

## 7,12 dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) 誘発ラット卵巣腫瘍における ras 癌遺伝子関連蛋白質 (p21) の局在の検討

久留米大学医学部産科婦人科学教室

片岡 明生 平川 伸夫 杉山 徹  
東島 利紀 西田 敬 薬師寺道明

### Immunohistochemical Studies of ras Oncogene Product p21 in 7,12 Dimethylbenz (a) Anthracene-induced Rat Ovarian Tumors

Akio KATAOKA, Nobuo HIRAKAWA, Toru SUGIYAMA,

Toki HIGASHIJIMA, Takashi NISHIDA and Michiaki YAKUSHIJI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Kurume University School of Medicine, Kurume*

**概要** 7,12 dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) により誘発したラット卵巣腫瘍について, ras 遺伝子関連蛋白質として p21の局在を免疫組織学的に検討した。

1) 卵巣腫瘍を腹部に腫瘤として触知するまで約28~38週(平均35.6週)であった。その内訳は, adenoma 6例, adenocarcinoma 30例, sarcoma 3例, mixed müllerian tumor 1例, epidermal cyst 2例であった。

2) p21の陽性染色像としては, 腫瘍細胞胞体に淡く認められた。その陽性率は, adenoma 83%, adenocarcinoma は57%, sarcoma は67%, mixed müllerian tumor は0%, epidermal cyst の扁平上皮細胞に100%陽性であった。また, 同種継代移植腫瘍と DMBA-OC-1は, いずれも陽性であった。

3) DMBA 誘発卵巣腫瘍においても ras 遺伝子が, 他の臓器と同様に sarcoma に特異的な遺伝子でないことが認められた。

4) Adenoma, epidermal cyst においても p21が陽性であったことより, 既に腫瘍化する段階での ras 遺伝子の関与が示唆された。

**Synopsis** In the present study, ras oncogen product p21 was analyzed immunohistochemically in rat ovarian tumors induced by 7, 12 dimethylbenz (a) anthracene (DMBA).

1) After 28~38 (average 35.6) weeks, the tumors —6 adenomas, 30 adenocarcinomas, 3 sarcomas, one mixed müllerian tumor and 2 epidermal cysts— were produced in the rat ovaries.

2) The p21 positive reactions could be seen in the cytoplasm of the tumor cells. The positive rates were as follows: adenomas 83%, adenocarcinomas 57%, sarcomas 67%, mixed müllerian tumors 0%, epidermal cysts 100%, in which the positive reactions were obtained in squamous cells. Both of the serial-allografted tumor and DMBA-OC-1 were positive.

3) The present study showed that the ras oncogen is not a specific gene in ovarian sarcoma or in other tumors.

4) The present study has suggested that the ras oncogen plays a role in tumor genesis including benign tumors, by showing p21 positive in adenomas and epidermal cysts.

**Key words:** Ovarian tumor • 7, 12 dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) • ras oncogene

### 緒 言

ラットの肉腫の発癌遺伝子として発見された ras 遺伝子は, ヒト細胞中にも存在することが確認され, その後の研究により, 細胞の癌化に不可欠な遺伝子として知られるようになった<sup>7)19)</sup>. 更には, その関連蛋白質である, p21は GTP 結合蛋白質

として, 細胞における情報伝達機構に重要な役割をはたすことが注目されている<sup>3)5)6)9)14)16)20)21)</sup>.

一方, 化学発癌物質である, 7,12 dimethylbenz(a) anthracene (DMBA) で誘発された卵巣腫瘍は, その多彩な組織像を示すことが知られている<sup>1)</sup>が, これまでその発生, 並びに癌化の機序にお

る癌遺伝子の役割については、他臓器の化学発癌腫瘍に比して報告が少ない<sup>19)21)</sup>。今回、著者らは、DMBA により誘発した卵巢腫瘍について、p21 の局在を検討し、その発生における ras 癌遺伝子の役割について、なんらかの指標が得られんことを目的として研究を行つたので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 腫瘍の作製と固定

Wistar 系の F344 に遺伝子背景をもつ生後 4 週の雌ラット卵巢に Kato et al.<sup>13)</sup> の DMBA の direct application method により行つた。7～9 カ月後ラットをエーテル麻酔下に屠殺し、ブアン固定液により 16～24 時間の浸漬固定を行つた。また、Sugiyama et al.<sup>18)</sup> により樹立された同種継代移植 DMBA 誘発卵巢癌株、並びに Kataoka et al.<sup>12)</sup> によつて、分離樹立された、DMBA 誘発卵巢癌の培養細胞株 (DMBA-OC-1) の同種継代移植腫瘍についても同様の方法による腫瘍の採取、固定を行つた。

#### 2. 腫瘍組織と染色法

1. の方法により得られた腫瘍のうち壊死や感染を認めず染色に適切と判定された腫瘍のみを実験に供与した。コントロールとして正常卵巢表層上皮、卵管上皮、顆粒膜細胞、間質細胞について観察を行つた。一次抗体として ras 遺伝子の関連蛋白質である p21 に対する monoclonal 抗体 (Oncogene science Inc. USA) を用いて、Hsu et al.<sup>11)</sup> の方法により抗マウス IgG を二次抗体とする Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法により染色を行いその局在について検討した。核染色は、Myer-Hematoxylin と無染色を行い同一切片 5 枚で厳密に判定した。陽性コントロールとして、p21 の存在が証明された胆嚢癌ヌードマウス移植株 KMG-1<sup>15)</sup> を、陰性コントロールとして全切片について non-immunized マウス IgG を二次抗体として用いて行つた。

### 結 果

#### 1. 腫瘍組織

卵巢腫瘍を腹部に腫瘤として触知するまで約 28～38 週 (平均 35.6 週) であつた。その内訳は adenoma 6 例, adenocarcinoma 30 例, sarcoma

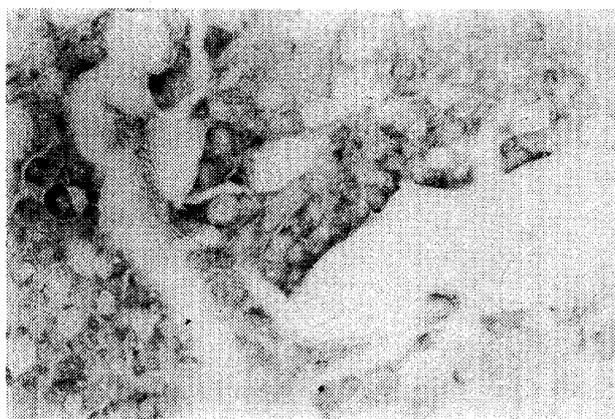


写真1 ヌードマウス移植 KMG-1 における、p21 の反応所見：細胞胞体内に淡く認められる。(ABC 法、無染色、×200)

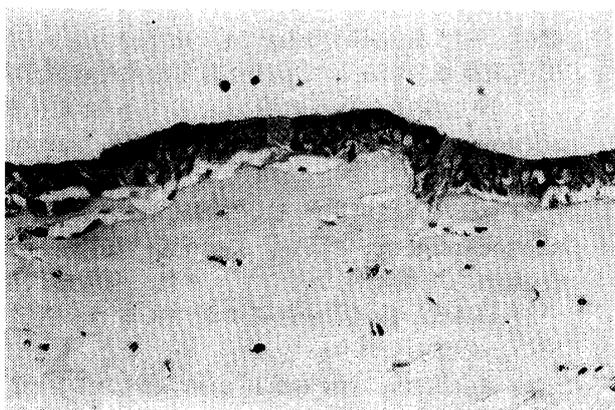


写真2 Adenoma の細胞胞体内においても p21 の明らかな陽性反応が認められた。(ABC 法+Myer-Hematoxylin 染色、×200)

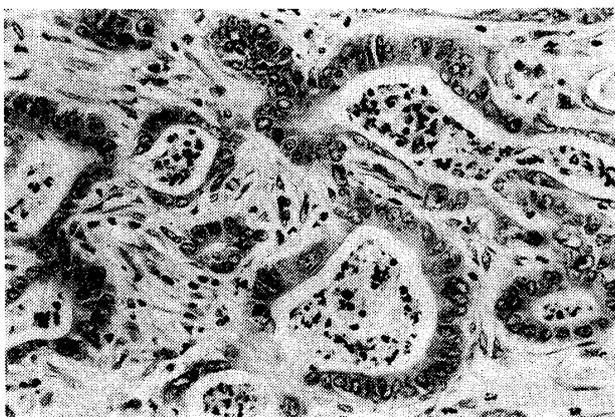


写真3 Adenocarcinoma においても p21 は細胞胞体内に陽性反応を認めた。(ABC 法+Myer-Hematoxylin 染色、×200)

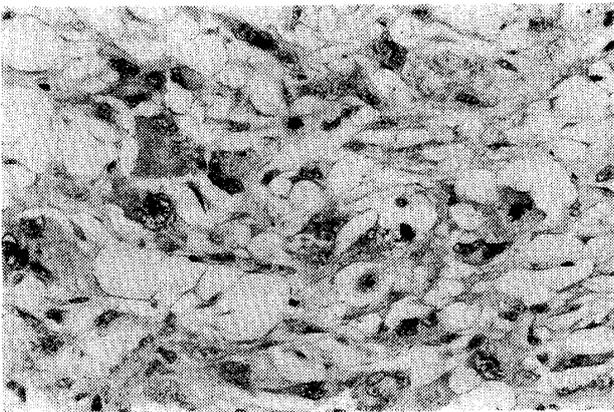


写真4 Sarcomaにおいても p21は、乏しい胞体内に淡く陽性所見を呈した。(ABC法, 無染色,  $\times 200$ )

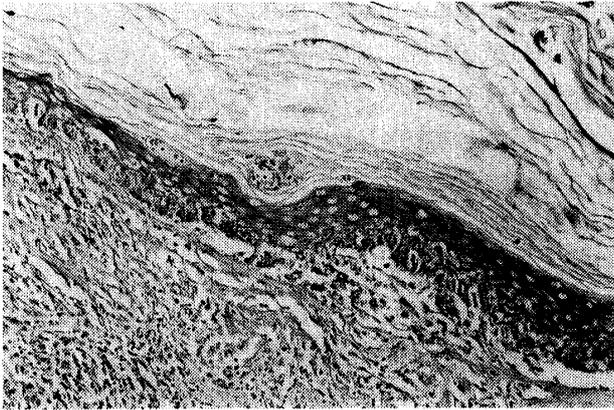


写真5 Epidermal cystにおいては, cyst内の扁平上皮細胞において陽性所見を呈した。(ABC法+Myer-Hematoxylin染色,  $\times 100$ )

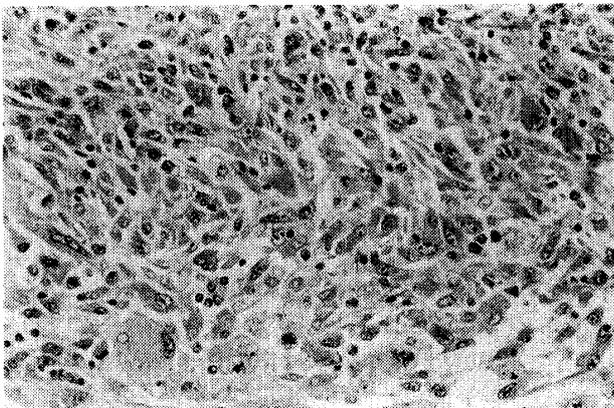


写真6 DMBA-OC-1の同種継代移植腫瘍においては, Sarcoma類似の染色陽性所見であった。(ABC法+Myer-Hematoxylin染色,  $\times 200$ )

表1 卵巣腫瘍の組織型と p21の陽性率

組織型	陽性数/検体数 (陽性率)
Adenoma	5/6 ( 83.3%)
Adenocarcinoma	17/30( 56.7%)
Sarcoma	2/3 ( 66.7%)
Mixed müllerian tumor	0/1 ( 0.0%)
Epidermal cyst	2/2 (100.0%)
Total primary tumor	26/42( 61.9%)
Serial-allografted tumor	1/1 (100.0%)
DMBA-OC-1	1/1 (100.0%)

\* ; No significance each other,  $\chi^2$  test,  $p < 0.01$

3例, mixed müllerian tumor (MMT) 1例, epidermal cyst 2例, また同時に行つた同種継代移植腫瘍 1例, DMBA-OC-1腫瘍 1例は, それぞれ 8週と 6週で腫瘍形成を認めた.

## 2. 組織及び染色性

p21の陽性染色像としては, KMG-1細胞の胞体に淡く認められた(写真1)が, 陰性コントロールとして供した組織はすべて陰性であった.

adenomaにおいては, 6例中5例(83%)の腫瘍細胞において同様に胞体内に p21の局在が認められた(写真2). また, adenocarcinomaの形態を示したものにおいては, 30例中17例(57%)の陽性であった(写真3). しかし, adenomaと adenocarcinomaの染色態度と陽性率に有意差を認めなかつた. 一方, すべての腫瘍において間質細胞は, 染色性を示さなかつた. 更に sarcomaは, 3例中2例(67%)が陽性を示したが(写真4), MMTは, すべて陰性であった. 一方, epidermal cystの扁平上皮細胞については, p21は陽性であった(写真5). 同種継代移植腫瘍と DMBA-OC-1は, いずれも陽性であった(写真6). その一覧表を表1として示す.

## 考 案

K-ras及びH-ras遺伝子は, ラットの肉腫遺伝子に由来し, ヒトの癌にその共通性が発見されたことより注目された遺伝子である<sup>7)</sup>. また p21は GTPを介するシグナル伝達機構に関連する K-, H-, ras 遺伝子の共通の産生蛋白質として細胞膜の内側に局在することが知られている<sup>3)5)6)9)</sup>. すなわち, p21の局在は, ras 遺伝子の活性を意味して

いる<sup>14)16)</sup>。一方、癌遺伝子の発現の検討方法としては、Northern blot 法などによる mRNA レベルでの直接的証明と、gene product を検出することによる間接的証明が存在する。感度においては前者がすぐれているが、後者は局在の検討が可能で腫瘍細胞の特異性が証明できる。このため、我々は、ABC 法を用いた p21 蛋白質の局在を検討した。当初、sarcoma を初めとする非上皮性腫瘍について強い局在を示すのではないかと予測していたが結果的には、有意差を認めなかつた。このことは、卵巣においても ras 遺伝子が、他の臓器と同様に sarcoma に特異的な遺伝子でないことを示唆するものと考えられる。一方、ヒト卵巣癌においては、著者らも、c-myc の漿液性嚢胞腺癌における増幅を報告しているが<sup>2)</sup>、これ以外にも、Slamon et al.<sup>17)</sup>は、腺癌で fos, myc, H-ras, K-ras 遺伝子の発現亢進を、Feinberg et al.<sup>7)</sup>は漿液性嚢胞腺癌培養細胞株における K-ras 遺伝子の活性化を、また Filmus et al.<sup>8)</sup>は、漿液性嚢胞腺癌で c-K-ras 遺伝子の増幅がみられたと報告している。このため今後、他の遺伝子や検出方法を変えて検討を行う必要を感じている。また、ras 遺伝子は、悪性度や転移との関係について関連を言及した論文がしばしば認められる<sup>4)~6)16)20)</sup>が、今回の研究においては明らかでなかつた。むしろ、良性と思われる、adenoma や epidermal cyst においても p21 の陽性所見を認めたことは、既に腫瘍化する段階での ras 遺伝子の関係を示唆するもので、更なる悪性化には、他の因子の関連もうかがわれた。すなわち、ヒト腫瘍で、p21 は良性腫瘍においては発現されず、悪性腫瘍のみに発現を認めるとの報告もあるが、この点で当実験腫瘍は腫瘍化過程を単純化したモデルであり形態的良性腫瘍とはいえずヒト腫瘍との相違点が認められるのかもしれない。

これに対して、DMBA を初めとする化学発癌と癌遺伝子の関連については、細胞の正常な生存に必須の proto-oncogene とその活性化の面から研究が進められている。Barbacid et al.<sup>19)21)</sup>は Nitroso-methyl urea (NMU) を用いて誘発したラットの乳癌において H-ras 遺伝子の活性化を確認し、特に12番目のコドンのアミノ酸配列(G →

A) の変化であることを確認した。一方、DMBA により誘発された癌組織からは活性型 H-ras 遺伝子が検出されたが12番目のコドンに変異体は存在しなかつたと報告している。しかし、これは検体数が3検体と十分とはいえず今後もまだ検討の余地のあるものと考えている。今回の著者らの研究においては、adenoma において既に ABC 法において検出可能なレベルに p21 が発現していた。これは正常組織においては、p21 の局在を認めないことから、DMBA 誘発腫瘍におけるラットの proto-oncogene を検出している可能性は否定できると考えられ、腫瘍化に ras 遺伝子が係わるものであろうことが間接的に推測されたが、今後更に検討を行うつもりである。更に、同種継代移植腫瘍と DMBA-OC-1 で p21 の発現を認めたことは、DMBA 卵巣癌の継代過程において ras 遺伝子の発現を獲得したのか、又は原腫瘍が発現していたのかこの実験だけでは明らかでない。しかし、遺伝子検索に容易なこれらの株細胞<sup>12)</sup>は、この方面での研究の格好のモデルともなりうるものと考えている。

実験にあたって腫瘍作製並びに組織染色に多大なる助力を頂いた生津八重子嬢に感謝いたします。また、本研究の一部は、久留米大学医学部産婦人科育成会研究費(平成2年度)によつた。

#### 文 献

1. 平川伸夫, 小田高明, 杉山 徹, 西田 敬, 薬師寺道明: DMBA 直接作用による卵巣中胚葉性混合腫瘍の発生. 日産婦誌, 49: 61, 1989.
2. 片岡明生, 薬師寺道明, 神代正道: 卵巣癌における myc 遺伝子(c-myc, N-myc) の増幅の検討. 日産婦誌, 42: 259, 1990.
3. 葛巻 進: 癌遺伝子産物に対するモノクローナル抗体を用いたアプローチ. 癌と化療, 14: 2205, 1987.
4. 柳沼裕二, 山下幸紀: 卵巣腫瘍における ras 癌遺伝子産物 p21 発現の免疫組織学的検討. 日産婦誌, 41: 1409, 1989.
5. Chesa, P.G., Rettig, W.J., Melamed, M.R., Old, L.J. and Niman, H.L.: Expression of p21 ras in normal and malignant human tissues: Lack of association with proliferation and malignancy. Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 3234, 1987.
6. Clair, T., Miller, W.R. and Cho-Chung, Y.S.: Prognostic significance of the expression of a

- ras protein with a molecular weight of 21,000 by human breast cancer. *Cancer Res.*, 47 : 5290, 1987.
7. *Feinberg, A.P., Vogelstein, B., Droller, M.J., Baylin, S.B. and Nelkin, B.D.* : Mutation affecting the 12th amino acid of the c-Ha-ras oncogene product occurs infrequently in human cancer. *Science*, 220 : 1175, 1983.
  8. *Filmus, J.E. and Buik, R.N.* : Stability of c-K-ras amplification during progression in a patient with adenocarcinoma of the ovary. *Cancer Res.*, 45 : 4468, 1985.
  9. *Gallick, G.E., Kurzrock, R., Kloetzer, W.S. and Arlinghaus, R.P.* : Expression of p21 ras in fresh and metastatic human colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82 : 1795, 1985.
  10. *Haas, M., Isakov, J. and Howell, S.B.* : Evidence against ras activation in human ovarian carcinomas. *Mol. Biol. Med.*, 4 : 265, 1987.
  11. *Hsu, S., Raine, L. and Fanger, H.* : The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29 : 577, 1981.
  12. *Kataoka, A., Kojiro, M., Yakushiji, M. and Kato, T.* : Establishment and morphologic characterization of cell line (DMBA-OC-1) from 7,12-dimethylbenz (a) anthracene-induced rat ovarian carcinoma. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 39 : 842, 1987.
  13. *Kato, T., Yakushiji, M., Tsunawaki, A., Ide, K., Hirose, N., Araki, S. and Abe, M.* : Study on experimental formation of ovarian tumors. *Kurume Med. J.*, 22 : 169, 1975.
  14. *Kurzrock, R., Galick, G.E. and Gutterman, J. U.* : Differential expression of p21 ras gene products among histological subtypes of fresh primary human lung tumors. *Cancer Res.*, 46 : 1530, 1986.
  15. *Maruiwa, M., Yano, H., Kataoka, A., Murakami, T., Fukuda, K., Sugihara, S. and Kojiro, M.* : Heterotransplantation of an alpha-fetoprotein producing human gallbladder carcinoma into nude mice. *Acta Pathol. Jpn.*, 38 : 501, 1988.
  16. *Ohuchi, N., Thor, A., Page, D.L., Hand, P.H., Haltor, S.A. and Schlom, J.* : Expression of the 21,000 molecular weight ras protein in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. *Cancer Res.*, 46 : 2511, 1986.
  17. *Slamon, D.J., deKernion, J.B., Verma, I.M. and Cline, M.J.* : Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science*, 224 : 256, 1984.
  18. *Sugiyama, T., Nishida, T., Nakanami, M., Ushijima, K., Shibue, K., Katabuchi, H., Yakushiji, M. and Kato, T.* : Characterization of transplant generations of primary rat adenocarcinoma and some chemotherapeutic observations. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 39 : 681, 1987.
  19. *Sukumar, S., Notario, V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M.* : Induction of mammary carcinomas in rats by nitrosomethylurea involves malignant activation of H-ras-1 locus by single point mutations. *Nature*, 306 : 658, 1983.
  20. *Vilola, M.V., Fromowitz, F., Oravez, S., Deb, S. and Schlom, J.* : Ras oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. *J. Exp. Med.*, 161 : 1213, 1985.
  21. *Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M.* : Direct mutagenesis of Ha-ras-1 oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats. *Nature*, 315 : 382, 1985.

(No. 6987 平 3・4・22 受付)