[シンポジウム：新技術による遺伝子診断]

マイクロサテライト不安定性腫瘍における標的遺伝子変異の解析

伊東文生・山本博幸・日野田裕治・今井浩三

SUMMARY

Widespread microsatellite instability (MSI) due to the defective DNA mismatch repair underlies the pathogenesis of the majority of hereditary non-polyposis colorectal cancer and a subset of various sporadic malignant tumors. Using 5 microsatellite markers and the criteria of MSI proposed by the National Cancer Institute (NCI) workshop, we analyzed 205 gastric adenocarcinomas for MSI. Based on the number of markers showing instability per tumor, the tumors were divided into three groups; those with two or more of the five markers displaying instability (high MSI, MSI-H), those with one of five markers displaying instability (low MSI, MSI-L), and those with no instability (microsatellite stable, MSS). Among 205 tumors, 30 (15%) were MSI-H, 15 (7%) were MSI-L, and 160 (78%) were MSS. All of the 30 MSI-H tumors demonstrated instability at BAT26, a sensitive marker for the widespread MSI, while none of the 15 MSI-L tumors did. MSI-H tumors were significantly associated with distal location and well or moderate differentiation, but MSI-H tumors were indistinguishable from MSS tumors. Bax frameshift mutations were detected in 60% of the 30 MSI-H tumors, while not in any of the 15 MSI-L tumors. These results suggest that microsatellite analysis using the criteria proposed by the NCI workshop may appropriate for gastric cancers because it unveils real differences in genotype and phenotype.

Key words: microsatellite instability, gastric cancer, bax gene, clinicopathological parameters.

緒 言

発癌には大きく分けて、Gatekeeper 遺伝子と Caretaker 遺伝子の異常が関与する機構が考えられている¹⁾。最近さらに、Landscape 遺伝子の概念も報告されている²⁾。Caretaker 遺伝子の中でも DNA ミスマッチ修復 (MMR) 遺伝子の異常は、遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC) や種々の散発性 replication error (RER) 陽性癌の発癌機構として注目されている³⁾。HNPCC や散発性 RER 陽性大腸癌ではこれまで大腸癌の発癌メカニズムと考えられてきた K-ras 遺伝子や p53 遺伝子などの遺伝子変異は、頻度が低い^{3,4)}。一方で、MMR 異常に起因する標的遺伝子として II 型 TGF β レセプター⁵⁾ や BAX 遺伝子⁶⁾、MMR 遺伝子 (hMSH3, hMSH6)⁷⁾ などの変異が

明らかになってきた。p53 遺伝子変異の頻度の低い RER 陽性大腸癌での BAX 遺伝子変異は、p53 遺伝子による BAX 遺伝子の転写促進作用⁸⁾ を考えると非常に興味深い。また hMSH3, hMSH6 の変異より、一つの MMR 遺伝子の変異に起因した MMR 異常が、他の MMR 遺伝子の変異を誘導し、MMR 異常がさらに加速する機構 (mutator mutates another mutator model) が提唱されている^{9,10)}。

胃癌においても RER は、比較的高頻度に認められる¹¹⁾。興味深いことに、大腸癌と同様に RER 陽性胃癌は、RER 陰性胃癌に比べ、p53 遺伝子変異の頻度が低いことが報告されている¹²⁾。このことより、RER 陽性胃癌においても BAX 遺伝子が標的遺伝子となっている可能性が示唆される。

Target gene analysis in human malignancies with microsatellite instability.

Fumio Itoh, Hiroyuki Yamamoto, Yuji Hinoda, Kohzoh Imai; 札幌医科大学第一内科

Correspondence address: Fumio Itoh, 1st Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, School of Medicine, S-1, W-16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan.

第 49 回本電気泳動学会総会・シンポジウム

本研究では、RER 陽性胃癌における BAX 遺伝子のフレームシフト変異を検索し、臨床病理因子との関連について検討を加えた。

方 法

1. RER の検出

205 組の胃癌および隣接非癌部より、フェノール・クロロホルム法を用いて、genomic DNA を抽出し、5 loci のマイクロサテライトマーカー (BAT26, BAT40, D2S123, D5S346, Mfd15) を用いて RER の検出を行った。2 loci 以上でシフトを認めた症例を RER 陽性とした。

2. BAX 遺伝子フレームシフト変異の検出

RER 陽性胃癌 30 例全例と RER 陰性胃癌 30 例の DNA を対象に、BAX 遺伝子エクソン 3 に存在するグアニンの 8 回繰り返し配列を増幅するプライマー⁶⁾ (5' ATCCAGG ATCGAGCAGGGCG-3' および 5'-ACTCGCTCAGCTT-CTTGGT-3') を用いて、PCR 反応を行った。PCR 産物を 6% ポリアクリルアミドゲルにて泳動、乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

3. 統計解析

Fisher's exact test および Wilcoxon rank sum test を用いて、BAX フレームシフト変異と臨床病理学的因子の関連を分析した。また、Kaplan-Meier 法を用いて、予後との関連も検討した。

結 果

205 例中 30 例 (15%) において RER を認めた。30 例の RER 陽性胃癌のうち 18 例 (60%) において BAX 遺伝子フレームシフト変異を認めた。一方、RER 陰性胃癌 30 例においては、変異を認めなかった。BAX 遺伝子変異と臨床病理学的因子の検討では、統計的に有意な関連を認めなかったが、RER 陽性胃癌において、BAX 遺伝子変異陽性の症例は、陰性の症例に比べて予後であった ($p < 0.05$, Logrank test)。

考 察

本研究では、胃癌の 15% に RER を認めた。これまでに、胃癌の RER に関して、数多くの報告がみられるが¹¹⁾、RER の統一基準がないため、RER の頻度には、大きな差がみられる。モノヌクレオチドの繰り返し配列が、RER により影響を受けやすいことは、最初の報告で述べられている³⁾が、さらに最近、モノヌクレオチドマーカーである BAT26 が RER 検出の感度の高いマーカーであることが明らかになってきている¹³⁾。

ところが、これまでの多くの胃癌の RER に関する報告において BAT26 を検討しているものは少ない。また、マイクロサテライト領域は、本来不安定な配列であり、数

(多くは 1) 繰り返し配列のみのシフト、いわゆる type II mutation¹⁴⁾ は、DNA MMR 遺伝子の異常によるマイクロサテライト不安定性がなくても、腫瘍のクロナリテにより検出されうる現象と考えられる。以上のことから、これまで報告されている胃癌の RER の頻度は、over-estimation が多く、我々が今回得た頻度は、妥当な数値と思われる。

BAX 遺伝子のフレームシフト変異のホットスポットの変異は、RER 陽性胃癌の 60% に認めた。挿入と欠失を認めた症例のほか、癌組織における非癌組織の混在を考慮しても、1 アレルのみの heterozygous 変異と考えられる症例も認めた。SV40T 抗原を脈絡膜で発現する脳腫瘍発症トランスジェニックマウスの BAX ノックアウトマウスでは、ヘテロ欠損マウスにおいても、腫瘍発症までの期間が短縮される¹⁵⁾ことから、1 アレルの BAX 遺伝子変異も、RER 陽性胃癌において functional であると考えられる。また、II 型 TGF β レセプター遺伝子でも報告されているように¹⁶⁾、BAX 遺伝子変異の腫瘍内での heterogeneity の有無を調べるために microdissection を用いた検討、また、もう一方のアレルの BAX 遺伝子の全エクソンの変異の検索が今後の課題である。

BAX 遺伝子変異と臨床病理学的因子の検討では、統計的に有意な関連を認めなかったが、興味深いことに、RER 陽性胃癌において、BAX 遺伝子変異陽性の症例は、陰性の症例に比べて予後不良であった。これまでに BAX 発現の低下と乳癌患者の生存期間の短縮が報告されている¹⁷⁾。今後、症例数を増やすことにより、BAX 遺伝子変異と RER 陽性胃癌の予後との関連が明確になるものと期待される。

この研究の一部は文部省がん重点領域研究、厚生省がん研究助成金の補助による。

文 献

- 1) Kinzler KW, Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761-3.
- 2) Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998; 280: 1036-37.
- 3) Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-61.
- 4) Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Chiba M, Nomizu S, Konishi F, Utsunomiya J, Miyaki M. Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 1996; 111: 307-17.
- 5) Markowitz SD, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler

- KW, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-8.
- 6) Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-9.
- 7) Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature* 1996; 382: 499-500.
- 8) Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p 53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-9.
- 9) Perucho M. Microsatellite instability: The mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 1996; 2: 630-1.
- 10) Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 1996; 377: 675-84.
- 11) Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HRK. Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1808-20.
- 12) Renault B, Calistri D, Buonsanti G, Nanni O, Amadori D, Ranzani GN. Microsatellite instability and mutations of p 53 and TGF- β RII genes in gastric cancer. *Hum Genet* 1996; 98: 601-7.
- 13) Hoang JM, Cuttu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancer and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 300-3.
- 14) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
- 15) Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997; 385: 637-40.
- 16) Ohue M, Tomita N, Monden T, Miyoshi Y, Ohnishi T, Isawa H, Kawabata Y, Sasaki M, Sekimoto M, Nishisho I, Shiozaki H, Monden M. Mutations of the transforming growth factor b type II receptor gene and microsatellite instability in gastric cancer. *Int J Cancer* 1996; 68: 203-6.
- 17) Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC. Reduced expression of proapoptotic gene Bax is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 4471-8.