特集 3

MASA 法による変異遺伝子の検出とその臨床応用

熊本大学第2外科

林 尚子 江上 寛 高野 定 小川 道雄

大阪成人病センター外科

中 森 正 二 今 岡 真 義

東京大学医科学研究所分子病態施設

中 村 祐 輔

Mutant-allele-specific amplification (MASA) 法により、約1万個の正常細胞中に含まれる遺伝子変異をもつ1個の腫瘍細胞を簡便に検出することができる。組織学的にリンパ節転移陰性と診断された大腸癌手術症例120例について、リンパ節に原発巣と同じ遺伝子変異が存在するか否か MASA 法を用いて検討した。原発巣に K-ras あるいは p53 遺伝子の変異を認めたのは71例であり、遺伝子診断でリンパ節転移陽性とされた37例中27例は術後5年以内に再発し、転移陰性とされた34例は全例において再発はみられず、遺伝子診断によるリンパ節転移と予後には高い相関が認められた。また、膵癌の早期診断を目的とし本法を用い、膵液中の変異 K-ras 遺伝子の検出を行ったところ、膵癌の80% (5例中4例) に膵液中から変異を検出できた。本法を臨床応用することで、正確な予後判定や癌の早期診断が可能になるものと思われる。

Key words: mutant-allele-amplification (MASA) method, lymph node metastasis of colorectal cancer, K-ras gene mutations in pancreatic juice

はじめに

発癌過程に癌遺伝子、癌抑制遺伝子、ミスマッチ修復遺伝子の異常が関与している。これらの遺伝子異常を癌細胞の指標とすることは、癌の早期診断、浸潤・転移の判定に有用である。遺伝子の変異解析には、検体より DNA を抽出し、目的とする遺伝子を PCR で増幅し、シーケンスを行うのが一般的であるが、日常臨床の場で行うには繁雑である。また、PCR 法により、微量の遺伝子の検出は容易になったものの、多量の正常細胞中から1個の変異遺伝子をもつ細胞を検出することは、その変異が正常型で希釈されてしまうため困難である。

既知の遺伝子異常を最も効率よく検出する方法の1つとして、mutant-allele-specific amplification (MASA) 法¹⁾が開発された。この MASA 法を微量の

変異遺伝子を鋭敏に検出する方法として、癌の診断に応用するため、その感度を明らかにするとともに、臨床的意義について検討した。

1. MASA 法の原理と感度:

Fig. 1 のように、3'末端が変異特異的塩基になるよう設定した合成オリゴヌクレオチドプライマーを用い、厳密な条件設定のもとに PCR 反応を行うと、多量の正常遺伝子中に混在するごく少量の変異遺伝子の特異的に検出することができる¹⁾。

本法の検出感度を調べるため、K-ras 遺伝子のコード

Fig. 1 Principle of mutant-allele-specific amplification (MASA) method

* 第48回日消外会総会シンポ1・消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開

<1996年12月11日受理>別刷請求先: 小川 道雄

〒860 熊本市本庄1-1-1 熊本大学医学部第2外科

Fig. 2 PCR amplification (MASA) after serial dilution of k-ras mutant DNA

M: marker, 1: mutant DNA 100ng, 2: mutant DNA 10ng/total DNA 100ng, 3: mutant DNA 1 ng/total DNA 100ng, 4: mutant DNA 0.1ng/total DNA 100ng, 5: mutant DNA 0.01ng/total DNA 100ng, 6: mutant DNA 0.001ng/total DNA 100ng, 7: normal DNA 100ng

M 1 2 3 4 5 6 7

ン13GGCがGACと変異する大腸癌のDNAと正常型のDNAを準備した。この変異がプライマーの3'末端に対応するような変異プライマーを作製し、変異遺伝子のみが増幅されるようにPCRの条件を設定した。その厳密な条件のもとで、変異遺伝子を正常遺伝子で希釈し、PCRを行い、検出感度を測定した。

その結果、**Fig. 2**に示すように、1万倍の希釈までの変異遺伝子を検出することができた。その感度は、約0.01%であり、他の方法の最高感度が0.1%であるのに比べて最も感度が高かった²⁾。

このように、MASA法により、既知の遺伝子異常を鋭敏にしかも簡便に検出することができるため、我々は、この方法をヒト癌における点突然変異の検出（微小リンパ節転移診断、手術操作により散布された癌細胞の検出、脾液を用いた脾癌の早期診断など）に応用している。ここでは、大腸癌のリンパ節転移診断と脾液中の変異K-ras遺伝子検出について紹介する。

2. MASA法を用いた大腸癌のリンパ節転移診断：

遠隔転移のない大腸癌手術症例で、組織学的にリンパ節転移陰性（ n_0 ）で5年以内に再発した症例45例と、 n_0 でかつ術後再発しなかった症例75例について、まず、原発巣におけるK-ras, p53遺伝子の変異を検索した。

大腸癌では、APC, K-ras, p53, NF2などの癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異が報告されている³⁾⁴⁾。K-ras

Table 1 Correlation of recurrence with lymph node metastasis by genetic method

	Recurrence		Total No.
	+	-	
Genetic diagnosis			
+	27	10	37
-	0	34	34
Total No.	27	44	71

$p < 0.0001$

Table 2 Occurrence of micrometastasis for lymph nodes in relation to Dukes' stages

Dukes' stage	Cancer with recurrence [gn(+)(%)]	Cancer without recurrence [gn(-)(%)]	p
A	8/8 (100)	10/31 (32.3)	0.0007
B	19/19 (100)	0/13 (0)	<0.0001
Total	27/27 (100)	10/44 (22.7)	<0.0001

の点突然変異はコドン12, 13, 61に大腸癌の約40%に認められ、APC, p53の変異は約70~80%に認められる。原発巣で癌細胞がこれらの遺伝子変異をもつ場合、転移巣における癌細胞も原発巣と同一変異をもつことが確認されている⁵⁾ことから、今回は、スクリーニングが比較的容易なK-ras, p53の変異を癌細胞のマーカーとすることにした。

K-ras 遺伝子変異の検索には、コドン12, 13, 61についてMASA法を用い、p53遺伝子はエクソン5-8についてSSCPおよび直接シーケンス法により変異を同定した。原発巣に変異の同定された症例について、リンパ節に原発巣と同じ病変をもつ細胞が存在するかどうか調べるため、それぞれの変異に相当するプライマーを設計し、リンパ節より抽出したDNAを鋳型とし、MASA法を行い検索した。

原発巣にK-rasあるいはp53遺伝子の変異を認めた症例は、 n_0 再発例45例中27例、 n_0 非再発例75例中44例であり、これらの症例のリンパ節について検索を行った。**Table 1**に示すように、遺伝子診断でリンパ節転移陽性[gn(+)]とされた37例中27例は、術後5年以内に再発し、遺伝子診断でリンパ節転移陰性[gn(-)]とされた34例では術後5年経過しても全例において再発はみられなかった。また、再発例はすべて遺伝子診断でリンパ節転移陽性であった。

さらに、これらの症例をDukes' stageに従い分類

法を検査室に導入した場合の模式図を **Fig. 3** に示す。術前の CF、生検で原発巣の遺伝子変異があらかじめわかっていれば、術後早ければ 2 日で遺伝子レベルでのリンパ節転移の結果が判明することは、臨床的に有用と考える。この方法を臨床に応用することにより、癌の診断だけでなく、各症例における腫瘍の広がりを個別に評価し、それに応じた治療戦略をたてることが可能となるであろう。

文 献

- 1) Takeda S, Ichii S, Nakamura Y: Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum Mutat* 2 : 112—117, 1993
- 2) Hayashi N, Arakawa H, Nagase H et al:

Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res* 54 : 3853—3856, 1996

- 3) Bishop J: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64 : 235—248, 1991
- 4) Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science* 254 : 1138—1146, 1991
- 5) Losi L, Benhattar J, Costa J: Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. *Eur J Cancer* 28 : 1115—1120, 1992
- 6) Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A et al: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet* 345 : 1257—1259, 1995

Detection of Genetic Alterations by MASA Method and its Clinical Application

Naoko Hayashi, Hiroshi Egami, Sadamu Takano and Michio Ogawa

Department of Surgery II, Kumamoto University Medical School

Shoji Nakamori and Shingi Imaoka

Department of Surgical Oncology, Center for Adult Diseases

Yusuke Namamura

Laboratory of Molecular Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo

The mutant-allele-specific amplification (MASA) method is capable of detecting one tumor cell containing genetic changes in a sample containing 10,000 normal cells. We screened 120 colorectal cancers from patients who had no histologically detectable lymph-node metastasis at the time of operation for K-ras and p53 mutations, and examined corresponding regional lymph nodes at the genetic level by the MASA method. Somatic mutations were identified in 71 tumors; 27 of 37 patients with genetically positive lymph nodes had a tumor recurrence within 5 years of surgery; none of 34 patients without genetically confirmed lymph node metastasis had a recurrence. Thus, we found that tumor cells in lymph nodes identified by this genetic method had prognostic significance. We also analyzed DNA samples from pancreatic juice for the K-ras mutation, to diagnose pancreatic cancer in the early stage. K-ras mutations in pancreatic juice were detected in 4 of 5 (80%) with pancreatic cancer. Hence, clinical application of the MASA method may be useful for determining the prognosis of cancer patients and for detecting cancer in the early stage.

Reprint requests: Michio Ogawa Department of Surgery II, Kumamoto University Medical School
1-1-1 Honjo, Kumamoto, 860 JAPAN