫を経ずに発育する de novo cancer が日本ではかなり多いということを意味し、de novo cancer の場合、K-ras 遺伝子における点突然変異が必ずしも先行しないということによるのかもしれない。中村<sup>34)</sup>は癌組織診断基準を客観化するために異型度の数値変換を試み、核・細胞質比 (N/C) の数値化と構造異型の数値化として腺管密度との2変量から線型判別関数を導き出した。この診断基準によって癌と判別された部分を有する大きさ2 cm 以下の病変314個の解析では、日本人の大腸癌のうち70-80%が腺腫組織の認められない、すなわち大腸粘膜から直接発生した de novo cancer であり、残り20-30%が腺腫の癌化であると結論している。今回の検討では大腸癌における K-ras 遺伝子の点突然変異率は従来の報告<sup>3)~5)</sup>より低く、28.6%であった。おそらく前述のように人種による相違に加え、de novo cancer が今回の検索の中に含まれているとすれば、K-ras 遺伝子の点突然変異率が比較的低値であったことの説明になると思われる。

近年、臨床医学において大腸内視鏡検査の技術的進歩は目覚ましく、最近では最大径5 mm 以下の微小大腸癌を発見できるようになった。工藤ら<sup>35)</sup>は4年10ヶ月の期間で早期大腸癌273病変を発見している。うち73病変が微小癌であり、最大径10 mm 以下の小癌は183病変であった。このような微小癌、小癌を対象とした K-ras 遺伝子の有無と癌の浸潤発育様式の解析が、この問題に対する手がかりを与えてくれるのかもしれない。

PCNA は1978年、Miyachi ら<sup>36)</sup>が膠原病患者血清中に見出した核抗原である。彼らは蛍光抗体法で70症例の全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者血清を調べ、その中の3症例に増殖細胞の核とのみ特異的に反応する自己抗体が存在することを発見した。その抗体に対応する抗原は proliferating cell nuclear antigen (PCNA) と名付けられた。1981年に Bravo ら<sup>37)</sup>は二次元電気泳動法で、増殖細胞に特異的に出現する分子量36 kD の酸性蛋白質を見だし、細胞周期の

早く回転する細胞ほど多量に検出されることから、サイクリン (cyclin) と名付けた。1984年に Mathews ら<sup>38)</sup>によって PCNA とサイクリンが同一物質であることが証明されたため、サイクリンに対する抗体として抗 PCNA 抗体が用いられるようになった。この時点で両者の研究は合流し、その物質は PCNA/サイクリンと呼ばれることが多くなった。これらとは全く独立に研究された DNA ポリメラーゼ  $\delta$  補助蛋白質は、当然ながら DNA ポリメラーゼの研究から派生したものである。1976年にウサギの赤芽球過形成骨髄から分離された DNA ポリメラーゼは従来の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  とは異なり、3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を持っており、Byrnes ら<sup>39)</sup>はこれを DNA ポリメラーゼ  $\delta$  と名付けた。1984年に Lee ら<sup>40)</sup>が子ウシ胸腺から DNA ポリメラーゼ  $\delta$  を精製する過程で DNA ポリメラーゼ  $\delta$  コア活性を著しく高める補助蛋白質が分離され、Tan ら<sup>41)</sup>によって詳しく解析された。そして1987年に Prelich ら<sup>42)</sup>と Bravo ら<sup>43)</sup>によって、これが PCNA/サイクリンおよび SV40 複製因子と同一のものであることが証明された。PCNA/サイクリンは 36kD の蛋白質で細胞回転において G1 期から核内に増え始め、G1/S 移行期に最も増え、G2 期に減少し、M期および G0 期には免疫学的に検出できないという特徴<sup>44,45)</sup>がある。したがって、抗 PCNA/サイクリン抗体 (19A2) は増殖している細胞を標識する、きわめて有用な抗体として評価されている<sup>21)</sup>。

本研究では、PCNA/サイクリン抗体を用いて34正常大腸粘膜、12大腸腺腫および32大腸癌を免疫染色し、無作為抽出した5視野を鏡検、白黒写真で撮影し、PCNA/サイクリン標識率を算出した。その結果、癌の PCNA/サイクリン標識率  $57.1 \pm 11.0\%$  および腺腫の PCNA/サイクリン標識率  $55.0 \pm 10.0\%$  は、正常粘膜の PCNA/サイクリン標識率  $46.0 \pm 6.6\%$  に比較してそれぞれ有意に高値を示した ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )。しかし、癌と腺腫の PCNA/サイクリン標識率との間には統計学的な有意差は認められず、PCNA/サイクリン標識率の多寡をもって癌と腺腫の判定根拠に利用することは難しいと思われた。癌と正常粘膜間の PCNA/サイクリン標識率の F 検定では癌の方がバラツキが多く ( $p < 0.05$ )、また各視野におけるバラツキ具合を見た CV 値での検討においても癌のみが正常粘膜と比較して有意にバラツキが大きい ( $p < 0.01$ ) という結果が得られた。癌-腺腫、腺腫-正常粘膜間には F 値、CV 値ともに有意差を認めず、変動係数をもって良悪性の判別に利用することも難しいと思われた。

PCNA/サイクリン標識率と臨床病理学的諸因子との解析では、癌において占拠部位に関して、PCNA/サイクリン標識率に左右差を認めた ( $p < 0.05$ ) ことは興味深い。症例をよく検討してみると、右半結腸に発生した癌は11症例中8症例、72.7%が高分化型腺癌であったのに対して、左半結腸に発生した癌は21症例中9症例 (42.9%) が高分化型腺癌、12症例 (57.1%) が中分化型腺癌であった。癌の分化度が低くなればなるほど PCNA/サイクリン標識率が高くなる ( $p < 0.05$ ) という傾向があるので、この組織型の差が癌の占拠部位における PCNA/サイクリン標識率に影響を与えたものと思われる。

本研究で、PCNA/サイクリン標識率と大腸癌の組織学的深達度との間に統計学的有意差を見い出せず、また、リンパ節転移および同時性遠隔転移についても統計学的有意差を認めなかった。臨床的にはいずれも患者の予後に大きく関与する因子であるが、癌細胞の増殖能と臨床病理学的諸因子に関する諸家

の報告も、病期、リンパ節転移および他臓器転移との間に統計学的有意差を認めていない<sup>19,20,46)-48)</sup>。病期は患者の予後に関連する最も重要な指標であるが、癌細胞個々の悪性度を表現しているわけではない。今回、検討した症例数が少く、統計学的有意差を認めるに至らなかったが、PCNA/サイクリン標識率の高い癌症例が浸潤性の高度な癌 (浸潤様式  $\beta$ ,  $\gamma$ ) である傾向があり、他臓器への直接浸潤と関連する可能性がある。

K-ras 遺伝子の点突然変異陽性大腸癌は異常細胞増殖活性を獲得、保持して特異な進展を取るのかどうかを明らかにするため、K-ras 遺伝子における点突然変異陽性群と陰性群との PCNA/サイクリン標識率を比較し、統計学的に検討した。今回の方法では K-ras 遺伝子における点突然変異と PCNA/サイクリン標識率で評価した腫瘍増殖率との間に統計学的に有意な関連性はなかった。しかし、細胞増殖因子の作用やいくつかの癌遺伝子の発現によって人工的に開始させた細胞の DNA 複製が、ras 蛋白中和抗体の微注入によって阻害される事実<sup>49,50)</sup>から、ras 遺伝子が細胞増殖の調節に関連することは疑いのないことである。活性化 ras 蛋白の効果が及ぶ最終標的は、核内における転写・複製調節因子群にあると考えられるので、これに至るまでいくつかの他の因子との共同作用を必要とする<sup>6)</sup>。したがって、癌細胞の DNA 合成促進には K-ras 点突然変異以外の複数の因子が関与し、細胞増殖能と K-ras 遺伝子の点突然変異は直接結びつかなかったものと思われる。今回の研究においては K-ras 遺伝子の点突然変異を認めた癌に静脈侵襲が多く、病期の進展がみられたこと、また、おそらく化学発癌剤の曝露や腺腫に引き続いて発生する高齢者の大腸癌に K-ras 遺伝子点突然変異が有意に高率であることがわかった。これは、PCNA/サイクリン標識率の高い癌の特徴、つまり、間質反応を伴い、低分化型で浸潤性に富む大腸癌とは少し趣を異にするようにみえる。したがって、K-ras 遺伝子点突然変異と高い癌細胞増殖活性とはむしろ別々の予後に影響を与える因子と推定される。

## 結 論

大腸腫瘍における K-ras 遺伝子の点突然変異を分子生物学的手法を用いて解析し、K-ras 遺伝子の点突然変異による腫瘍増殖率への関与の有無を PCNA/サイクリン標識率を指標として検討した。また、K-ras 遺伝子における点突然変異と PCNA/サイクリン標識率が臨床的に予後決定因子となりうるかどうかを統計学的に検討し、以下の結論を得た。

1. 癌では42症例中12症例、28.6%に12コドンあるいは13コドンに点突然変異を認めた。腺腫は15症例中3症例、20.0%に同じく12コドンあるいは13コドンに点突然変異を認めた。点突然変異を認めた15症例のうち7症例、47%は、コドンの GG 対の2番目の G が A に変化している G-A トランジションであった。
2. PCNA/サイクリン標識率は癌、腺腫、正常粘膜でそれぞれ  $57.1 \pm 11.0\%$ 、 $55.0 \pm 10.0\%$ 、 $46.0 \pm 6.6\%$  であった。癌-正常粘膜、腺腫-正常粘膜間に標識率に関してそれぞれ有意差を認めた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。
3. K-ras 点突然変異の有無と臨床病理学的な検討では、点突然変異陽性群が陰性群に比べて年齢が高い傾向がみられた ( $p < 0.05$ )。また、点突然変異陽性癌に組織学的静脈侵襲が高かった ( $p < 0.005$ )。
4. PCNA/サイクリン標識率と臨床病理学的検討では左半

結腸に発生した癌の標識率が右半結腸癌に比べて高かった ( $p < 0.05$ ). 分化度が低くなるほど PCNA/サイクリン標識率が高くなり ( $p < 0.05$ ), また, 間質への浸潤増殖が強くなるほど PCNA/サイクリン標識率が高くなるという傾向がみられた ( $p < 0.05$ ).

5. 統計学的には, K-ras 点突然変異と PCNA/サイクリン標識率との間に相関は認められなかった.

6. 大腸腫瘍同時多発症例において K-ras 遺伝子の点突然変異率が 42.9% (3/7) と大腸腫瘍単発症例の 23.5% (12/51) に比べて高かった.

以上より, 大腸癌においては K-ras 遺伝子の点突然変異と腫瘍の細胞増殖能とは別個の予後因子になりうると思われた. おそらく, K-ras 遺伝子の点突然変異と腺腫発生および組織学的静脈侵襲, 高い PCNA/サイクリン標識率と間質への浸潤増殖という 2 面性をもって大腸癌は進展するものと推定される.

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, 御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました金沢大学第一病理学講座中西功夫教授, 金沢大学第一外科学講座渡辺洋字教授に深く感謝の意を表します. また御教示を仰ぎました本学衛生学講座橋本和夫教授, 終始御指導御助言を戴きました第一病理学講座小田恵夫助手ならびに第一病理学教室および第一外科学教室各位に厚く御礼申し上げます. さらに貴重な手術材料を提供して下さいました小松市立病院, 有松中央病院および済生会金沢病院外科諸先生方に感謝いたします. 最後に, 研究に御協力を頂きました五谷美保子技術員はじめ第一病理学教室の技術員の皆様に感謝いたします.

本論文の要旨は, 第33回日本消化器学会大会 (1991年, 久留米) において発表した.

#### 文 献

- 1) Wolff, W. I. & Shinya, H.: Definitive treatment of "malignant" polyps of the colon. *Ann. Surg.*, **182**, 516-525 (1975).
- 2) Sugarbaker, J. P., Gunderson, L. L. & Wittes, R. E.: Colorectal cancers. *In* V. T. DeVita, S. Hellman & S. A. Rosenberg (eds.), *Cancer: Principles and Practices of Oncology*, 2nd ed. p800-803, J. B. Lippincott, Philadelphia, 1985.
- 3) Vogelstein, B., Fearson, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., Whyte, R., Smis, A. M. M. & Bos, J. L.: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.*, **319**, 525-532 (1988).
- 4) Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., Van Boom, J. H., Van der Eb, A. J. & Vogelstein, B.: Prevalence of ras mutations in human colorectal cancers. *Nature*, **327**, 293-297 (1987).
- 5) Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W. E. & Perucho, M.: Detection of high incidence of Ki-ras oncogenes during human carcinogenesis. *Nature*, **327**, 298-303 (1987).
- 6) 清水憲二: ras の突然変異とヒト腫瘍. 実験医学増刊, 癌遺伝子研究の新展開 (花房秀三郎編), 第1版, 101-108頁, 羊土社, 東京, 1990.
- 7) Bos, J. L.: ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Res.*, **49**, 4682-4689 (1989).
- 8) 大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約. 改訂5版, 32-33頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 9) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂11版, 50-51頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 10) Herrman, B. G. & Frislauf A-M.: Isolation of genomic DNA. *Methods Enzymol.*, **152**, 180-183 (1987).
- 11) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354 (1985).
- 12) Verlaan-de Vries, M., Bogaard, M. E., van den Elst, H., van Boom, J. H., van der Eb, A. J. & Bos, J. L.: A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides. *Gene*, **50**, 313-320 (1986).
- 13) Gown, A. M. & Vogel, A. M.: Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins. II. Distribution of filament proteins in normal tissues. *Am. J. Pathol.*, **114**, 309-321 (1984).
- 14) Hsu, S. M. & Soban, E.: Color modification of diaminobenzidine [DAB] precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 1079-1082 (1982).
- 15) Barbacid, M.: ras genes. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 779-827 (1987).
- 16) Trahey, M. & McCormick, F.: A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*, **238**, 542-545 (1987).
- 17) Bos, J. L., Verkaan-de Vries, M., Jansen, A. M., Veeneman, G. H., Van Boom, J. H. & Van der Eb, A. J.: Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 9155-9163 (1984).
- 18) Bauer, K. D., Lincoln, S. T., Vera-Roman, J. M., Wallemark, C. B., Chmiel, J. S., Madurski, M. L., Murad, T. & Scarpelli, D. G.: Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy in colonic adenocarcinomas. *Lab. Invest.*, **57**, 329-335 (1987).
- 19) Quirke, P., Dixon, M. F., Clayden, A. D., Durdey, P., Dyson, J. E. D., Williams, N. S. & Bird, C. C.: Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J. Pathol.*, **151**, 285-291 (1987).
- 20) Schutte, B., Reynders, M. M. J., Wiggers, T., Arends, J. W., Volovics, L., Bosman, F. T. & Blijham, G. H.: Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA content and proliferative activity in large bowel carcinoma. *Cancer Res.*, **47**, 5494-5496 (1987).
- 21) Garcia, R. L., Coltrera, M. D. & Gown, A. M.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues-comparison with flow cytometric analysis. *Am. J. Pathol.*, **134**, 733-739 (1989).

- 22) Kobayashi, T., Tsuda, H., Noguchi, M., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Goya, T. & Hayata, Y.: Association of point mutation in c-Ki-ras oncogene in lung adenocarcinoma with particular reference to cytologic subtypes. *Cancer*, **66**, 289-294 (1990).
- 23) Rodenhuis, S., Slebos, R. J. C., Boot, A. J. M., Evers, S. G., Mooi, W. J., Wagenaar, S. Sc., van Bodegom, P. Ch. & Bos, J. L.: Incidence and possible clinical significance of Ki-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.*, **48**, 5738-5741 (1988).
- 24) Topal, M. D.: DNA repair, oncogenes and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **9**, 691-696 (1988).
- 25) Slebos, J. C. R., Kibbelaar, R. E., Dalesio, O., Kooistra, A., Stam, J., Meijer, C. J. L. M., Wagenaar, S. S., Vanderschueren, R. G. J. R. A., van Zandwijk, N., Mooi, W. J., Bos, J. L. & Rodenhuis, S.: K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 561-565 (1990).
- 26) Lubbert, M., Mirro, J. J., Miller, C. W., Kahan, J., Isaac, G., Kitchingman, G., Mertelsmann, R., Herrmann, F., McCormick, F. & Koeffler, H. P.: N-ras gene point mutations in childhood acute lymphocytic leukemia correlate with a poor prognosis. *Blood*, **75**, 1163-1169 (1990).
- 27) Knudson, A. G.: Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.*, **45**, 1437-1443 (1985).
- 28) Bishop, J. M.: The molecular genetics of cancer. *Science*, **235**, 305-311 (1987).
- 29) Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R. & Vogelstein, B.: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **244**, 217-221 (1989).
- 30) Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, 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 is altered in colorectal cancers. *Science*, **247**, 49-56 (1990).
- 31) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. M.: がん. 細胞の分子生物学 (中村桂子, 松原謙一編), 第2版, 1187-1216 頁, 教育社, 東京, 1990.
- 32) Hunter, T.: Cooperation between oncogenes. *Cell*, **64**, 249-270 (1991).
- 33) Bishop, J. M.: Molecular theme in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-248 (1991).
- 34) 中村恭一: 大腸癌の構造. 第1版, 37-76 頁, 医学書院, 東京, 1989.
- 35) 工藤進英, 三浦宏二, 高野征雄, 坂内 均, 大塚和朗, 松森昌門, 齊藤純夫, 林 俊一: 微小大腸癌の診断 実体顕微鏡所見を含めて. *胃と腸*, **25**, 801-812 (1990).
- 36) Miyachi, K., Fritzler, M. J. & Tan, E. M.: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, **121**, 2228-2234 (1978).
- 37) Bravo, R., Fey, S. J., Bellatin, J., Larsen, P. M., Avrevalo, J. & Celis, J. E.: Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Exp. Cell Res.*, **136**, 311-319 (1981).
- 38) Mathews, M. B., Bernstein, R. M., Franza, Jr, B. R. & Garrels, J. I.: Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, **309**, 374-376 (1984).
- 39) Byrnes, J. I., Downey, K. M., Black, V. L. & So, A. G.: A new mammalian DNA polymelase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymelase  $\delta$ . *Biochemistry*, **15**, 2817-2823 (1976).
- 40) Lee, M. Y. W. T., Tan, C-K., Downey, K. M. & So, A. G.: Further studies on calf thymus DNA polymelase  $\delta$  purified to homogeneity by a new procedure. *Biochemistry*, **23**, 1906-1913 (1984).
- 41) Tan, C-K., Castillo, C., So, A. G. & Downey, K. M.: An auxillary protein for DNA polymelase- $\delta$  from fetal calf thymus. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12310-12316 (1986).
- 42) Prelich, G., Tan, C-K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M. & Stillman, B.: Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymelase- $\delta$  auxillary protein. *Nature*, **326**, 517-520 (1987).
- 43) Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A. & MacDonald, B. H.: Cyclin/PCNA is the auxillary protein of DNA polymelase- $\delta$ . *Nature*, **326**, 515-517 (1987).
- 44) Kurki, P., Ogata, K. & Tan, E. M.: Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **109**, 49-59 (1988).
- 45) Ogata, K., Kurki, P., Celis, J. E., Nakamura, R. M. & Tan, E. M.: Monoclonal antibodies to nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp. Cell Res.*, **168**, 475-486 (1987).
- 46) Meyer, J. S. & Prioleau, P. G.: S-phase fractions of colorectal carcinomas related to pathologic and clinical features. *Cancer*, **48**, 1221-1228 (1981).
- 47) Shepherd, N. A., Richman, P. I. & England, J.: Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J. Pathol.*, **155**, 213-219 (1988).
- 48) Lanza, Jr. G., Cavazzini, L., Borghi, S., Ferretti, S., Buccoliero, F. & Rubbini, M.: Immunohistochemical assessment of growth fractions in colorectal adenocarcinomas with monoclonal antibody Ki-67. Relation to clinical and pathological variables. *Path. Res. Pract.*, **186**, 608-618 (1990).
- 49) Mulcahy, L. S., Smith, M. R. & Stacey, D. W.: Requirements for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*, **313**, 241-243 (1985).
- 50) Smith, M. R., DeGudicibus, S. J. & Stacey, D. V.: Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. *Nature*, **320**, 540-543 (1986).

**Clinico-pathological Studies on K-ras Gene Point Mutation and Cell Proliferative Activity of Colorectal Tumors**  
Matsuhei Tanaka, Department of Pathology ( I ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **101**, 211—226 (1992)

**Key words** K-ras point mutation, proliferating rate, proliferating cell nuclear antigen/cyclin, clinicopathological analysis, colorectal cancer and adenoma

#### Abstract

K-ras gene mutation in colorectal tumors (53 carcinomas, 21 adenomas) from 59 patients was investigated using oligonucleotide probes specific for a mutation at codon 12, 13, or 61 of the K-ras gene by polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization techniques, and their proliferative activity was assessed immunohistochemically by using the anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin (19A2). Point mutations at codon 12 or 13 were observed in twelve of 42 carcinomas (28.6%) and three of 15 adenomas (20%). No point mutation was detected in control mucosae. Labeling index (L.I.) of PCNA/cyclin in carcinoma cells and adenoma cells was  $57.1 \pm 11.0\%$  and  $55.0 \pm 10.0\%$  respectively. These indices were significantly higher than the L.I. of the normal mucosa ( $46.0 \pm 6.6\%$ ) ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ). Ras gene mutation-positive cases tended to be older than those without mutations in cancers ( $p < 0.05$ ). Microscopically, carcinomas positive for K-ras point mutations tended to show the presence of venous invasion (5/12 vs. 1/30,  $p < 0.005$ ). Cancers located in the left colon were generally characterized by increased numbers of proliferating cells ( $p < 0.05$ ). Moreover, among 42 adenocarcinomas a significant inverse correlation was demonstrated between L.I. of PCNA/cyclin and the degree of differentiation ( $p < 0.05$ ), and the pattern of infiltrating growth ( $p < 0.05$ ). In colorectal carcinomas, on the other hand, there was no difference of PCNA/cyclin-derived proliferative activity between K-ras point mutation positive cancers and K-ras point mutation negative cancers. The present data suggest that point mutational activation of K-ras gene in colorectal carcinomas is correlated with venous invasion, while cell proliferative activity is related to stromal invasion, and these factors would be independent markers for tumor prognosis.