— 原 著 —

ヒト原発性肺癌の *myc* 遺伝子異常とヌードマウスに対する 可移植性との相関についての研究

弦間 昭彦

日本医科大学臨床病理学教室 (主任・指導: 仁井谷久暢教授)

The relation between *myc* family gene abnormality in lung cancers and xenotransplantability

Akihiko Gemma

Department of Clinical Pathology (Director: Prof. Hisanobu Niitani), Nippon Medical School

Thirty-four primary lung cancers were analyzed for abnormalities in the *myc* family genes (*c-myc*, *N-myc*, *L-myc*), using the Southern blot hybridization method. They were subcutaneously transplanted into nude mice. The Southern blot analysis showed that *c-myc* and *L-myc* genes were amplified in 4 non-small cell carcinomas and 3 small cell carcinomas respectively. Allelic deletion of the *L-myc* gene was observed in 7 cancers, including 2 carcinomas which also had an additional band of the *c-myc* gene or amplification of the *L-myc* gene. No abnormalities in the *N-myc* gene were observed in this study. Of 13 cancers with abnormalities in the *myc* family genes, 11 including all tumors with *myc* gene amplification were transplantable to nude mice. Of 21 tumors without any abnormalities in the *myc* family genes, however, only 6 were transplantable to nude mice ($p < 0.005$). These results indicate that abnormalities in the *myc* family genes, especially gene amplification might promote tumor-forming capacity in xenotransplantation of lung cancers and this phenomenon might be closely related to the function of the *myc* gene.

Key words: *myc* family gene, human lung cancer, nude mice, Southern blot hybridization

緒 言

最近の遺伝子操作技術の向上, 分子生物学の進歩に伴い, 悪性腫瘍の分野でも癌遺伝子と呼ばれる特定の遺伝子が, 癌の発生, 増殖, 分化などに関係していることが示されてきた¹⁻³⁾. また, 実際に多くのヒト癌において, 点突然変異^{4,5)}, 増幅⁶⁻⁹⁾, 転座¹⁰⁻¹²⁾, 発現異常^{9,13)}などの癌遺伝子異常が検出されるに至っている. それら癌遺伝子の中で, *myc* 遺伝子, 特に, *c-myc* 遺伝子の検討が進んでおり, 白血病^{6,8)}, 大腸癌⁷⁾, 胃癌¹⁴⁻¹⁶⁾, 乳癌¹⁷⁾, 肺癌⁹⁾などの培養細胞, 手術摘出腫瘍組織やヌードマウス移植腫瘍などで *c-myc* の増幅が多く報告されている. また, その機能については, 増殖制御^{18,19)}, 形質転化²⁰⁾や分化²¹⁾などとの関係が示唆

されている. *N-myc* の増幅は, 神経芽腫において, 臨床病期, 予後と密接に関係しているという報告が注目されている^{22,23)}. *L-myc* は, *c-myc*, *N-myc* とホモロジーのある肺小細胞癌培養細胞より得られた DNA で, 肺小細胞癌に増幅が認められている²⁴⁾. しかし, *L-myc* の増幅が, どのような役割を果たしているか, いまだに明確にされていないのが現状である.

一方, ヒト原発性肺癌に限った場合でも, *myc* 遺伝子の異常は高頻度で検出されており, ヒト肺癌における *myc* 遺伝子の異常の意味を明らかにすることは重要なことと考えられる^{9,25-28)}. 今回, 著者は, ヒト肺癌における *myc* 遺伝子異常の意義を明らかにするために, ヒト肺癌原発巣をヌードマウス皮下に移植し, 腫瘍の可移植性と *myc* 遺伝子異常の関係を検討した.

Correspondence to Akihiko Gemma, Department of Clinical Pathology, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

研究材料および方法

(1) 動物

実験には、BALB/c nu/nu マウス雄 6～10 週齢を用いた。動物は、クレア社より供給されたものを用いた。これは specific pathogen free (SPF) の状態で飼育されたものである。

(2) 腫瘍

移植に用いた腫瘍は、国立がんセンター病院にて、1986 年 9 月～1987 年 9 月までの間に、切除された原発性肺癌 34 例である。内訳は、扁平上皮癌 7 例、腺癌 10 例、大細胞癌 7 例、小細胞癌 6 例、腺扁平上皮癌 2 例、未分化癌小細胞型および腺様嚢胞癌それぞれ 1 例であった。

(3) 腫瘍の移植

手術により得られた上記腫瘍を RPMI-1640 培養液 (GIBCO, laboratories) に植え、無菌操作にて約 2 mm 角片に細切後、2～3 個を生後 6～10 週齢のマウス側腹部皮下に移植した。一群は通常 2～3 匹とした。残存する腫瘍の一部は、形態診断用にホルマリン固定パラフィン包埋切片とし、一部を DNA 抽出のため、 -80°C で冷凍保存した。移植腫瘍は、週 2 回、12 週にわたり観察した。直径 5 mm 以上になり、なお増殖傾向を示し、形態学的に確認されたものを生着したと判定した。

(4) 組織学的検討

原発巣およびヌードマウス移植腫瘍の一部をホルマリン固定パラフィン包埋切片にし、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、光顕的に観察した。

(5) *myc* 遺伝子の検討

DNA 抽出は、Blin and Stafford の方法²⁹⁾に基づいて行った。約 200～300 g の組織に 500 mM EDTA (pH 8.0)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K、0.5% sarcosyl より構成される溶液 10 ml を加え、ステンレス製乳鉢で摩砕、homogenize した後、 50°C 、3 時間 incubate した。次に、等量のフェノールを加え、3,000 rpm、6 分間遠心し、上層のフェノール層を除いた。同様のフェノール抽出を 3 回行った後、水層を透析セルロースチューブ (Viskase Sales Corp.) に入れ、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA (pH 8.0)、10 mM NaCl を含む溶液に対して 4°C 、一夜で透析を行った。その後、RNase を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、 37°C 、3 時間反応させた。次に、等量のフェノール、クロロホルム (1 : 1) 混合液を加え、3,000 rpm、6 分間遠心し、

上層の水層を抽出する操作を 2 回繰り返した。最後に、水層に 3 倍量のエタノールおよび 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムで沈殿をつくり、DNA 画分とした。抽出した DNA 5 μg に、種々の濃度の制限酵素 (*Pvu*II, *Eco*RI, *Bam*HI) (宝酒造) 約 20 unit と制限酵素用 buffer (各々 M, H, M) (東洋紡) 2 μl を加え、 37°C 、3 時間の条件で消化し、消化した DNA を 0.7% アガロースゲル内にて、定電流 90 mA で電気泳動した。ゲルは、電気泳動後、アルカリ液 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) に浸し、1 時間静置し、次に、中和液 (3 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5) に 1 時間浸した。

その後、Southern の方法³⁰⁾に従って、ゲル、ニトロセルロース膜、ペーパータオルを下から順に重ねて、20×SSC (saline sodium citrate) を毛細管現象を利用し吸い上げることで、DNA をニトロセルロース膜にトランスファーした。そして、*myc* 遺伝子をプローブにハイブリダイゼーションを行った。用いたプローブ (*c-myc* 第 1 エクソン²⁶⁾, *N-myc* 第 2 エクソン³¹⁾, *L-myc*²⁴⁾) 0.1 μg は、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 3,000 Ci/mmol (Amershamd) 5 μl とともに、DNase 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 0.5 μl 、DNA polymerase (Kornberg) 5 unit/ μl 1 μl と 16°C 、1 時間反応させて標識した。ハイブリダイゼーションは、6×SSC (saline sodium citrate)、10 mM EDTA、5×Denhart's solution、0.5% sodium dodecyl sulfate、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured salmon sperm DNA、10% dextran sulfate、50% formamide の混合液中に、DNA をトランスファーしたニトロセルロース膜と標識したプローブとを入れ、 42°C 、18～20 時間 incubate して行った。

オートラジオグラフィーは、Kodak XRP-5 のフィルムと増感紙を用いて、 -80°C にて行った。

なお、*c-mos*³²⁾, *N-ras*³³⁾ を含む多くのコントロールプローブについても同様の検索を行った。コントロールの試料として患者の正常肺組織を用いた。

増幅については、正常肺組織の 3 倍以上のものを増幅とした (デンスitomーター、Bio-rad Model VD620 (Richmond, CA, U.S.A.) を用い測定した)。欠失は、遺伝子の部分的消失であり、*myc* 遺伝子では RFLP (restriction fragment length polymorphism) を示す *L-myc* (制限酵素 *Eco*RI) について検討を行い、*L-myc* の heterozygosity が認められた個体で、腫瘍において片方の band が消失したもののみを欠失とした²⁴⁾。

結 果

1. 組織型と生着率

ヌードマウスに移植し検討したヒト原発性肺癌は34例であり、そのうち生着したのは、17例、生着率は50%であった。組織型別に生着率をみると、扁平上皮癌、大細胞癌7例中5例、71%、小細胞癌6例中4例、67%、腺癌10例中2例、20%となり、他組織型と比較して、腺癌は、低い生着率を示す傾向にあった (Table 1)。

2. 臨床病期と生着率

移植した原発性肺癌の臨床病期分類と生着率について検討した。臨床病期分類として、1987年日本肺癌学会肺癌取扱い規約病期分類を用いた。病期別にみると、I期5例、II期2例、IIIA期17例、IIIB期5例、IV期5例であったが、生着率と臨床病期の間に特に有意な傾向は認められなかった (Table 2)。

Table 1 Transplantability of various lung cancers into nude mice

Histological type	No. of tumors transplanted	No. of tumors with take
Squamous cell ca.	7	5
Adenocarcinoma	10	2
Large cell ca.	7	5
Small cell ca.	6	4
Adenosquamous ca.	2	1
UC. small cell type	1	0
Adenoid cystic ca.	1	0
Total	34	17

ca., carcinoma.

UC., undifferentiated carcinoma.

Table 2 Clinical stage and transplantability into nude mice

Clinical stage ^{a)}	No. of tumors transplanted	No. of tumors with take
I	5	3
II	2	0
IIIA	17	8
IIIB	5	3
IV	5	3

^{a)} Clinical stage is based on the staging criteria of UICC.

3. *myc* 遺伝子と生着率

移植した原発腫瘍について、DNAを抽出し、Southern blotting hybridization法にて、*myc* 遺伝子 (*c-myc*, *N-myc*, *L-myc*) の検討を行った。*c-myc* の異常は、増幅が4例 (大細胞癌2例、扁平上皮癌1例、腺癌1例) に認められた (Fig. 1)。この中では巨細胞癌の成分を有する大細胞癌で最も高度の増幅を認めた。*L-myc* の異常は、増幅3例 (小細胞癌3例)、欠失7例 (扁平上皮癌2例、腺癌2例、大細胞癌2例、小細胞癌1例) に認められた (Fig. 2, 3)。*N-myc* の異常は、今回の検討では認められなかった。

なお、*L-myc* の欠失を認めた例の中に *c-myc* の additional band が認められた1例と *L-myc* の増幅した1例が含まれていた。この additional band は、DNAを *PvuII* で消化しハイブリダイズした時、8 kb の位置に認められた。現在、この additional band について、詳細な検討を行っているが、転座の可能性と新しい *myc* family gene である可能性が考えられている (Table 3)。

これらの異常とヌードマウスへの生着の関係を検討すると、*myc* 遺伝子異常を認めた13例のうち、11例の症例がヌードマウス皮下に生着した。なお、この生着した11例の中には増幅を認めた8例すべてが含まれていた。この生着率84.6% (11/13) は、21例中6

Fig. 1 *c-myc* gene amplification in a large cell carcinoma with a giant cell component. DNA from the primary tumor (C) and normal lung tissue (N) of the patient and from the xenograft (NUDE) was digested with *EcoRI* and hybridized with *c-myc* and *fos* probes. The *c-myc* band is amplified in the primary tumor and xenograft.

Fig. 2 *L-myc* gene amplification in a small cell carcinoma. DNA from the primary tumor (C) and normal lung tissue (N) of the patient and from the xenograft (NUDE) was digested with *Eco*RI and hybridized with a *L-myc* probe. This patient shows *L-myc* gene heterozygosity, of two bands of 6.6 and 10 kilobase pair. The 6.6 kb band is amplified in primary and xenograft.

Table 3 Abnormality of *myc* family gene in various cell type of lung cancers

Histological type	<i>c-myc</i> amp ^{a)}	<i>L-myc</i> amp ^{a)}	<i>L-myc</i> del ^{b)}	Total
Squamous cell ca.	1/7	0/7	2 ^{b)} /4	3/7
Adenocarcinoma	1/10	0/10	2/9	3/10
Large cell ca.	2/7	0/7	2/4	4/7
Small cell ca.	0/6	3/6	1 ^{c)} /6	3/6
Adenosquamous ca.	0/2	0/2	0/1	0/2
UC. small cell type	0/1	0/1	0/0	0/1
Adenoid cystic ca.	0/1	0/1	0/0	0/1

Numerator—No. of tumors with abnormality.

Denominator—No. of tumors examined.

^{a)} amp, amplification. ^{b)} del, deletion. ^{c)} Also with amplification of *L-myc*. ^{d)} Also with an additional band of *c-myc*.

UC., undifferentiated carcinoma.

例のみが生着した異常のない症例の 28.5%と比較し、有意に高率であった (Fisher の直接確率法による) (Table 4)。

Fig. 3 *L-myc* deletion in a squamous cell carcinoma. DNA from the primary tumor (C) and normal lung tissue (N) of the patient and from the xenograft (NUDE) was digested with *Eco*RI and hybridized with *L-myc* probe. This patient has *L-myc* gene heterozygosity showing two bands of 6.6 and 10 kb. The intensity of the 6.6 kb band of the primary tumor is less strong than that of normal lung tissue and the band is completely deleted in the xenograft.

Table 4 Transplantability into nude mice of tumors with *myc* family gene abnormality

<i>myc</i> gene abnormality	No. of tumors transplanted	No. of tumors with take
<i>c-myc</i> amp ^{a)}	4	4
<i>L-myc</i> amp ^{a)}	3	3 ^{c)}
<i>L-myc</i> del ^{b)}	7	5 ^{c,d)}
Not detected	21	6
Total	34	17

^{a)} amp, amplification. ^{b)} del, deletion. ^{c)} Including a tumor with amplification of *L-myc*. ^{d)} Including a tumor with an additional band of *c-myc* with deletion of *L-myc*.

生着した腫瘍の 17 例のうち、8 例の腫瘍については、原発腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の *myc* 遺伝子を比較しえた。残りの腫瘍 9 例は、3 カ月間で DNA 抽出

に十分な大きさに増殖せず、比較できなかった。比較しえた腫瘍 8 例では、原発腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の間で、*myc* 遺伝子の質的量的変化の認められたものはなかった (Fig. 1~3)。

考 察

肺癌における *myc* 遺伝子の異常について、多くの報告がなされている。中でも、*c-myc* に関する検討が進んでおり、小細胞癌や非小細胞癌の腫瘍組織や培養細胞株で *c-myc* の異常が認められている^{9,25~28)}。殊に小細胞癌では、初期には *c-myc* の異常のなかでも増幅が、morphological variant type に多く認められたという報告がされていた³⁴⁾が、後には classic type にも認めたとする報告もなされている³⁵⁾。また、巨細胞癌や他非小細胞癌における *c-myc* の増幅も報告されている^{25,27)}。N-*myc* および L-*myc* の異常は、小細胞癌に認められている^{27,28)}。

今回の検討では、*c-myc* の異常は、小細胞癌には認められず、巨細胞癌の部分像をもつ大細胞癌を含む非小細胞癌 4 例に増幅が認められた。巨細胞癌における *c-myc* 異常は、過去の報告とも考えあわせ、今後検討すべき課題であると考えられた。

今回、N-*myc* の異常は認められなかったが、L-*myc* については、増幅が小細胞癌 3 例に、欠失が種々の組織型 7 例に認められた。小細胞癌 6 例中 3 例に認められた L-*myc* の増幅は、今回の検討によって明らかになった事実で、これまでの報告以上に高頻度にみられる可能性、さらには、小細胞癌に特異的な異常である可能性を示唆しているものと考えられた。

従来の報告では、肺癌のヌードマウス生着率は 42% から 71% である^{36~40)}。今回の検討では、50% のヒト原発性肺癌がヌードマウスに移植生着し、従来の報告と大差のないものであった。組織型で分類すると、腺癌が 20% と他組織型と比較し、低い生着率であった。一般に大細胞癌は生着率が高く、腺癌の生着率は低い。欧米の報告と比較し、本邦での報告において、生着率がやや低いのは腺癌が多いためであると考えられる^{37,38,40)}。

今回の結果では、*myc* 遺伝子の異常、特に *c-myc*、L-*myc* の増幅の認められた肺癌は、認められなかったものに比して、ヌードマウスに生着しやすかった。Modjtahedi ら⁴¹⁾は、*c-myc* 増幅を認める乳癌の培養細胞をヌードマウスに移植し、後に培養細胞に戻した時、*c-myc* 増幅の程度が高度になっていた例を報告してい

る。彼らは、これを *c-myc* 高度増幅の株が選択されたとし、*c-myc* 増幅は腫瘍の増殖、悪性化に重要な役割を果たしていると推測している。また、Shibuya ら¹⁵⁾は、胃癌ヌードマウス移植腫瘍について 16 例中 3 例に *c-myc* 増幅が認められたと報告し、増幅の認められた株で *c-myc* に関する RNA 発現量が多く、その発現量と移植腫瘍の増殖の早さとの相関を述べている。

これらの結果をまとめると、*c-myc* の増幅、発現過剰は癌細胞の悪性度の保持、増加に深く関連していると思われる。したがって、今回の検討では、RNA レベルでの検討を加えていないが、*myc* 遺伝子の異常を認めずに生着した 6 例の腫瘍においても *myc* 遺伝子の発現過剰があったかもしれない可能性を否定できない。

N-*myc*、L-*myc* の機能については、よく知られていない。N-*myc* の増幅は、神経芽腫において、腫瘍の病期に深く関係すると報告されている^{18,19)}。L-*myc* については、われわれの知る限り、病期に関係するという報告はない。今回のわれわれの結果では、*myc* 遺伝子の異常と肺癌の病期との関連は認められなかった。しかし、今回の検討では、*c-myc* 遺伝子ばかりでなく、L-*myc* の異常の認められた腫瘍も、ヌードマウスに生着しやすいと考えられた。

ヌードマウスは、癌研究において重要な実験系である。Nakasato ら¹⁴⁾は、ヌードマウス移植胃癌株 11 株中 2 株に *c-myc* の増幅を認めたのに対し、30 例の手術切除腫瘍では 1 例にも認められなかったと報告している。彼らは、*c-myc* の増幅を来している細胞がヌードマウス移植時に増殖しやすいか、継代中に *c-myc* の増幅が起こったのかどちらかだろうと述べている。著者の今回の検討では、*myc* 遺伝子の増幅のある腫瘍はない腫瘍に比してヌードマウスで生着増殖しやすいことが明らかにされた。したがって、ヌードマウス、あるいは、培養細胞を材料に *myc* 遺伝子を検討する場合、*myc* 遺伝子増幅の頻度は原発腫瘍の頻度より高くなることを念頭に置く必要があることが示された。

これらのことを考慮しても、なお小細胞癌では、他の組織型に比べ、高頻度に L-*myc* の増幅が認められた事実や巨細胞癌で *c-myc* の増幅が認められた事実は、*myc* 遺伝子と腫瘍増殖との関係とも考えあわせ、増殖速度の早いこれらの腫瘍の生物学的特徴に深く関係しているものと考えられた。

結 論

1) 原発性肺癌 34 例の *myc* family gene の異常につ

いて検討した。c-myc の増幅は非小細胞癌 4 例に、L-myc の増幅は小細胞癌 3 例に認めた。L-myc の欠失は 7 例の肺癌に認めた。N-myc の異常は今回の検討では認められなかった。

2) ノードマウスに移植生着した腫瘍は 17 例で、生着率は 50% であった。組織型別にみると、腺癌は他の組織型と比較し低い生着率であった。

3) myc family gene の異常とノードマウス移植生着の関係を検討すると、myc family gene の異常を認めた腫瘍は、認めなかった腫瘍と比較し、有意に高い移植生着率を示した。

本稿を終えるにあたり、御指導御協力頂きました国立がんセンター研究所病理部長下里幸雄博士、腫瘍遺伝子部長関谷剛男博士、現群馬大学医学部第 2 病理学教授中島孝博士をはじめとする国立がんセンター研究所病理部員、腫瘍遺伝子部員各位、および日本医科大学臨床病理学教室員各位に感謝致します。

文 献

- 1) Bishop, J.M.: Cellular oncogenes and retroviruses. Annu. Rev. Biochem., 52, 301~354, 1984.
- 2) Klein, G. and Klein, E.: Oncogene activation and tumor progression. Carcinogenesis (Lond.), 5, 429~435, 1984.
- 3) Nishimura, S. and Sekiya, T.: Human cancer and cellular oncogenes. Biochem. J., 243, 313~327, 1987.
- 4) Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, C.I., Weinberg, R. A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D. R. and Chang, E.H.: Mechanism of activation of a human oncogene. Nature, 300, 143~149, 1982.
- 5) Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. and Barbacid, M.: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. Nature, 300, 149~152, 1982.
- 6) Collins, S. and Groudine, M.: Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. Nature, 298, 679~681, 1982.
- 7) Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmus, H.E. and Bishop, J.M.: Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from human colon carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1707~1711, 1983.
- 8) Dalla-Favera, R., Wong-Staal, F. and Gallo, R.C.: Oncogene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL60 and primary leukemic cells of the same patient. Nature, 299, 61~63, 1982.
- 9) Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F. and Minna, J.D.: Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. Nature, 306, 194~196, 1983.
- 10) Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. and Croce, C.M.: Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7824~7827, 1982.
- 11) Neel, B.G., Jhanwar, S.C., Chaganti, R.S.K. and Hayward, W.S.: Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7842~7846, 1982.
- 12) Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. and Leder, P.: Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 7837~7841, 1982.
- 13) Hayward, W.S., Neel, B.G. and Astrin, S.M.: Activation of cellular oncogene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukaemia. Nature, 290, 475~480, 1981.
- 14) Nakasato, F., Sakamoto, H., Mori, M., Hayashi, K., Shimamoto, Y., Nishi, M., Takao, S., Nakatani, K., Terada, M. and Sugimura, T.: Amplification of the c-myc oncogene in human stomach cancers. Gann, 75, 737~742, 1984.
- 15) Shibuya, M., Yokota, J. and Ueyama, Y.: Amplification and expression of a cellular oncogene (c-myc) in human gastric adenocarcinoma cells. Mol. Cell. Biol., 5, 414~418, 1985.
- 16) Koda, T., Matsushima, S., Sasaki, A., Danjo, Y. and Kakinuma, M.: c-myc gene amplification in primary stomach cancer. Jpn. J. Cancer Res., 76, 551~554, 1985.
- 17) Kozbor, D. and Croce, C.M.: Amplification of the c-myc oncogene in one of five human breast carcinoma cell lines. Cancer Res., 44, 438~441, 1984.
- 18) Campisi, J., Gray, H.E., Pardee, A.B., Dean, M. and Sonnenchein, G.E.: Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. Cell, 36, 341~347, 1984.
- 19) Kelly, K., Cochran, B., Stiles, C. and Leeder, P.: Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell, 35, 603~610, 1983.
- 20) Klein, G. and Klein, E.: Conditioned tumorigenicity of activated oncogenes. Cancer Res., 46, 3211~3224, 1986.
- 21) Lachman, H.M. and Skoultschi, A.I.: Expression of c-myc changes during differentiation of mouse erythroleukemia cells. Nature, 310, 592~594, 1984.
- 22) Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. and Bishop, J.M.: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. Science, 224, 1121~1124, 1984.
- 23) Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y. and Hammond, D.: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. N. Engl. J. Med., 313, 1111~1116, 1985.
- 24) Nau, M.M., Brooks, B.J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A.F., Kirsch, I.R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollis, G. F. and Minna, J.D.: L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed human small cell lung cancer. Nature, 318, 69~73, 1985.
- 25) Yoshimoto, K., Shiraishi, M., Hirohashi, S., Morinaga, S., Shimamoto, Y., Sugimura, T. and Sekiya, T.: Rearrangement of c-myc gene in two giant cell carcinomas

- of the lung. Jpn. J. Cancer Res., 77, 731~735, 1986.
- 26) Taya, Y., Hosogai, K., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Tsuchiya, R., Tsuchida, N., Fushimi, M., Sekiya, T. and Nishimura, S.: A novel combination of *K-ras* and *myc* amplification accompanied point mutational activation of *K-ras* in a human lung cancer. EMBO J., 3, 2943~2946, 1984.
- 27) Cline, M.J. and Battifora, H.: Abnormalities of protooncogenes in non-small cell lung cancer; Correlations with tumor type and clinical characteristics. Cancer, 60, 2669~2674, 1987.
- 28) Yokota, J., Wada, M., Yoshida, T., Noguchi, M., Terasaki, T., Shimosato, Y., Sugimura, T. and Terada, M.: Heterogeneity of lung cancer cells with respect to the amplification and rearrangement of *myc* family oncogenes. Oncogene, 2, 607~611, 1988.
- 29) Blin, N. and Stafford, D.M.: A general method for isolation of high-molecular-weight DNA from eukaryotes. Nucleic Acids Res., 3, 2303~2308, 1976.
- 30) Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98, 503~517, 1975.
- 31) Kohl, N.E., Kanda, N., Schreck, R.R., Bruns, G., Latt, S. A., Gilbert, F. and Alt, F.A.: Transposition and amplification of oncogene related sequences in human neuroblastomas. Cell, 35, 359~367, 1983.
- 32) Watson, R., Oskarsson, M. and Woude, G.F.V.: Human DNA sequence homologous to the transforming gene (*mos*) of Moloney murine sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4078~4082, 1982.
- 33) Taparowsky, E., Shimizu, K., Goldfarb, M. and Wigler, M.: Structure and activation of the human *N-ras* gene. Cell, 34, 581~586, 1983.
- 34) Gazdar, A.F., Carney, D.N., Nau, M.M. and Minna, J.D.: Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. Cancer Res., 45, 2924~2930, 1985.
- 35) Kiefer, P.E., Bepler, G., Kubasch, M. and Havemann, K.: Amplification and expression of protooncogene in human small cell lung cancer cell lines. Cancer Res., 47, 6236~6242, 1987.
- 36) Hattler, B.G., Jr. Soehnlen, B., Seaver, N.A. and Satou, P.: Heterotransplantation of human malignant neoplasms to the mouse mutant nude. Surg. Forum, 25, 127~129, 1974.
- 37) Shimosato, Y., Kameya, T., Nagai, K., Hirohashi, S., Koide, T., Hayashi, H. and Nomura, T.: Transplantation of human tumors in nude mice. J. Natl. Cancer Inst., 56, 1251~1260, 1976.
- 38) 児玉哲朗, 下里幸雄, 小出勉: 3. 肺癌, “人癌とヌードマウス” (下里幸雄, 玉置憲一編), p. 176~185, 医歯薬出版, 東京, 1982.
- 39) Sharkey, F.E., Fogh, J.M., Hadju, S.I., Fitzgerald, P.J. and Fogh, J.: Experience in surgical pathology with human tumor growth in the nude mouse. “The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research” (Fogh, J. and Giovanella, B.C. eds.), p. 178~214, Academic Press, New York, 1978.
- 40) Ueyama, Y., Morita, K., Yokoyama, M., Kondo, Y., Tamaoki, N., Ohsawa, N. and Nomura, T.: Establishment and maintenance of human malignant tumors serially transplanted to nude mice. “Proceedings of the IInd Internatl. Workshop on Nude Mice” (Nomura, T., Ohsawa, N., Tamaoki, N. and Fujiwara, K. eds.), p. 365~374, University of Tokyo Press/ Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, Tokyo, 1977.
- 41) Modjtahedi, N., Lavialle, C., Poupon, M.F., Landin, R.M., Cassingena, R., Monnier, R. and Brison, O.: Increased level of amplification of the *c-myc* oncogene in tumors induced in nude mice by a human breast carcinoma cell line. Cancer Res., 45, 4372~4379, 1985.

(受付: 1989年 5月31日)