

## 卵巣癌における第17染色体上のがん抑制遺伝子の欠失

帝京大学医学部産婦人科学教室

\*国立がんセンター病院婦人科

\*\*都立駒込病院産婦人科

\*\*\*関東通信病院産婦人科

坂本 隆子 萩野 雅弘 山本 樹生  
森 宏之 冲永 荘一 園田 隆彦\*  
植田 国昭\*\* 小尾 俊一\*\*\* 小林 拓郎

### Allelic Losses of Tumor Suppressor Gene on Chromosome 17 in Ovarian Cancer

Takako SAKAMOTO, Masahiro OGINO, Tatsuo YAMAMOTO,

Hiroyuki MORI, Shoichi OKINAGA, Takahiko SONODA\*,

Kuniaki UEDA\*\*, Shun-ichi OBI\*\*\* and Takuro KOBAYASHI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Teikyo University School of Medicine, Tokyo*

*\*Department of Gynecology, National Cancer Center Hospital, Tokyo*

*\*\*Department of Obstetrics and Gynecology, Metropolitan Komagome Hospital, Tokyo*

*\*\*\*Department of Obstetrics and Gynecology, Kanto Teishin Hospital, Tokyo*

**概要** 21例の上皮性卵巣癌症例（漿液性13例，粘液性3例，類内膜癌2例，明細胞癌3例）を対象に，がん抑制遺伝子 p53 および第17染色体の欠失を検討した。同一症例から得た癌組織および正常組織から高分子量 DNA を抽出し，Southern transfer 後，第17染色体短腕（17p）上に存在するがん抑制遺伝子 p53 又は第17染色体上の二つの VNTR プローブ（pYNZ22, pTHH59）とハイブリダイズさせ，正常組織と癌組織のバンドを比較することで，ヘテロ接合性の消失（loss of heterozygosity: LOH）を検出した。p53 および pYNZ22 ではそれぞれ，解析し得た14例中5例（36%），20例中9例（45%）と高頻度の LOH が認められたが，pTHH59 では LOH は7例中1例（14%）であった。

以上の成績より，上皮性卵巣癌の発生・進展には p53 の欠失が関与する例があることが示唆された。

**Synopsis** Twenty-one human ovarian epithelial carcinomas (13 serous, 3 mucinous, 2 endometrioid and 3 clear cell type) were examined for allelic losses of p53 tumor suppressor gene, pYNZ22 or pTHH59 on chromosome 17. High-molecular-weight DNA was extracted from ovarian tumor tissues and normal ones obtained from the same patients, and was subjected to Southern blot analysis. The filters were hybridized with p53 cDNA probe or two VNTR probes on chromosome 17 (pYNZ22, pTHH59). By comparing the hybridized band pattern of the normal tissue with that of the tumor, loss of heterozygosity (LOH) was detected. Frequent LOHs were detected in 5 of 14 informative cases (36%) on p53 and in 9 of 20 (45%) on pYNZ22, but LOH on pTHH59 was observed less frequently than those of p53 and pYNZ22 (one of 7 cases: 14%).

These results suggest that allelic loss of p53 may play an important role in the development and/or progression of ovarian carcinomas.

**Key words:** Ovarian cancer • Tumor suppressor gene • p53 • Chromosome 17 • Loss of heterozygosity

#### 緒 言

がん遺伝子研究の進歩により，多くのヒト腫瘍で組織特異的に又は複数の腫瘍に共通した遺伝子異常が明らかになってきた<sup>1)~6)</sup>。

ヒト卵巣癌ではこのような遺伝子異常の報告は少なく，わずかに c-myc の遺伝子増幅<sup>7)</sup>や erbB<sub>2</sub> 増幅<sup>8)9)</sup>・過剰発現<sup>9)~11)</sup>，K-ras の活性化<sup>12)</sup>等の報告が散見されるだけで，他の遺伝子異常の出現頻度

は非常に低いか皆無である<sup>13)~16)</sup>。したがってヒト卵巣癌の遺伝子レベルでの異常の解明は、他の腫瘍に比べ著しく遅れることとなった。

がん遺伝子はその活性化により癌化を引き起こすのに対し、がん抑制遺伝子は正常機能の喪失(不活化)により細胞を癌化させる遺伝子群である<sup>17)</sup>。この遺伝子は、両親由来の一对の遺伝子の両方が、突然変異や欠失により共に不活化されることで、癌化や癌の進展の一段階を担うと考えられている<sup>17)</sup>(Knudsonのtwo hit説)。50種類近く存在すると考えられているがん抑制遺伝子のうち、現在単離・同定されているものはわずか8種類であり、同定されているものについても、個々の症例での不活化を解析するのは多大な労力を要する。そこで間接的に多型性を示すプローブを用いたヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity: LOH)を証明することにより、同部位又は近傍に存在するがん抑制遺伝子の不活化を推定可能である<sup>18)</sup>。この方法により、かつては遺伝子レベルの異常があまり認められなかつたヒト卵巣癌でも3p, 6q, 11p, 17p, 17qのLOHが高頻度にみつき<sup>19)~24)</sup>、これらの部位に卵巣癌に関与するがん抑制遺伝子が存在する可能性が考えられるようになってきた。

本研究ではこれらのうち第17染色体のLOHに注目し、17p13.3(pYNZ22)および17q23-25(pTHH59)におけるLOHの検討を行った。更に17p13.1に存在するがん抑制遺伝子p53<sup>25)</sup>のLOHについても併せて検討し、pYNZ22による17p13.3のLOHの結果と比較検討することで、卵巣癌における第17染色体欠失の意義についても考察した。

#### 研究対象および方法

21例の上皮性卵巣癌症例を対象とした。組織型および臨床進行期は表1に示す。

手術時に得られた卵巣癌組織と正常組織よりSDS-proteinase K法により高分子量DNAを抽出し、制限酵素(BglII・BanII: p53をプローブとする場合, BamHI: pYNZ22をプローブとする場合, 又はPvuII: pTHH59をプローブとする場合; 宝酒造)で切断後アガロース電気泳動を行い、

ナイロンフィルター(日本ポール, Biodyne A)にSouthern transferした。フィルターは<sup>[32P]</sup>で標識したプローブと50%formamide, 5×SSC, 5×Denhalt's solution, 0.25%SDS, 100μg/ml変性サケ精子DNA溶液中で37℃で一晩ハイブリダイズさせ、1×SSC/0.1%SDS中室温下で20分×4回、次に0.1×SSC/0.5%SDS中で50℃1時間洗浄後、オートラジオグラフィーを行った。プローブはhuman p53<sup>26)</sup>(Dr.L. Crawfordより供与), pYNZ22<sup>27)</sup>, pTHH59<sup>27)</sup>(中村祐輔博士, JCRB遺伝子バンクより供与)を用い、これらのプローブの認識する遺伝子の第17染色体上の位置は図1に示した。p53のBglII切断では、12kb(A<sub>1</sub>)又は9kb(A<sub>2</sub>)のバンドが染色体により多型性を示すバンドであり、3kbのバンドは常にみられる<sup>28)</sup>。A<sub>1</sub>およびA<sub>2</sub>が共にみられたものがヘテロ接合性で片方のみがホモ接合性とした。またBanII切断では2.9kb(A<sub>1</sub>)又は1.5/1.4kb(A<sub>2</sub>)のバンドが染色体により多型性を示す<sup>28)29)</sup>が、これらが共にみられたものがヘテロ接合性で片方のみがホモ接合性とした。pYNZ22とpTHH59のVNTRプローブ<sup>27)</sup>においては、2本のバンドに分かれたものを

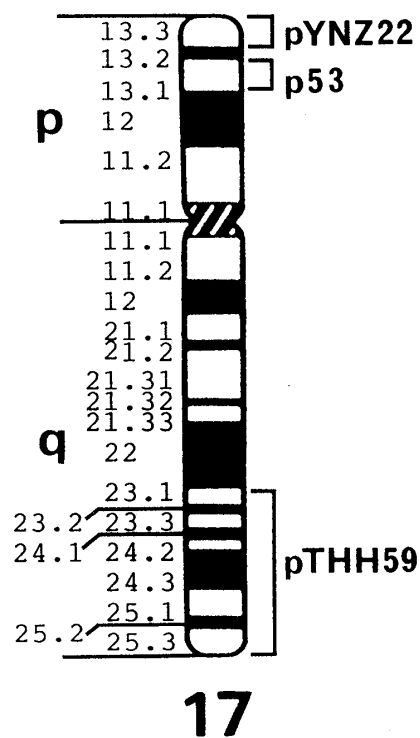


図1 各プローブの第17染色体上における位置

表1 組織型, 臨床進期と loss of heterozygosity

No.	組織型	臨床進期	位置		17p13.1		17p13.3	17q23-25
			プローブ	制限酵素	p53		pYNZ22	pTHH59
					BglII	BanII	BamHI	PvuII
1	SPCA	IIIc			●	×	●	×
2	SPCA	IIIc			×	●	○	×
3	SPCA	IIIc			●	●	●	×
4	SPA	IIIc			×	○	○	ND
5	SPA	IIIc			ND	×	●	ND
6	SPA	IIIc			○	×	○	×
7	SPA	IIIc			×	○	○	●
8	SCA	IIIc			○	○	○	○
9	SCA	IIIc			●	ND	●	●
10	SCA	IIIc			×	×	○	×
11	SCA	IV			ND	×	○	ND
12	SA	IIIb			○	○	●	ND
13	SA	IV			×	●	○	×
14	MCA	Ia			●	●	○	×
15	MCA	IIIc			●	×	●	×
16	MCA	IV			×	×	●	●
17	E	Ic			×	×	●	×
18	E	IIIc			×	×	●	×
19	C	Ia			×	×	×	●
20	C	Ic			×	●	●	●
21	C	IIIc			●	●	●	●
LOH の頻度					5/14(36%)	9/20(45%)	1/7(14%)	

上欄には各プローブの染色体上の位置と分析に用いた制限酵素を示してある。

組織型: SPCA; serous papillary cystadenocarcinoma, SPA; serous papillary adenocarcinoma, SCA; serous cystadenocarcinoma, SA; serous adenocarcinoma, MCA; mucinous cystadenocarcinoma, E; endometrioid carcinoma, C; clear cell carcinoma, ×: homozygous, ●: heterozygous, ○: loss of heterozygosity, ND: not determined

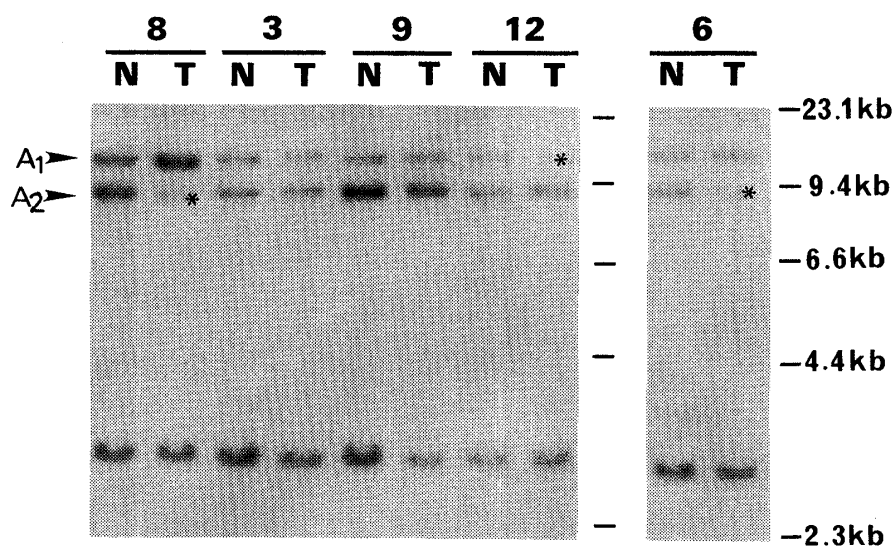


図2 p53の BglII 切断による loss of heterozygosity.

N: 正常組織, T: 腫瘍組織, A<sub>1</sub>および A<sub>2</sub>: allelic なバンド, 腫瘍組織で消失のみられるバンドを\*で示した. 上段の数字は表1の No. に対応.

ヘテロ接合性, 1本しかみられないものをホモ接合性とし, いずれのプローブも正常組織でヘテロ接合性のみられたものを **informative**, これらのうち癌組織におけるどちらかの一方のバンドの消失又は著しい濃度の減少を LOH とみなした.

### 研究成績

p53をプローブに用いた場合, BglII 切断, BanII 切断を合わせて **informative** なものは21例中14例あり, そのうち5例(No. 4, 6, 7, 8, 12, 36%)に LOH を認めた (表1, 図2・3). pYNZ22を

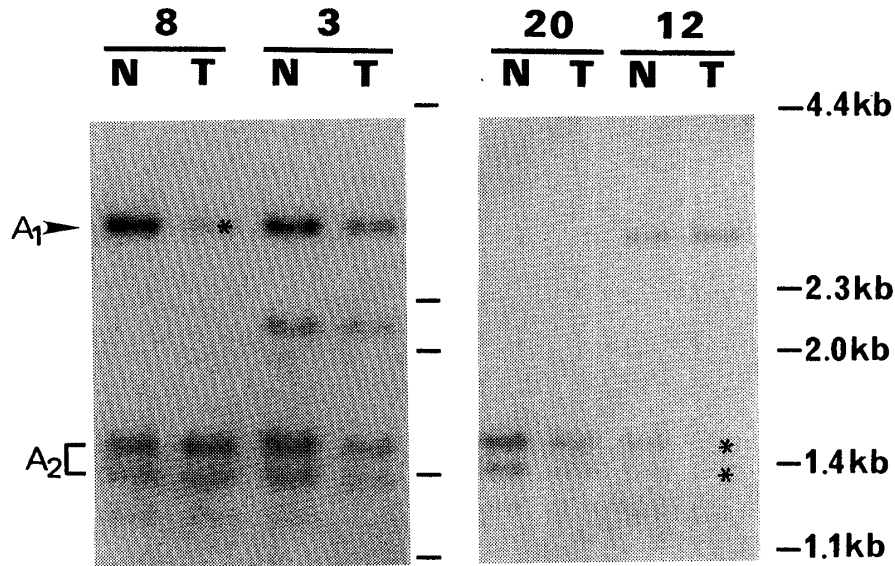


図3 p53の BanII 切断による loss of heterozygosity.

N: 正常組織, T: 腫瘍組織, A<sub>1</sub>および A<sub>2</sub>: allelic なバンド, 腫瘍組織で消失のみられるバンドを\*で示した. 上段の数字は表1の No. に対応.

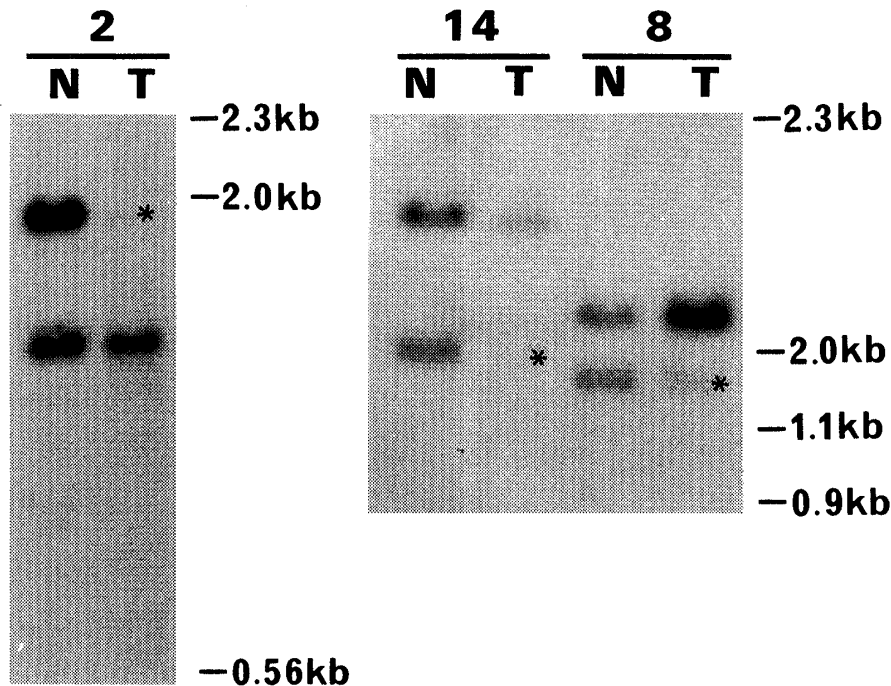


図4 pYNZ22の loss of heterozygosity.

N: 正常組織, T: 腫瘍組織. 腫瘍組織で消失のみられるバンドを\*で示した. 上段の数字は表1の No. に対応.

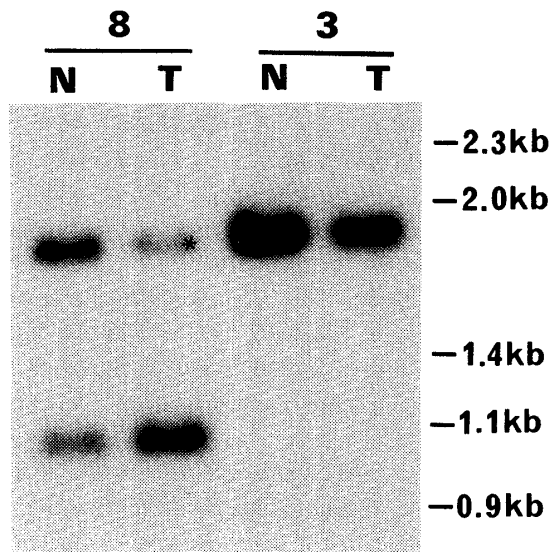


図5 pTHH59の loss of heterozygosity.

N: 正常組織, T: 腫瘍組織. 腫瘍組織で消失のみられるバンドを\*で示した. 上段の数字は表1のNo. に対応.

プローブに用いた場合, BamHI 切断で informative なものは20例あり, そのうち9例(No. 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 45%)に LOH を認めた(表1, 図4). pTHH59をプローブに用いた場合, PvuII 切断で informative なものは7例あり, そのうち1例(No. 8, 14%)に LOH を認めた(表1, 図5). また17p上の二つのプローブ, p53と pYNZ22が両方とも informative なものは14例あり, そのうちNo. 4, 6, 7, 8の4例では p53と pYNZ22で同時に LOH を認めたが, No. 2, 13, 14の3例では pYNZ22のみで, No. 12では p53のみで LOH がみられ, 残りの6例はいずれのプローブでも LOH を認めなかつた.

$\chi^2$ 検定による pYNZ22および p53の LOHの有無と組織型又は臨床進行期との関係, 一般化 Wilcoxon 検定による pYNZ22および p53の LOHの有無と予後との関係は認められなかつた.

### 考 案

近年の癌の遺伝子レベルの研究の進歩により, 癌は数ステップの遺伝子異常の蓄積により発生・進展していくという, 多段階発癌説が定説となつてきている. 例えば Fearon and Vogelstein によつて提唱された大腸の癌化のモデル<sup>30)</sup>では, 腺腫

の発生には5qの欠失が, 腺腫の進行には K-ras の突然変異や18qの欠失が, 腺腫から腺癌への移行には17pの欠失すなわち p53の不活化が, 更にその進展には別の遺伝子異常が関与していると考えられている. 現在ではこのモデルにもいくつかの修正が必要という議論もあるが, 基本的には種々の腫瘍で類似したモデルが提唱されつつある. これらの遺伝子異常は, がん遺伝子の活性化とがん抑制遺伝子の不活化に大別され, 個々の腫瘍におけるモデルの提唱には, 多角的な遺伝子異常の検索が必須である.

前述したように, ヒト卵巣癌ではがん遺伝子活性化の報告が少ない. 一方遺伝子欠失については, 3p, 6q, 11p, 17p, 17qにおける高頻度の LOH<sup>19)~24)</sup>の多数の報告があり, これらの部位又はその近傍には卵巣癌に関与する複数のがん抑制遺伝子が存在する可能性が考えられる. 今回の検討では17pに存在するがん抑制遺伝子 p53の LOH は36%にのぼり, この遺伝子の不活化が癌の発生・進展のひとつの段階を担っている例があることを示唆している. そしてこのような遺伝子異常検索の集積がヒト卵巣癌の発癌モデル提唱に貢献すると思われる.

大腸癌のモデルの17p欠失のターゲットが p53であるということは, Baker et al.<sup>31)</sup>が同定した大腸癌の17pの共通欠失部位は17p12-17p13.3の領域で, この領域は p53を含んでいるという報告により裏付けられた. しかし同様に高頻度の17pの欠失がみられる乳癌の共通欠失部位は2箇所あり, ひとつは p53を含む領域であるが, もうひとつは p53よりテロメア側の17p13.3であることが判明し<sup>32)33)</sup>, 17p13.3には p53とは異なるがん抑制遺伝子の存在が推定されている.

一方ヒト卵巣癌の17p13.3の LOH については, 現在のところ統一見解は全く得られていない. 我々の成績では, pYNZ22の LOH は45%, p53の LOH は36%と他の報告<sup>21)~24)</sup>とほぼ一致しており, また両プローブとも informative なもののうち, 4例は共に LOH を認めたが, 残りの4例は一方のみの欠失であつた. これらの結果からは両者の遺伝子欠失の関係を結論付けることは難しい

が、以下のような二通りの解釈が可能と思われる。

(1) pYNZ22の LOH は p53の LOH に伴いテロメア側が共に欠失した状態であるが、本法では検出できない p53の微小領域の欠失や調節領域の欠失、又は pYNZ22プローブでは検出し得ない微小な欠失を見落としている可能性が考えられる。すなわち17p欠失のターゲットは p53であるが、本法で検出できる欠失はプローブとハイブリダイズする領域を含みかつ広範囲の欠失に限られているため、p53と pYNZ22の LOH が完全に一致しなかつたとも考えられる。

(2) 卵巣癌の発生・進展には少なくとも17p13.1にある p53と、pYNZ22と連鎖するような p53とは異なる未知のがん抑制遺伝子が関与している可能性も考えられる。この遺伝子は、乳癌において17p13.3にあると推定されているがまだ同定されていない遺伝子と同一である可能性がある。

以上のように、今回の成績からヒト卵巣癌の発生・進展には p53の欠失が関与する例のあることが示唆された。また17p13.3の欠失については、p53欠失に伴いテロメア側が共に欠失した可能性と、同部位に卵巣癌に関与する別ながん抑制遺伝子の存在する可能性の二つが考えられた。今後第17染色体の異常をより詳細に検討し、発癌や癌の進展における意義を解明していく予定である。

稿を終えるに当たり、プローブを供与して下さった Dr. L. Crawford, 癌研究所中村祐輔博士, JCRB 遺伝子バンクに感謝し、また実験指導して下さいた日本医科大学老人病研究所野村信夫助教授・小山美弥先生、並びに帝京大学医学部細菌学教室村山琮明先生に深謝致します。

なお本研究の一部は、文部省科学研究費課題番号 04857193によつた。

#### 文 献

1. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *New Engl J Med* 1985; 313: 1111-1116
2. Zhou D, Battifora H, Yokota J, Yamamoto T, Cline MJ. Association of multiple copies of the c-erbB-2 oncogene with spread of breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 6123-6125
3. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182
4. Grinewald K, Lyons J, Fröhlich A, Feichtinger H, Weger RA, Schwab G, Janssen JW, Bartram CR. High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1989; 43: 1037-1041
5. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297
6. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 1983; 306: 239-242
7. 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* 1990; 42: 259-263
8. Zhang X, Silva E, Gershenson D, Hung M. Amplification and rearrangement of c-erbB proto-oncogenes in cancer of human female genital tract. *Oncogene* 1989; 4: 985-989
9. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712
10. Tyson FL, Boyer CM, Kaufman R, O'Brian K, Cram G, Crews JR, Soper JT, Daly L, Fowler WC Jr, Haskill JS, Bast RC Jr. Expression and amplification of the HER-2/neu(c-erbB-2) protooncogene in epithelial ovarian tumors and cell lines. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 640-646
11. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P, McKenzie S, Yin S, Bast RC Jr. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 4087-4091
12. Feig LA, Bast RC, Knapp RC, Cooper GM. Somatic activation of ras<sup>k</sup> gene in a human ovarian carcinoma. *Science* 1984; 223: 698-701
13. Haas M, Isakov J, Howell SB. Evidence against ras activation in human ovarian car-

- cinomas. *Mol Biol Med* 1987 ; 4 : 265—275
14. *van't Veer LJ, Hermens R, van den Berg-Bakker LAM, Cheng NC, Fleuren GJ, Bos JL, Cleton FJ, Schrier PI.* ras oncogene activation in human ovarian carcinoma. *Oncogene* 1988 ; 2 : 157—165
  15. *Smith DM, Groff DE, Pokul RK, Bear JL, Delgado G.* Determination of cellular oncogene rearrangement or amplification in ovarian adenocarcinomas. *Am J Obstet Gynecol* 1989 ; 161 : 911—915
  16. *Masuda H, Battifora H, Yakata J, Meltzer S, Cline MJ.* Specificity of proto-oncogene amplification in human malignant diseases. *Mol Biol Med* 1987 ; 4 : 213—227
  17. 横田 淳, 鮫島勇一. がん抑制遺伝子. 血液・腫瘍科 1990 ; 21 : 54—61
  18. 高井新一郎, 田中規文, 辛 栄成, 山本正之. 臨床医学と癌抑制遺伝子. 癌と化療 1990 ; 17 : 1281—1286
  19. *Lee JH, Kavanagh JJ, Wharton T, Wildrick DM, Blick M.* Allele loss at the c-Ha-ras1 locus in human ovarian cancer. *Cancer Res* 1989 ; 49 : 1220—1222
  20. *Ehlen T, Dubeau L.* Loss of heterozygosity on chromosomal segments 3p, 6q and 11p in human ovarian carcinomas. *Oncogene* 1990 ; 5 : 219—223
  21. *Lee JH, Kavanagh JJ, Wildrick DM, Wharton JT, Blick M.* Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 6q, 11, and 17 in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 2724—2728
  22. *Eccles DM, Cranston G, Steel CM, Nakamura Y, Leonard RCF.* Allele losses on chromosome 17 in human epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene* 1990 ; 5 : 1599—1601
  23. *Russell SEH, Hickey GI, Lowry WS, White P, Atkinson RJ.* Allele loss from chromosome 17 in ovarian cancer. *Oncogene* 1990 ; 5 : 1581—1583
  24. *Sato T, Saito H, Morota R, Koi S, Lee JH, Nakamura Y.* Allelotype of human ovarian cancer. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 5118—5122
  25. 大山恭司, 瀬川 薫. 癌抑制遺伝子としての p53 遺伝子. 蛋白質核酸酵素 1991 ; 36 : 1887—1899
  26. *Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV.* Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987 ; 7 : 961—963
  27. *Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R.* Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987 ; 235 : 1616—1622
  28. *Okamoto A, Sameshima Y, Yokoyama S, Tera-shima Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J.* Frequent allelic losses and mutations of the p53 gene in human ovarian cancer. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 5171—5176
  29. *Masharani U, Wolf D, Frossard PM.* BanII and ScaI RFLPs at the human p53 gene locus. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 7757
  30. *Fearon ER, Vogelstein B.* A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 ; 61 : 759—767
  31. *Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Led-better DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989 ; 244 : 217—221
  32. *Coles C, Thomopson AM, Elder PA, Cohen BB, Mackenzie IM, Cranston G, Chetty U, Mackay J, Macdonald M, Nakamura Y, Hoyheim B, Steel CM.* Evidence implicating at least two genes on chromosome 17p in breast carcinogenesis. *Lancet* 1990 ; 336 : 761—763
  33. *Sato T, Tanigawa A, Yamakawa K, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y.* Allelotype of breast cancer: Cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* 1990 ; 50 : 7184—7189

(No. 7340 平 5・2・12 受付)