

学位論文

ヒト口腔扁平上皮癌における *c-fms* 癌遺伝子の
制限酵素多型性に関する研究

学位申請者

小原 勝

学位論文

ヒト口腔扁平上皮癌における *c-fms* 癌遺伝子の
制限酵素多型性に関する研究

学位申請者 小原 勝

広島大学歯学部口腔外科学第2講座
(主任 下里常弘教授)

1992年

謝 辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った広島大学歯学部口腔外科学第二講座下里常弘教授に深厚なる謝意を表します。同時に、御懇切なる御助言御校閲を賜った本学歯科薬理学講座土肥敏博教授ならびに本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に衷心より謝意を表します。また、本研究のまとめおよび論文の作製上、御指導御助言を頂いた本学口腔生化学講座能代光秀助教授に深謝いたします。

本研究を進めるに際し始終御指導頂いた本学口腔外科学第二講座村上和億博士ならびに池本公亮助手に感謝の意を表します。また本研究に協力して頂きました東京歯科大学生化学講座大西芳秋博士ならびに本学口腔細菌学講座井上伸吾博士に感謝いたします。最後に、本学口腔外科学第二講座の諸氏に心から御礼申し上げます。

目 次

序言		1
第 I 章	c- <i>fms</i> 癌遺伝子の変化領域の解析	4
第 1 節	概要	4
第 2 節	材料ならびに方法	4
第 1 項	ヒト口腔扁平上皮癌細胞株	
第 2 項	DNA probe	
第 3 項	Genomic DNA抽出	
第 4 項	Southern hybridization	
第 3 節	結果	5
第 1 項	v- <i>fms</i> probeによる検索結果	
第 2 項	c- <i>fms</i> probeによる検索結果	
第 II 章	c- <i>fms</i> 癌遺伝子の変化領域のクローニング	15
第 1 節	概要	15
第 2 節	材料ならびに方法	15
第 1 項	Polymerase chain reaction	
第 2 項	M13 phagemidへのサブクローニング	
第 3 項	DNA sequence	
第 3 節	結果	16
第 1 項	Polymerase chain reaction法による増幅	
第 2 項	DNA sequence	
第 III 章	欠失型c- <i>fms</i> 癌遺伝子の発現に関する解析	23
第 1 節	概要	23
第 2 節	材料および方法	23
第 1 項	RNA抽出	
第 2 項	Northern hybridization	

第3項	<i>In vitro</i> リン酸化反応	
第4項	Ligandによる増殖反応	
第3節	結果	24
第1項	Northern hybridization	
第2項	<i>In vitro</i> リン酸化反応	
第3項	Ligand CSF-1に対する培養細胞の増殖反応	
第IV章	<i>c-fms</i> 癌遺伝子の制限酵素多型性の出現頻度	31
第1節	概要	31
第2節	材料および方法	31
第3節	結果	31
第1項	口腔扁平上皮癌	
第2項	その他の口腔腫瘍	
第3項	ヒト白血球	
第4項	総計	
第V章	考察	35
第VI章	総括	41
使用緩衝液		42
参考文献		44

論文において以下の略語を用いた。

ATP:adenosine-5'-triphosphate

bp:base pair

cDNA:complementary DNA

dCTP:deoxycytidine-5'-triphosphate

dNTPs:deoxyribonucleoside triphosphates

EDTA:ethylenediaminetetraacetic acid

GM-CSF:granulocyte macrophage-colony stimulating factor

HEPES:2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

IL:interleukin

kb:kilobase

kDa:kilodalton

mRNA:messenger RNA

PDGF-R_B:B isoform of platelet-derived growth factor receptor

PIPES:piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)

SDS:sodium dodecyl sulfate

Tris:trishydroxymethylaminomethane

序言

c-fms 癌遺伝子は macrophage colony stimulating factor (CSF-1) の receptor (CSF-1R) をコードする遺伝子¹⁾で血球細胞ならびに白血病細胞の増殖分化²⁾に深く関与している。この遺伝子はネコ肉腫ウイルス Susan McDonough feline sarcoma virus (SM-FeSV)³⁾に見い出された癌遺伝子 *v-fms*⁴⁾との相同性から発見された。Coussensら(1986)⁵⁾は *c-fms* 遺伝子の cDNA のクローニングを行い、その予想されるアミノ酸配列から、ligand 結合部位を持つ細胞外領域と1つの膜通過領域と tyrosine 特異的リン酸化能を持つ細胞内領域からなる糖蛋白質であることを報告した。この遺伝子はヒト染色体の 5q33.3 にマップ⁶⁾され、その近傍に GM-CSF, IL-3, IL-4 および IL-5 等の増殖因子や PDGF-R_B 等の receptor 遺伝子が存在し、血液細胞にとって重要な領域に位置する⁷⁾。Hampeら(1989)⁸⁾は *c-fms* の遺伝子をクローニングし、22 の exon からなる 60kb にもおよぶ遺伝子であることを報告した(図1)。またこの遺伝子は PDGF-R_B 遺伝子に隣接し、exon 1 と exon 2 の間が 26kb も離れており、ヒト胎盤では exon 1 の転写が生じるが、ヒト単球では生じないという細胞特異的な転写様式が存在する特徴を持っている⁹⁾。

血液細胞以外では妊娠マウスの子宮上皮ならびに胎盤に一過性の発現が認められている。また一部同時期に子宮より ligand である CSF-1 の発現もあり、胎盤の増殖分化の制御が示唆されている¹⁰⁾。

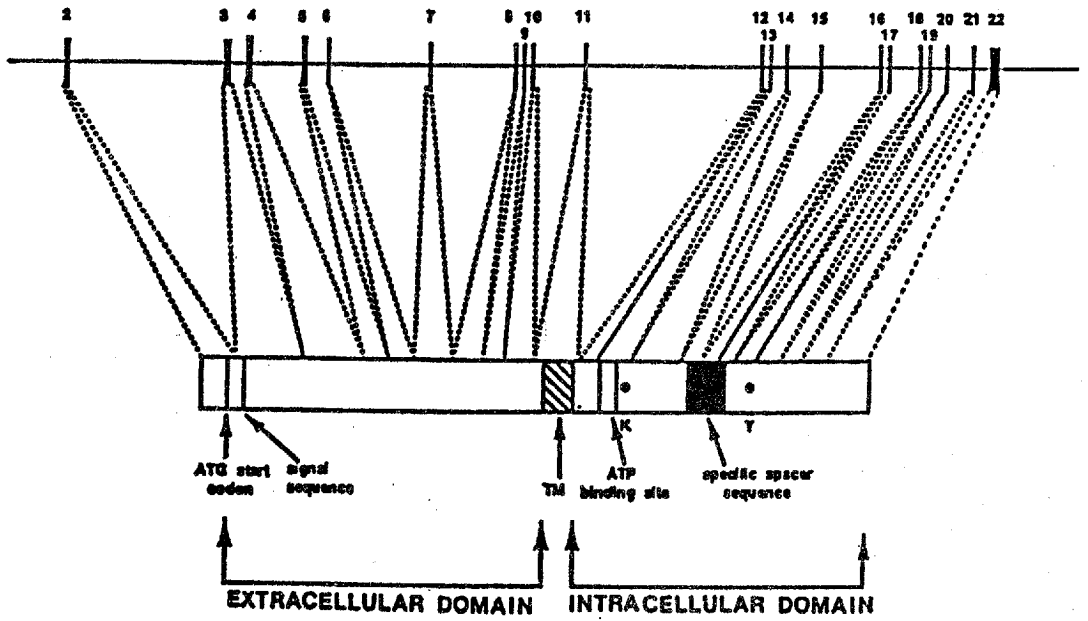
扁平上皮癌ではヒト CSF 様因子産生口腔扁平上皮癌細胞樹立株の報告¹¹⁾があり、癌の autocrine, paraclone 説を支持している。carcinogen 誘発ラット気管上皮由来培養株では *c-fms* 癌遺伝子の mRNA の発現の変化ならびに増強が報告され¹²⁾、扁平上皮癌との関連が示唆されている。

一般に癌遺伝子は細胞の増殖、分化に関する蛋白質をコードしており、生物の進化の過程で種を越えてかなりよく保存されている。

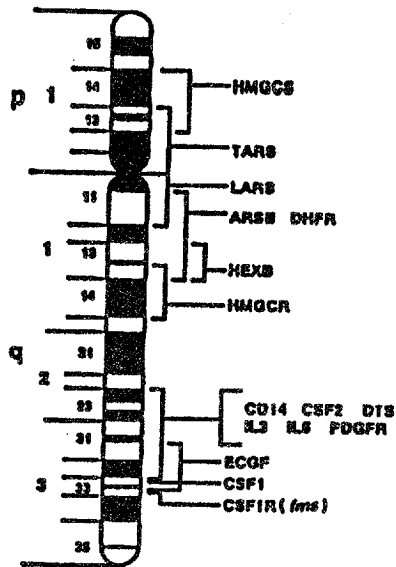
そのためこれらの多型性は稀で、特定の癌遺伝子に多型性が発見されると種々の遺伝子マーカーとして重要である¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。Xuら(1985)¹⁶⁾により *c-fms* 癌原遺伝子の制限酵素多型性 restriction enzyme fragment length polymorphism (以下RFLPと省略)が観察され、また Verbeekら(1985)¹⁷⁾により急性リンパ性白血病と *c-fms* RFLPとの関連性が報告された。

最近、私達の教室の池本ら(1988)¹⁸⁾はヒト口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 における *c-fms* 癌遺伝子の変化を *v-fms* を probe とした Southern hybridization 法によるバンドの変化として見出したが、この変化は遺伝子の再配列、欠失、挿入などによる可能性が推測された。一方、Ca9-22 における癌遺伝子の変化としては *c-erbB1* の増幅が報告されている以外未だ不明である¹⁹⁾。そこで著者はこの培養株における *c-fms* 癌遺伝子の変化と先述のラット肺扁平上皮癌のような癌化との深い関連性、さらに白血病に用いられたようなヒト口腔腫瘍のマーカーとしての有用性を明らかにすることを目的として *c-fms* 癌遺伝子の変化領域の検索ならびに塩基配列の決定を試みた。また *c-fms* 癌遺伝子産物の発現と同産物の機能について検索するとともにヒト口腔腫瘍におけるこの遺伝子変化の出現頻度を検討した。

HUMAN *fms* PROTO-ONCOGENE



CHROMOSOME



5

図1 ヒト *c-fms* 遺伝子の構造ならびに染色体地図

第 I 章 c-*fms* 癌遺伝子の変化領域の解析

第 1 節 概要

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9-22¹⁹⁾ における癌遺伝子 c-*fms* の変化領域を検索するため、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株より genomic DNA を調整し、v-*fms* ならびに c-*fms* probe を用いた Southern hybridization 法にて c-*fms* 癌遺伝子の変化領域を決定した。

第 2 節 材料ならびに方法

第 1 項 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株

使用したヒト口腔扁平上皮癌細胞株は当科で継代維持されている HSC-2²⁰⁾, Ca9-22¹⁹⁾ および HSC-3²⁰⁾ である。HSC-2 は口底部原発の高分化扁平上皮癌の顎下リンパ節転移巣、Ca9-22 は下顎歯肉の高分化扁平上皮癌、HSC-3 は舌の低分化扁平上皮癌の中深頸リンパ節転移巣からの樹立株である。この 3 株とも 10% fetal bovine serum (Boehringer Mannheim, Germany) 添加 Dulbecco' modified Eagle medium (日水, 東京) で継代維持を行った。

第 2 項 DNA probe

ネコ肉腫ウイルス Sudan McDonough Feline sarcoma virus (SM-FeSV)^{3) 4)} の 3' 部分の *Pst* I/*Bgl* II 切断部位 970bp を v-*fms* probe (宝酒造, 京都) として用いた (図 2)。

c-*fms* の probe は, exon12,13,14 近傍を含む 900bp (Oncogene Science, USA) を用いた (図 3)。なお, probe のラベルは [α -³²P] dCTP を用いた multiprime DNA labelling 法 (Amersham, England) により行った。

第3項 Genomic DNA抽出 (Maniatisら²¹⁾の方法)

細胞を氷冷 Tris-buffer saline にて洗浄後, 10ml の DNA 抽出液にて溶解した。proteinase K (Merck, Germany) を加えた後, 等量の phenol, phenol/chloroform (1:1) にて除蛋白し, ethanol にて沈澱させた。70% ethanol で洗浄後, 水に溶解し以下の実験に使用した (図4)。

なお, 対照として正常ヒト末梢白血球 (以下 WBC と略) より genomic DNA を調整し用いた。

第4項 Southern hybridization (白石ら²²⁾の方法)

抽出した DNA を各種制限酵素にて完全消化後, 0.7% agarose gel (Sigma, USA) 電気泳動にて分画した。アルカリにて DNA を変性し, 中和後 nitrocellulose membrane filter (Schleicher and Schuell, Germany) に転写した。80 °C にて DNA を固定後 prehybridization, hybridization を行い, 洗浄後 autoradiography を行った (図5)。

第3節 結果

第1項 v-fms probe による検索結果

Genomic DNA を制限酵素 *EcoR* I (東洋紡, 大阪) で消化した場合, WBC, HSC-2, HSC-3 では 12.5kb, Ca9-22 では 28.5kb のバンドを認めた (図6)。

制限酵素 *BamH* I (東洋紡) で消化した場合は WBC, HSC-2, HSC-3 で 4.2, 3.3, 1.3, 1.0kb, Ca9-22 では 3.3kb のバンドから 2.9kb のバンドへの変化を観察した (図6)。

制限酵素 *Hind* III (東洋紡) で消化した場合, WBC, HSC-2, HSC-3 ならびに Ca9-22 で 3.2, 2.8, 1.2kb のバンドを検出した (図7)。

制限酵素 *BstE* II (東洋紡) と *BamH* I の二重消化の場合, Ca9-22 で 4.2, 2.3kb, *BstE* II と *EcoR* I の二重消化の場合, 4.2, 2.0kb のバンドを認めた (図7)。

以上の結果を図8に示す c-fms 遺伝子地図²³⁾と比較すると intron

11 内の *EcoR* I 切断部位近傍の変化が予測された。なお,*Hind* III でバンドの変化が認められないのは 3.2kb の断片が 2 カ所存在するため、一方の変化がマスクされたためと考えられた (図 8)。

そこで図 3 に示す *c-fms* probe の領域を用いることにより、*v-fms* probe 使用時に観察された変化を単一のバンドで検索できると考え、以下の実験を行った。

第 2 項 *c-fms* probe による検索結果

Genomic DNA を制限酵素 *EcoR* I で消化した場合、WBC, HSC-2, HSC-3 では 12.5kb, Ca9-22 では 28.5kb のバンドを認めたため、intron 11 内の *EcoR*I 切断部位の消失が予想された (図 9)。

制限酵素 *BamH* I で消化した場合、WBC, HSC-2, HSC-3 で 3.3kb, Ca9-22 で 2.9kb のバンドを観察した (図 9)。

制限酵素 *Hind* III 消化した場合、WBC, HSC-2, HSC-3 で 3.2kb, Ca9-22 で 2.8kb のバンドを検出した (図 10)。

EcoR I と *Hind* III 二重消化の場合、WBC, HSC-2, HSC-3 で 2.0kb, Ca9-22 で 3.2kb のバンドを認めた (図 10)。

以上の結果から intron 11 内の *EcoR* I 切断部位を含む約 400bp の欠失が推定された (図 11)。

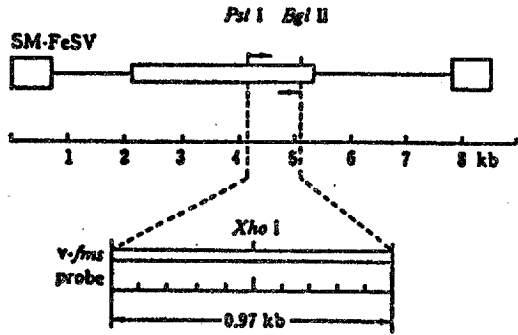


図 2 使用した v-*fms* probe

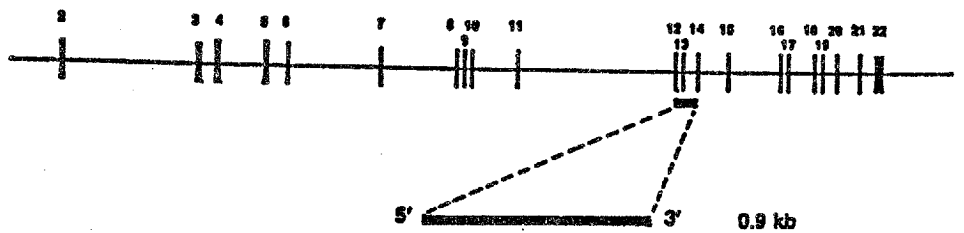


図 3 使用した c-*fms* probe

- 1, Wash the monolayers with ice-cold Tris-buffer saline.
- 2, Add 10ml of extraction buffer (10mM Tris-Cl(pH8.0), 0.1M EDTA, 20 μ g/ml pancreatic RNAase, 0.5%SDS)
- 3, Incubate the solution for 1hr at 37 $^{\circ}$ C
- 4, Add proteinase K to final concentration of 100 μ g/ml.
- 5, Place the suspension in water bath for 3hr at 50 $^{\circ}$ C .
- 6, Add an equal volume of phenol equilibrated with 0.5M Tris-Cl (pH8.0) and gently mix by slowly turning for 10min.
- 7, Separate the two phases by centrifugation at 5,000g for 15 min.
- 8, Repeat the extraction with phenol, phenol/chloroform(1:1) twice.
- 9, Add 0.2volume of 10M ammonium acetate and 2volume of ethanol.
- 10, Wash the DNA precipitate twice 70% ethanol.
- 11, Add 100 μ l of H₂O.

图 4 Genomic DNA 抽出法

- 1, Digest 10 μ g of DNA with one or more restriction enzymes.
- 2, Separate the fragments of DNA by electrophoresis through an agarose gel.
- 3, Transfer to the nitrocellulose filters for 12-18 hr.
- 4, Fix the DNA to the filter by baking for 30min to 2hr at 80 $^{\circ}$ C in vacuum oven.
- 5, Incubate the filters in the prehybridization buffer (50% formamide, 6xSSC, 5xDenhardt's solution, 0.5%SDS, 10mM EDTA, 0.1mg/ml sonicated salmon sperma DNA) for 2-12hr at 37-42 $^{\circ}$ C .
- 6, Hybridization of radiolabeled probes to DNA in prehybridization buffer containing 10% dextran sulfate for 12-24hr at 37-42 $^{\circ}$ C .
- 7, Wash the filters with 2x-0.1xSSC, 0.1%SDS at 65 $^{\circ}$ C .
- 8, Autoradiography.

图 5 Southern hybridization 法

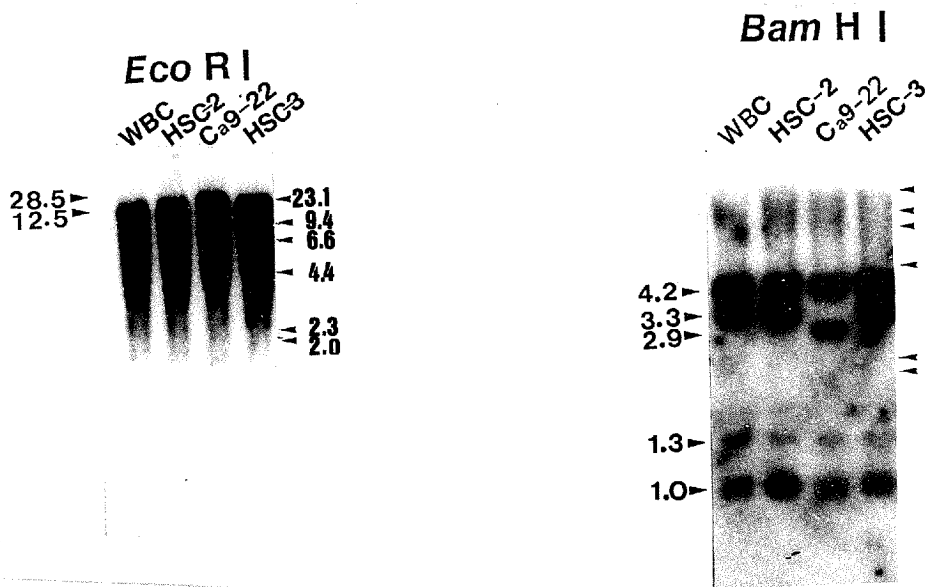


図 6 *v-fms* probe を用いた場合の Southern hybridization の結果
(*EcoR I*, *BamH I*)

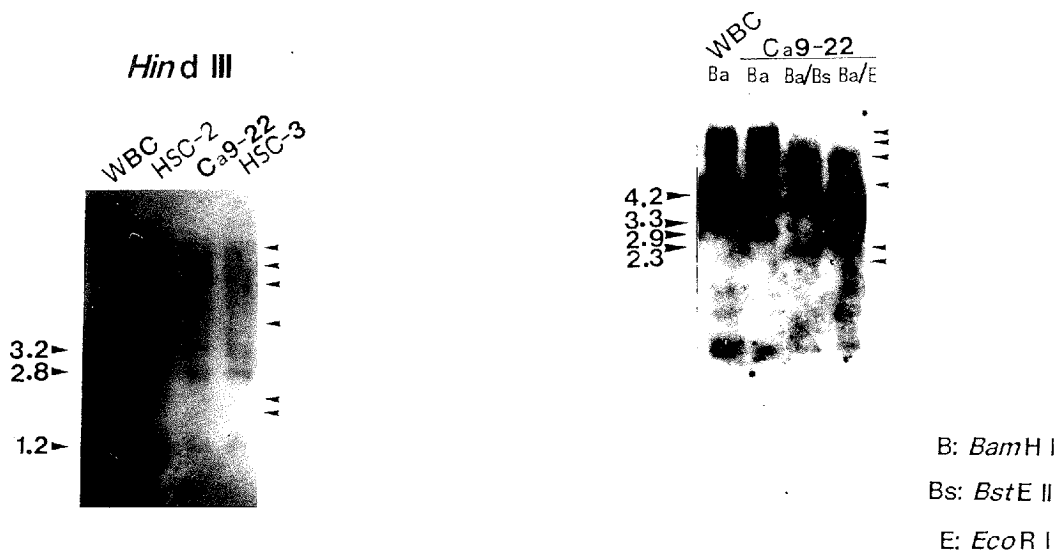


図 7 *v-fms* probe を用いた場合の Southern hybridization の結果
(*Hind III*, *BstE II/BamH I*, *EcoR I*)

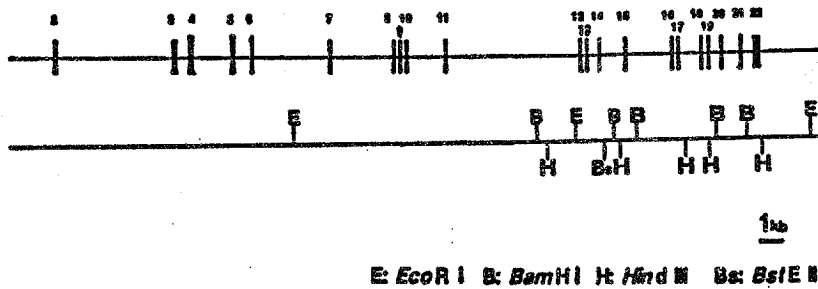
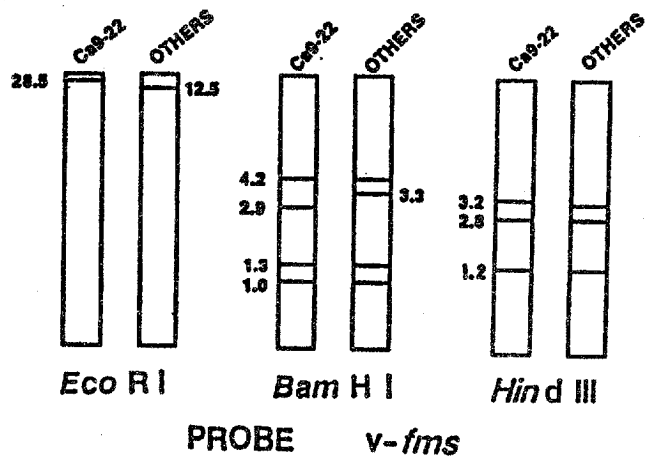


図 8 *c-fms* 遺伝子地図とシェーマ

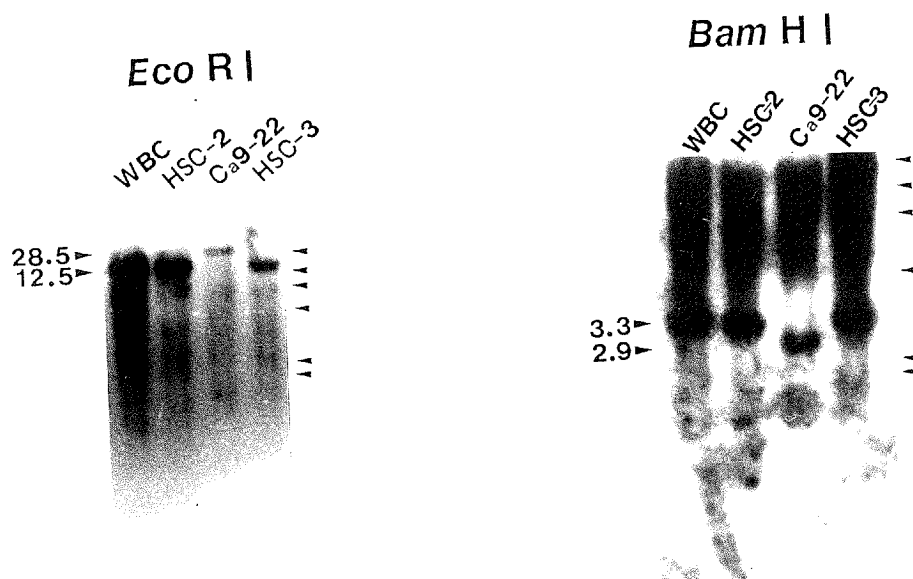


図 9 *c-fms* probe を用いた場合の Southern hybridization の結果
(*EcoR* I, *BamH* I)

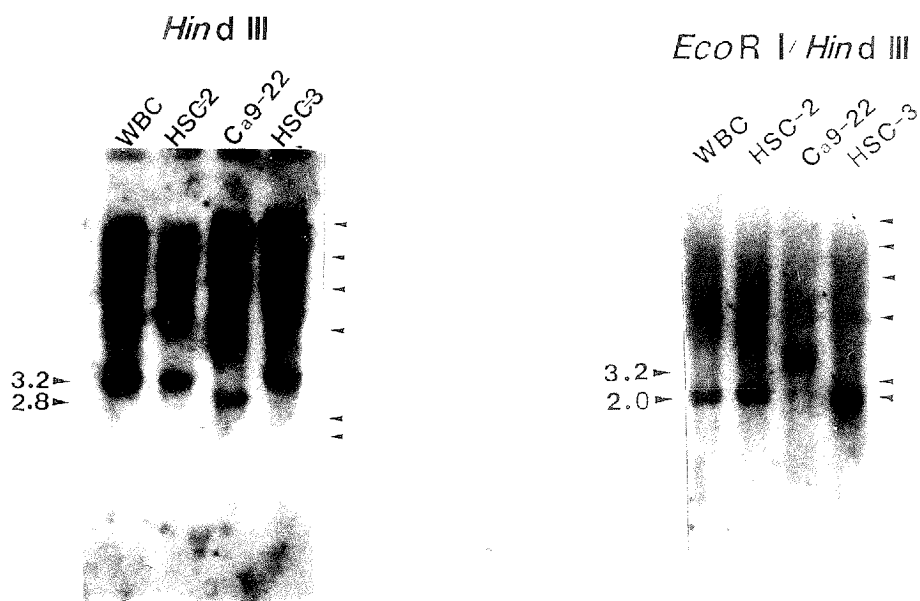


図 10 *c-fms* probe を用いた場合の Southern hybridization の結果
 (*Hind III*, *EcoR I / Hind III*)

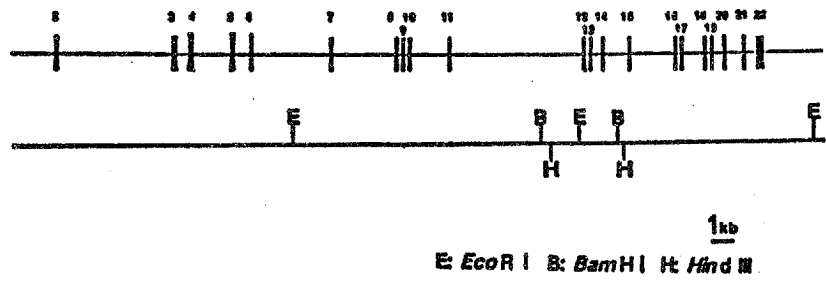
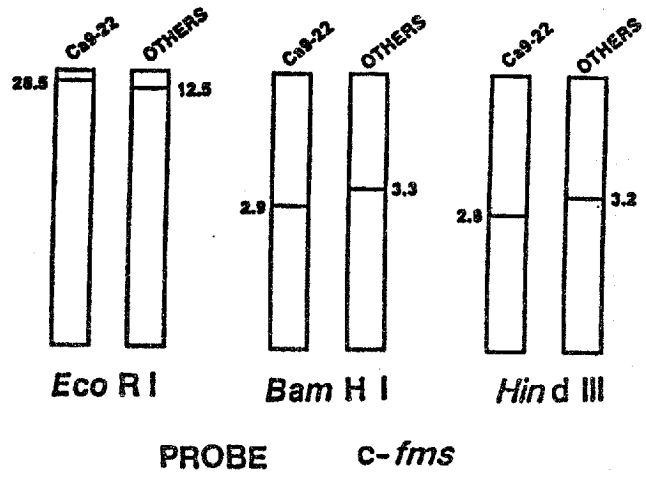


図 1 1 *c-fms* 遺伝子地図とシェーマ

第II章 c-*fms* 癌遺伝子の変化領域のクローニング

第1節 概要

Southern hybridization 法で観察された Ca9-22 における c-*fms* 癌遺伝子の変化領域を独自に作製した oligonucleotide primer を用いた polymerase chain reaction (以下 PCR と略) 法にて増幅した。さらに、その増幅断片を M13 phagemid に組み込み、Sanger 法にて DNA の塩基配列を決定した。

第2節 材料および方法

第1項 Polymerase chain reaction²¹⁾

EcoR I 切断部位を含む約 400bp の欠失領域を詳細に検討するため、図 1 2 に示すように 20mer の oligonucleotide primer を合成した。設定 oligonucleotide は vector へのサブクローニングのためにそれぞれ 2 塩基ずつ変化させ、*Bam*H I, *Hind* III 切断部位を作成した²³⁾。PCR 法の条件は、鋳型 DNA を 1 μ g, primer を各々 100pmols, Taq DNA polymerase (宝酒造) を 2.5units で 40 サイクルの反応を行った (図 1 3)。

第2項 M13 phagemid へのサブクローニング²¹⁾

低融点 agarose gel (FMC, USA) にて PCR 増幅 DNA 断片を電気泳動し、gel より DNA を回収後 M13mp18 に ligate した (図 1 4)。

第3項 DNA sequence²¹⁾

コンピテント *Escherichia coli* JM109 株に感染させ、培養上清から一本鎖 DNA を抽出後、Sanger 法にて DNA sequence を行った (図 1 4)。

第3節 結果

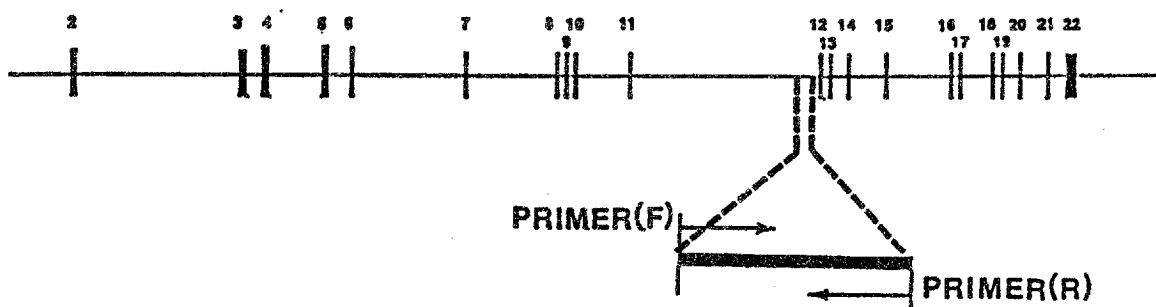
第1項 Polymerase chain reaction 法による増幅

PCR 反応産物の agarose gel 電気泳動後の ethidium bromide 染色では、WBC で 580, 490bp の増幅断片, Ca9-22 で 490, 160bp の増幅断片を認めた (図 15)。

図 12 に示した primer を用いた予想増幅断片は 592bp で、WBC で認めた 580bp に相当すると考えられた。したがって、490, 160bp 断片が *c-fms* 欠失断片の候補と考えられるが、Southern hybridization 法の結果より 160bp 断片が有力であった。そこで、これらの断片をそれぞれ M13mp18 にクローニングし、DNA sequence を行った。

第2項 DNA sequence

DNA sequence の結果を図 16 A, B に示す。agarose gel 電気泳動で 580bp と 160bp 断片を比較して CCTTAAA AAG TTCCA と AAG から AAG まで 426bp の欠失が明らかとなった。なお 490bp 断片は他領域の増幅断片と考えられた。



PRIMER(F) 5'GGATCCGCTACTATTATTCA 3'

PRIMER(R) 5'TGTAAAGCTTCCCTTCTCCAA 3'

图 1 2 设定 oligonucleotide primer

Template DNA	1 μ g
10 X amplification buffer	10 μ l
mixture of four dNTPs (1.25mM)	16 μ l
primer forward and reverse	100pmoles
Taq DNA polymerase	2.5units
H ₂ O to a final volume	100 μ l

Cycle	Denaturation	Annealing	Polymerization
First	5min(94°C)	2min (50°C)	3min(72°C)
2-39th	1	2	3
40th	1	2	10

図 1 3 PCR 法の条件

- 1, Separate the DNA by electrophoresis through low-melting agarose gel.
- 2, Recover the DNA from the agarose gel.
- 3, Ligate the fragment to M13mp18.
- 4, Transformation of competent *Escherichia coli* JM109.
- 5, Extract of single strand DNA.
- 6, Sequence by the Sanger dideoxy-mediated chain-termination method.

図 1 4 vector へのサブクローニングと DNA sequence の方法

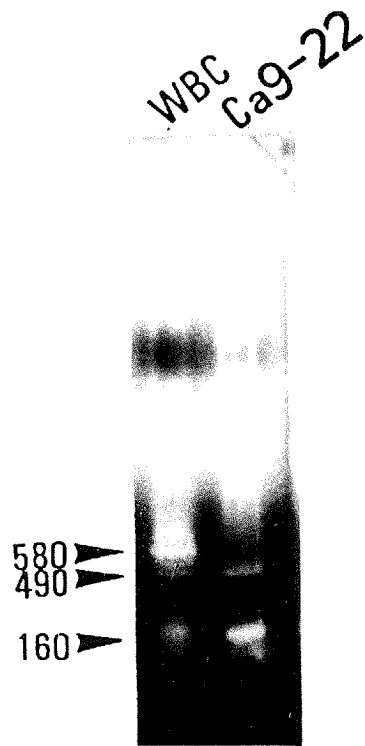


図 1 5 PCR 反応産物の電気泳動

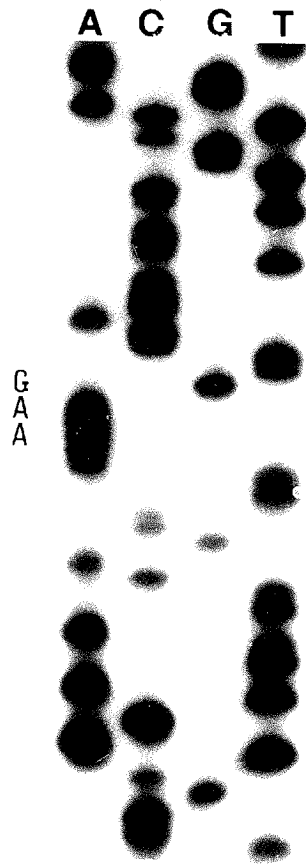


図 1 6 A *c-fms* 遺伝子欠失部分の DNA sequence

10	20	30	40
<u>GGATCCGCTA</u>	<u>CTATTATCA</u>	<u>GCCTTAAAAA</u>	<u>GGAAGGGAAT</u>
50	60	70	80
TCTGACCTGT	GCTGCAGCAT	GAATGAACT	TGAAGACATT
90	100	110	120
ATGCTGGGTG	AAATAAGGCA	ATCTCAATAG	ACACATGCTG
130	140	150	160
TGTGAGTCCA	CTGAGGTGCA	GTGCCTAGAG	CAGTGCAATT
170	180	190	200
CACAGAGACA	GCAGAATCAT	GGTTCGCCAG	GGGCTGGAGG
210	220	230	240
AGGGAAAGGG	GAGTTGCTTT	TTAACAGGAA	CAGAATCTCA
250	260	270	280
GTTTTGCAAG	ATGAAAAGAG	CTCTGGAAAC	TGGTTGCACA
290	300	310	320
AGGTAGAATG	TAATTTACTT	AATACTACTG	AACCATACAC
330	340	350	360
TTAAAAATGG	TTGAAATGGT	AAATTTCATG	TATGTTTTAT
370	380	390	400
CACAATTAAA	ATATATATAT	ATATTTGGAT	GGGAGGTTGG
410	420	430	440
GTGGGTGGAT	GGATGGGTAG	ATGGATGGAC	AGATGAACGG
450	460	470	480
ATGGATAAGA	TCTCAAGTTC	CACCCTCCCT	CCTGGCTCAG
490	500	510	520
GAATTACCAG	ATTATCAGAG	ATATCAGGGC	CCTCAGAGGT
530	540	550	560
TGTCTTGTCC	AAGGTCTTCA	ATACACAAAT	AGTGAAACAG
570	580		
<u>GCTTGGAGAA</u>	<u>GGGAAGCTTA</u>	<u>CA</u>	

図 1 6 B *c-fms* 遺伝子欠失部分の DNA sequence

第Ⅲ章 欠失型 *c-fms* 癌遺伝子の発現に関する解析

第1節 概要

intron には mRNA の転写を制御する enhancer, silencer 機能を持つことがあると言われている²⁴⁾。また intron の変化による正常 splicing の障害が報告²⁵⁾されており、そこで Ca9-22 での *c-fms* 遺伝子の intron 11 の 426bp の欠失の転写レベルでの影響を Northern hybridization 法ならびに *in vitro* の自己リン酸化反応で検討した。さらに、ligand CSF-1 の Ca9-22 の増殖能におよぼす影響を検査した。

第2節 材料および方法

第1項 RNA抽出²¹⁾

RNA は細胞を氷冷 Tris-buffer saline で洗浄後、10ml の guanidine-HCl RNA 抽出液で細胞を溶解し、0.5 倍量の ethanol で核酸を沈澱させた。この操作を2回繰り返す、最後に 0.3M の sodium acetate, 2 倍量 ethanol にて RNA を沈澱させた (図 17)。

第2項 Northern hybridization²¹⁾

抽出 RNA を formaline 含有 agarose gel にて電気泳動し、nitrocellulose membrane filter に転写した。80 °C にて固定後、50%formamide 含有 prehybridization buffer を加え、³²P でラベルした probe を添加後 hybridization を行なった。洗浄液で洗浄後 autoradiography を行った (図 18)。

第3項 *In vitro* リン酸化反応^{26) 27)}

細胞を Triton X-100 と sodium deoxycholate 含有 buffer にて溶解後、遠心にて核除去し、rabbit anti-*fms* product polyclonal antibody (Cambridge Research Biochemicals, England) を加え、抗原抗体反応し

た。 *Staphylococcus aureus* protein-A-sepharose にて免疫沈降させ、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とインキュベートした。7.5% SDS polyacrylamide slab gel にて電気泳動後、gel を乾燥させ autoradiography を行った (図 19)。

第4項 Ligandによる増殖反応

c-fms 遺伝子産物の ligand である CSF-1 に対する Ca9-22 培養細胞の反応を増殖曲線で観察した。添加 fetal bovine serum 濃度を漸次減じて、細胞増殖能が低下した 0.1% serum 濃度を ligand CSF-1 の反応に用いた。使用した CSF-1 は、ヒト組み換え体 M-CSF (Genzyme Corporation, USA) で、macrophage の実験系^{28) 29)} で増殖が認められた 40units/ml を中心に濃度を変化させ反応を観察した。

第3節 結果

第1項 Northern hybridization

図 20 に示すように HSC-2, Ca9-22, HSC-3 とともに 4.0kb のバンドを検出した。若干のバンドの濃淡が現れているがコントロールの β -actin の発現も同様のパターンを示しており、電気泳動時の RNA 量の違いに起因するものと考えられる。したがって、Northern hybridization 法では *c-fms* 遺伝子の発現の変化は質的にも量的にも認められないと考えられた。

第2項 *In vitro* リン酸化反応

Ca9-22 におけるこの遺伝子変化が *c-fms* 産物に与える影響を *c-fms* 産物の自己 tyrosine のリン酸化反応で検索した。図 21 に示すように、HSC-2, Ca9-22 で 150 と 130kDa のバンドが観察された。この結果では白血球で成熟型のリン酸化の亢進がみられ、2つの扁平上皮癌株では 130, 150kDa 共ほほ同様にリン酸化反応が観察された。

第3項 Ligand CSF-1 に対する培養細胞の増殖反応

c-fms 遺伝子産物の ligand である CSF-1 に対する培養細胞の増殖に関する反応を増殖曲線で観察した。図 2 2 に示すように漸次 serum 濃度を減じ、0.1% serum 濃度の時、CSF-1 を 40units/ml を中心に濃度を変化させ反応を観察したが、細胞増殖能の変化は認められなかった。

- 1, Wash the monolayers with ice-cold Tris-buffer saline.
- 2, Add 10ml extraction buffer (8M guanidine-HCl, 0.1M sodium acetate, 1mM dithiothreitol, 20mM EDTA).
- 3, Add 0.5 volume of ethanol. Store the solution for 2hr at -20°C .
- 4, Recover RNA by centrifugation at 5,000g for 10min.
- 5, Repeat steps 2-4 twice.
- 6, Dissolve the pellet in 500 μ l of water and add 2 volume of ethanol.
- 7, Recover RNA by centrifugation at 5,000g for 10min.
- 8, Dissolve the pellet in 450 μ l of water and 50 μ l of 3M sodium acetate. Add 2 volume of ethanol.
- 9, Recover RNA by centrifugation at 5,000g for 10min.
- 10, Dissolve RNA in 50 μ l of H₂O.

图 1 7 RNA 抽出法

1. Separate the RNA by electrophoresis through an agarose gel.
2. Transfer to the nitrocellulose filters for 12-18 hr.
3. Fix the RNA to the filter by baking for 30min to 2hr at 80°C in vacuum oven.
4. Incubate the filters in the prehybridization buffer (50% formamide, 6xSSC, 0.65M NaCl, 0.1M sodium PIPES, 5xDenhardt's solution, 0.1%SDS, 5mM EDTA, 0.1mg/ml sonicated salmon sperma DNA) for 2-12hr at 37-42°C .
5. Hybridization of radiolabeled probes to RNA in prehybridization buffer containing 10% dextran sulfate for 12-24hr at 37-42°C .
6. Wash the filters with 2x-0.1xSSC, 0.1%SDS at 65°C .
7. Autoradiography.

图 1 8 Northern hybridization 法

1. Lyse cells with RIPA buffer(50mM Tris-HCl (pH7.4), 150mM NaCl, 20mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% sodium dodecylsulfate) containing 2% aprotinin and 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride.
2. incubate the lysate with the rabbit anti fms product polyclonal antibody for 30min at 22°C and overnight at 4°C .
3. Add *Staphylococcus aureus* protein-A-sepharose and collect immune complexes.
4. incubate the precipitates with 50mM HEPES, 10mM MnCl₂, 1% Triton X-100, and 20 μCi/ml adenosine [γ -³²P] 5' triphosphate for 10min at 30°C .
5. Separate by electrophoresis in 7.5% SDS-polyacrylamide slab gels.
6. Autoradiography.

図 19 *In vitro* リン酸化反応の方法

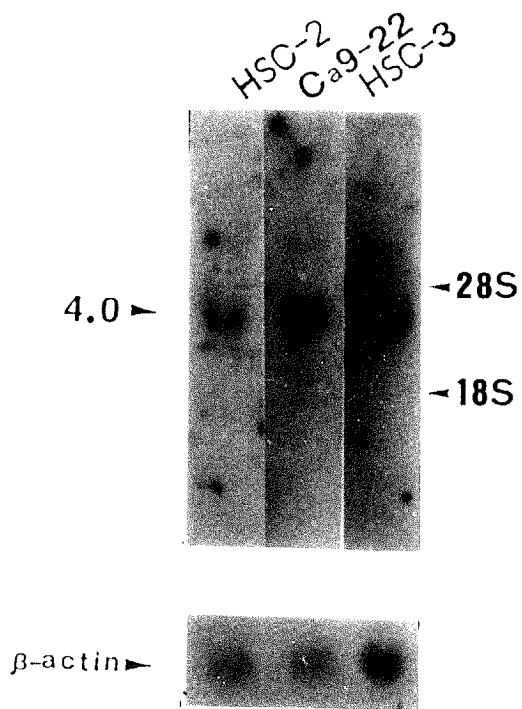


図 2 0 Northern hybridization の結果



図 2 1 *In vitro* リン酸化反応の結果

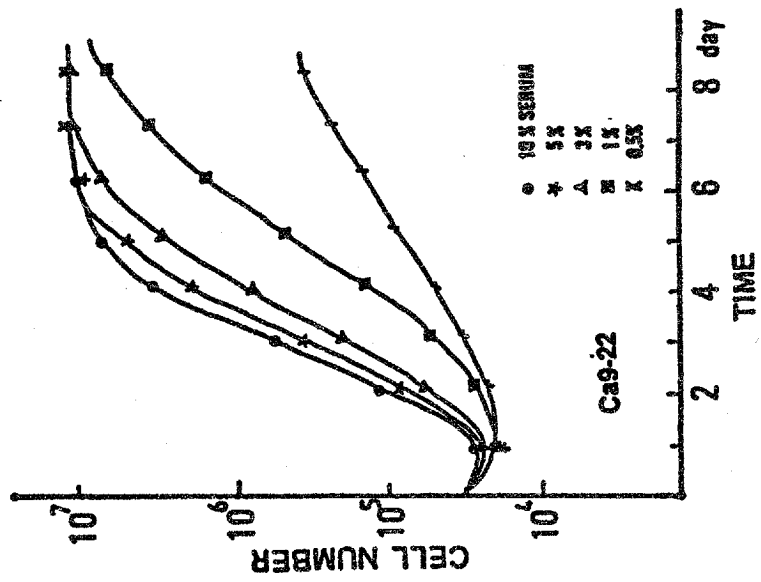
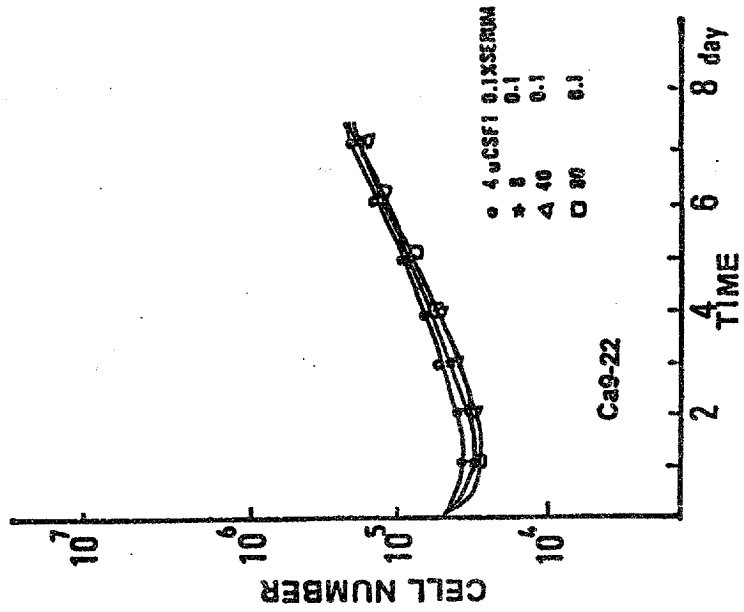


図 2 2 Ligand CSF-1 に対する培養細胞の増殖反応

第IV章 c-*fms* 癌遺伝子制限酵素多型性の出現頻度

第1節 概要

c-*fms* 癌遺伝子の変化の出現頻度とヘテロ接合性の消失の有無を検索する目的で、口腔腫瘍患者の腫瘍組織あるいは末梢白血球より genomic DNA を調整し、Southern hybridization 法にて検索した。426bp 欠失型を a, 他を b とすると対立遺伝子型として aa, ab, bb の3型が考えられる (図23)。ヒト口腔腫瘍と末梢白血球の66例におけるこれらの遺伝子型の出現頻度を検討した。

第2節 材料および方法

検索した口腔腫瘍組織は扁平上皮癌24例, その他, 悪性黒色腫, 悪性リンパ腫など22例と正常ならびに悪性腫瘍患者末梢血20例である。口腔腫瘍患者の腫瘍組織あるいは末梢白血球より genomic DNA を調整し, 先述の方法で c-*fms* を probe とした Southern hybridization 法にて検索した。

第3節 結果

第1項 扁平上皮癌

表1に示すように扁平上皮癌の genotype は aa 0例, ab 1例, 他はすべて bb であった。

第2項 その他の口腔腫瘍

その他の腫瘍では aa 1例, ab 5例, bb 16例であった (表1)。

第3項 ヒト白血球

ヒト末梢白血球では *aa* 1例, *ab* 3例, *bb* 16例であった (表1)。

第4項 総計

総計すると *aa*型 3.1%, *ab*型 13.5%, *bb*型 83.4%であった。また検索した中には、ヘテロ接合性の消失は見出し得なかった (表1)。

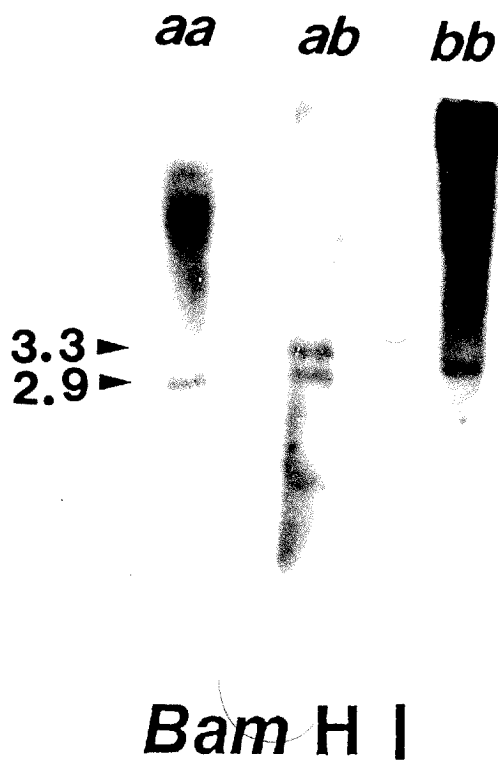


図 2 3 *c-fms* 遺伝子の genotype

	Genotype (%)		
	<i>aa</i>	<i>ab</i>	<i>bb</i>
T u m o r s			
SCC*	0(0)	1(4.2)	23(95.8)
Others	1(4.6)	5(22.7)	16(72.7)
W B C	1(5.0)	3(15.0)	16(80.0)
T o t a l	2(3.1)	9(13.5)	55(83.4)

* squamous cell carcinoma

表 1 *c-fms* 遺伝子 genotype の出現頻度

第V章 考察

第1節 *c-fms* 癌遺伝子の変化領域の解析

本研究は、池本ら(1988)¹⁰⁾がヒト口腔扁平上皮癌細胞株 Ca9-22 において、*v-fms* 癌遺伝子を probe とした Southern hybridization 法にてバンドの変化を観察したので、まずその変化領域を決定し、クローニングすることから開始した。変化領域の決定は、*v-fms* を probe とした Southern hybridization 法を行うことで、変化領域のおおまかな位置を、遺伝子の制限酵素地図から推測した。制限酵素 *EcoR* I 切断時に Ca9-22 で 28.5kb, HSC-2 および HSC-3 で 12.5kb のバンドを観察した。制限酵素 *BamH* I 切断時は Ca9-22 で 3.3kb のバンドが 2.9kb へと変化を検出した。先述したように *c-fms* の遺伝子地図で、*BamH* I 切断部位の 3.3kb 断片内に *EcoR* I 切断部位が存在し、この部分の短縮が生じているので、*EcoR* I 切断部位を含む遺伝子の部分的な欠失が予測された。なお *Hind* III 切断時に 3.2, 1.2, 2.8kb 断片を検出し、バンドの変化は認められなかった。これは 3.2kb 断片検出部位が 2ヶ所あり、一方の変化が約 400bp の欠失であろうと考えられるため、3.2kb から 2.8kb へ変化し、もとの 2.8kb 断片と重なったためバンドの変化が認められなかったと考えられた。以上の結果をより明確に、また単純にするため遺伝子地図の 3.3kb *BamH* I 切断断片のみを検出できる *c-fms* probe を用いて、遺伝子の変化を単一バンドで観察することを試みた。結果に示したように、*Hind* III 消化時にも、3.2kb から 2.8kb に変化を認め、*EcoR* I 切断部位を含む約 400bp の欠失でこれらの現象が説明された。

第2節 *c-fms* 癌遺伝子の変化領域のクローニング

第1節で intron 11 の *EcoR* I 切断部位を含む約 400bp の欠失が予測されたので、その部位のクローニングを試みた。*BamH* I または *Hind* III 消化時の genomic library を作成し、*c-fms* を probe に目的断片を選別する方法が考えられる。しかし、すでに Hampe ら(1989)¹¹⁾により *c-fms* の

遺伝子の全塩基配列が決定されており、クローニング断片も比較的短いので、polymerase chain reaction法を用いて行うことを考えた。20merの設定 oligonucleotide primerは、(1)塩基の分布がランダムであること、(2)2つの primerのG+C含量が40-60%であること、(3)2次構造をとらないこと、(4)primer dimerを形成しないこと、(5)その配列に特異性が高く、検体中の他の領域を増幅しないこと等に注意し³⁰⁾作成した。また、将来vectorへのサブクローニングのために各々2塩基ずつ変化させ、*Bam*H Iと*Hind* III切断部位を作成した²³⁾。この primerを用いたPCR予想増幅断片は592bpである。先述したPCRの増幅の結果では、WBCで580,490bp、Ca9-22で490,160bpを認めた。WBCで認めた580bpが*c-fms*遺伝子の予測された増幅断片582bpに相当すると考えられた。したがって、490,160bp断片が*c-fms*欠失断片と考えられるが、Southern hybridization法の結果より約400bpの欠失が考えられたので、160bp断片が有力であった。そこで、これらの断片をそれぞれM13mp18にligateし、DNA sequenceを行った。それぞれのDNA sequenceの結果、予想通り580,160kbが*c-fms*の塩基配列であった。PCR法を用いた場合、直接に塩基配列を決定することが可能であると報告³¹⁾されており、著者も直接塩基配列決定法を試みたが成功しなかった。PCR産物の精製状態、各々のdNTPsの濃度、第3の primerの使用³²⁾、および非対称PCR法の利用³³⁾等の条件設定の必要があると考えられた。PCR法を用いた直接塩基配列決定法は、PCR法の欠点である読み違い³⁰⁾を克服できると言われている。本実験では直接塩基配列決定法を使用できなかったが、M13mp18にサブクローニングして複数個のクローンの塩基配列を決定した結果、すべて報告されている*c-fms*の塩基配列と一致した。サブクローニングしたものに限りPCRの読み違いはなかったと考えられた。

Ca9-22における欠失領域はintron 11内の*Eco*R I切断部位を含む426bpであることが明かとなり、Verbeekら(1985)の報告¹⁷⁾と一致した。この領域はexon 12から約300bp上流に位置し、AAG-AAGの426bpが欠失していたため制限酵素多型性が生じると考えられた。癌遺伝

子で制限酵素多型性が報告されているのは *L-myc* と *Ha-ras* 遺伝子である。*L-myc* 遺伝子の制限酵素多型性は *EcoR* I 消化時に 10kb(L band) と 6kb(S band) が出現し、肺癌でのリンパ節ならびにその他の組織への転移能が Genotype L-S と S-S で高頻度であると報告¹³⁾された。大腸癌にも応用されたが有意な差は認められなかった³⁴⁾。*Ha-ras* 遺伝子では Krontiris ら (1985)¹⁴⁾ が 3' 部分の tandem repeated nucleotides 領域の制限酵素多型性と腫瘍発生の危険性との関連を報告した。また, Lidereau ら (1986)¹⁵⁾ や Heighway (1986)³⁵⁾ は肺癌での *BamH* I の *Ha-ras* 遺伝子制限酵素多型性で稀なバンドが高頻度出現することを報告した。本実験では, *c-fms* 癌遺伝子における制限酵素多型性の生じる機構について解明することに成功した。しかしこの多型性が生じる理由ならびに意義は現在不明である。

第3節 欠失型 *c-fms* 遺伝子の発現に関する解析

Ca9-22 における intron 11 の 426bp の欠失による発現レベルでの影響を Northern hybridization 法にて観察した。すでに Coussens ら (1986)⁵⁾ により *c-fms* の cDNA が単離されており、全長 4291 nucleotides で 972 amino acids と報告されている。著者の結果では観察した3株とも約 4.0kb のバンドが出現し, *c-fms* 遺伝子欠失型に特異的变化は見出し得なかった。Walker ら (1987)¹²⁾ は carcinogen 誘発ラット気管上皮由来の扁平上皮癌で, *c-fms* の発現の増強と変化を報告している。しかし、遺伝子の変化は検出されていない。著者も, Ca9-22 において *c-fms* の mRNA の変化を期待したが、認め得なかった。一般に mRNA は DNA から pre-mRNA として核内で転写され, intron 部分が splicing されて完成すると言われている。intron 部分の変化による splicing の異常は, Yamashita ら (1990)³⁶⁾ により, exon intron junction の G から A への変化として報告されている。また Yoshimatsu ら (1989)²⁵⁾ は人工 intron による splicing の温度制御に成功している。これらの報告から intron による遺伝子発現の調節は、将来特に注目される分野となってくるで

あろうと思われる。Ca9-22での intron 11 の 426bp の欠失領域に、今迄知られている転写因子の結合領域の存在をコンピューターにて検討した。その結果 Sp1, OTF-1, -2, AP-1, -2, -3, -4, CBP, HSTF, CREB 等の転写因子 DNA 結合領域³⁷⁾は存在しないことが判明した。426bp の欠失が splicing に何らかの影響を与えるか否かは不明である。

c-*fms* 癌遺伝子は Sherr ら (1985)¹⁾ Coussens ら (1986)²⁾ により、自己を含む tyrosine リン酸化能を持つことが報告されている。そこで Ca9-22 における c-*fms* 癌遺伝子産物の自己 tyrosine のリン酸化反応を検討した。c-*fms* 遺伝子産物は細胞質から膜への過程で 130kDa の未成熟な蛋白質に糖鎖が付加され 150kDa へと分子量が増加すると報告⁷⁾されている。この結果では白血球で成熟型のリン酸化の亢進がみられ、2つの扁平上皮癌株では 130,150kDa とほぼ同様にリン酸化反応が観察された。Ca9-22, HSC-2, および HSC-3 は c-*fms* 遺伝子の発現が示唆されたが、Ca9-22 と他の株での差は観察されなかったため、遺伝子の変化との関連はないと考えられた。また正常ヒト口腔粘膜ではバンドを認めず、発現はないと考えられた。さらに、ligand を加えて自己リン酸化能を観察したが、口腔扁平上皮癌株ではバンドの濃度の変化は認められなかった。このリン酸化が細胞内でどのように機能しているのかに関しては明かでないが、426bp の遺伝子の欠失とは関係ないと考えられた。c-*fms* の tyrosine リン酸化の細胞内 target として phosphorylate phospholipase C- γ , c-*raf* protooncogene product ならびに phosphatidylinositol-3'kinase などが候補として報告⁷⁾されているが、いまだ明確ではない。今後、細胞内 signal transduction の機構を明らかにしていく必要があると考えられる。

c-*fms* の ligand である CSF-1 は、マウス由来 L 細胞培養上清より精製³⁸⁾された分子量 70,000 の糖蛋白質である。ヒト CSF-1 はヒト尿中に見い出され³⁹⁾, Kawasaki ら (1985)⁴⁰⁾ により cDNA が単離された。分子量約 80,000 で分子量約 40,000 の同一サブユニットの 2 量体である。CSF-1 は骨髄中の単球前駆細胞が単球に成熟分化する過程で作用す

る。Dorshkind(1988)²⁸⁾によると、ヒト組み換え体 CSF-1 はマウス骨髄細胞の増殖を促進すると報告した。Rousselら(1989)²⁹⁾は *c-fms* 遺伝子を導入したマウス NIH3T3 細胞が、ヒト組み換え体 CSF-1 により増殖したと報告した。そこでヒト組み換え体 CSF-1 による Ca9-22 の細胞増殖能を検索したが、細胞増殖は認められなかった。これは Northern hybridization 法ならびに *in vitro* リン酸化反応の結果から推定されていたとうり、発現している *c-fms* 産物は膜への移行など post-transcriptional な制御が働いているのか、それとも増殖ではなく分化方向への機能をしているのか不明である。

第4節 *c-fms* 癌遺伝子の制限酵素多型性の出現頻度

c-fms 遺伝子の intron 11 の変化の出現頻度を検索した。426bp 欠失型を *a*、他を *b* とすると対立遺伝子型として *aa*, *ab*, *bb* の3型が検出された。*aa*, *bb* はホモ接合性 *ab* はヘテロ接合性を表し、今迄述べてきた Ca9-22 は genotype *aa* であったことが判明した。著者の66例の統計では *aa* 型 3.1%, *ab* 型 13.5%, *bb* 型 83.4% であった。Xuら(1985)¹⁰⁾ の48例の統計では *aa* 型 2%, *ab* 型 23%, *bb* 型 75% と報告しており、ほぼ同傾向を示していると考えられた。この出現頻度の差が何を意味しているのかは不明である。

家族性大腸ポリポージスや網膜芽細胞腫や Wilms 腫瘍などの癌は遺伝性と考えられている。その他の癌にも遺伝的背景が腫瘍発症や進行に関連していると考えられる。いくつかの癌遺伝子の RFLP が遺伝的背景の一部を表現しており、特定の癌の診断や治療に役立つ可能性がある。先述した *L-myc* 遺伝子 RFLP と肺癌の転移の関係¹³⁾ や、*Ha-ras* 遺伝子の RFLP と肺癌の発癌率の関係¹⁵⁾ のような *c-fms* と口腔腫瘍との関連性を観察したが、また検索した中には有意な関連は見い出せなかった。Boulwoodら(1991)⁴¹⁾ は *c-fms* の RFLP を用いて染色体 5q 欠失患者の *c-fms* 遺伝子の欠失を明らかにし、myelodysplasia との関係性を報告した。5q 領域は、CSF-1 をはじめ GM-CSF, IL-3, IL-4 お

よび IL-5 等の増殖因子や PDGF-R_β 等の receptor 遺伝子が存在し、血液細胞にとって重要な位置である⁷⁾。また Solomon ら (1987)⁴²⁾ や Vogelstein ら (1989)⁴³⁾ は大腸癌で 5q の部分的欠損を報告した。特殊な RFLP probe を用いてヘテロ接合性の消失を観察し、癌の進行や予後を推測した。しかし末梢白血球でヘテロ接合性を認めた口腔腫瘍患者の腫瘍組織での検索では、*c-fms* probe を用いた場合、ヘテロ接合性の消失は見い出せなかった。

第VI章 総括

- 1) *v-fms*ならびに *c-fms* probe を用いた Southern hybridization 法により、ヒト正常白血球とヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, -3) で *EcoR* I, *BamH* I および *Hind* III 消化時にそれぞれ 12.5, 3.3, 3.2kb の断片を認め、Ca9-22 ではそれぞれ 28.5, 2.9, 2.8kb の断片を認めた。この結果より *c-fms* 遺伝子地図と用いた probe の位置から、Ca9-22 の *c-fms* 遺伝子は intron 11 における約 400bp を欠失していることが予測できた。
- 2) Polymerase chain reaction 法により変化した遺伝子断片を増幅し、3個の増幅断片を得た。各々の断片を M13 phagemid に ligate し、塩基配列を決定すると、うち2個は *c-fms* 遺伝子の増幅断片で、他の1個は他領域の増幅断片と判明した。したがって、*c-fms* 癌遺伝子の制限酵素多型性は intron 11 内の *EcoR* I 切断部位を含む 426bp の欠失によることが明かとなった。
- 3) 欠失型 *c-fms* 遺伝子の発現を β -actin 遺伝子の発現量とともに観察したところ、Ca9-22 ならびに HSC-2, -3 で約 4.0kb のバンドがみられたが、この遺伝子の発現量の変化は正常型に対して顕著でなかった。
- 4) 欠失型 *c-fms* 遺伝子の遺伝子産物の自己 tyrosine のリン酸化能は、Ca9-22 と HSC-2 で約 150kDa と 130kDa の自己リン酸化された免疫沈降物を検出したが、質的にも量的にも正常型に対して著明な変化は認められなかった。
- 5) Ligand CSF-1 は 0.1% serum 存在下で Ca9-22 の細胞増殖を促進しなかった。
- 6) 対立遺伝子型として 426bp 欠失型を *a*、他を *b* として、*c-fms* 癌遺伝子の制限酵素多型性の出現頻度を検索すると、観察された遺伝子型は *aa* 型 3.1%, *ab* 型 13.5%, *bb* 型 83.4% であった。一部の癌ではヘテロ接合性の消失が癌化と深く関連すると報告されているが、末梢白血球でヘテロ接合性を示した口腔腫瘍患者の腫瘍組織ではヘテロ接合性の消失は見い出せなかった。

使用緩衝液

1) 10x High-salt buffer

1M NaCl

500mM Tris-Cl(pH7.5)

100mM MgCl₂

10mM dithiothreitol

2) 10x Medium-salt buffer

500mM NaCl

10mM Tris-Cl(pH7.5)

100mM MgCl₂

10mM dithiothreitol

3) 電気泳動用 TAE

0.04M Tris-acetate

0.001M EDTA

4) 電気泳動用 TBE

0.089M Tris-borate

0.089M boric acid

0.002M EDTA

5) Southern blotting

denaturing buffer

0.5M NaOH

1.5M NaCl

neutralization buffer

0.5M Tris-Cl (pH7.2)

1.5M NaCl

1mM EDTA

6) 20xSSC

3M NaCl

0.3M sodium citrate

7) 50x Denhardt's solution

- 1% Ficoll
- 1% polyvinylpyrrolidone
- 1% bovine serum albumin
- 8) PCR 10x amplification buffer
 - 500mM KCl
 - 100mM Tris-Cl (pH8.3)
 - 15mM MgCl₂
 - 0.1% gelatin
- 9) 10x CIP buffer
 - 0.5M Tris-Cl (pH9.0)
 - 10mM MgCl₂
 - 1mM ZnCl₂
 - 10mM spermidine
- 10) 10x ligation buffer
 - 660mM Tris-Cl (pH7.6)
 - 66mM MgCl₂
 - 100mM dithiothreitol
 - 1mM ATP
- 11) 5x sequenase buffer
 - 200mM Tris-Cl (pH7.5)
 - 100mM MgCl₂
 - 250mM NaCl

試薬

[α -³²P]dCTP, [α -³⁵S]dCTP, [γ -³²P]ATP は DuPont/NEN Research Products, Amersham を使用した。

分子生物学関係の試薬は、東洋紡、宝酒造、Boehringer Mannheim 製を使用した。

その他の試薬は片山化学工業（株）、半井化学工業（株）、和光純薬（株）製を使用した。

参考文献

- 1) Sherr, J.C., Rettenmier, W.C., Sacca, R., Roussel, F.M., Look, T.A., and Stanley, R.E. (1985): The *c-fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell*, 41, 665-676
- 2) Rambaldi, A., Wakamiya, N., Vellenga, E., and Horiguchi, J. (1988): Expression of the macrophage colony-stimulating factor and *c-fms* genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *J.Clin.Invest.*, 81, 1030-1035
- 3) McDonough, S.K., Larsen, S., Brodey, R.S. (1971): A transmissible feline fibrosarcoma of viral origin. *Cancer Res.*, 31, 953-956
- 4) Hampe, A., Gobet, M., Sherr, C.J., and Galibert, F. (1984): Nucleotide sequence of the feline retroviral oncogene *v-fms* shows unexpected homology with oncogenes encoding tyrosine-specific protein kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81, 85-89
- 5) Coussens, L., Beveren, V.C., Smith, D., Chen, E., Mitchell, L.R., Isacke, M.C., Verma, M.I., and Ullrich, A. (1986): Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene *fms* at carboxyl terminus. *Nature*, 320, 277-280
- 6) Roussel, M.F., Sherr, C.J., Baker, P.E., and Ruddle, F.H. (1983): Molecular cloning of the *c-fms* locus and its assignment to human chromosome 5. *J.Virol.*, 48, 770-773
- 7) Sherr, C.J. (1990): Colony-stimulating factor-1 receptor. *Blood*, 75, 1-12
- 8) Hampe, A., Shamon, B., Gobet, M., and Sherr, J.C. (1989): Nucleotide sequence and structural organization of the human *FMS* proto-oncogene. *Oncogene Res.*, 4, 9-17
- 9) Visvader, J., and Verma, I.M. (1989): Differential transcription of exon

- 1 of human *c-fms* gene in placental trophoblasts and monocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 9, 1336-1341
- 10)Arceci,J.R., Shanahan,F., Stanley,R., and Pollard,W.J. (1989): Temporal expression and location of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and its receptor in the female reproductive tract are consistent with CSF-1 regulated placental development. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 86, 8818-8822
- 11)Okabe,T., Sato,N., Kondo,Y., Asano,S., Ohsawa,N., Kosaka,K., and Ueyama,Y. (1978): Establishment and characterization of a human cancer cell line that produces human colony-stimulating factor. *Cancer Res.*, 38, 3910-3917
- 12)Walker,C., Nettesheim,P., Barrett,C.J., and Gilmer,M.T. (1987): Expression of a *fms*-related oncogene in carcinogen-induced neoplastic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA*, 84, 1804-1808
- 13)Kawashima,K., Shikama,H., Imoto,K., Izawa,M., Naruke,T., Okabayashi,K., and Nishimura,S. (1988): Close correlation between restriction fragment length polymorphism of L-MYC gene and metastasis of human lung cancer to the lymph nodes and other organs. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 85, 2353-2356
- 14)Krontiris,T.G., DiMartino,N.A., Colb,M., and Parkinson,D.R. (1985): Unique allelic restriction fragments of the human Ha-ras locus in leukocyte and tumour DNAs of cancer patients. *Nature*, 313, 369-373
- 15)Lidereau,R., Escot,C., Theillet,C., Champeme,M., Brunet,M., Gest,J., and Callahan,R.(1986): High frequency of rare alleles of the human *c-Ha-ras-1* proto-oncogene in breast cancer patients. *JNCI*, 77, 697-701
- 16)Xu,Q.D., Guilhot,S., and Galibert,F. (1985): Restriction fragment length polymorphism of the human *c-fms* gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 82, 2862-2865
- 17)Verbeek,S.J., Roebroek,M.J.A., Ouweland,W.M.A., Bloemers,J.P.H.,

- and Ven, M.J.W. (1985): Human *c-fms* proto-oncogene :Comparative analysis with an abnormal allele. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 422-426
- 18) 池本公亮, 村上和億, 大岡俊夫, 西野 宏, 石川武憲, 下里常弘, 丹羽太眞, 横路謙次郎 (1988): ヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞株 (KGK) における癌遺伝子の検索. 日口科誌, 37, 1351-1352
- 19) 堀越勝, 木村義孝, 名倉英明, 小野富明, 伊藤秀夫 (1974): 人の歯肉癌由来の細胞株の樹立 (第1報). 日口外誌, 20, 100-106
- 20) 百瀬文雄, 平田章二, 新井田俊雄, 田中信幸, 塩田重利 (1986): 3つの口腔扁平上皮癌由来細胞の性状について. 日口科誌, 35, 485-496
- 21) Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York
- 22) 口野嘉幸, 平井久丸, 桜井郁之介 (1987): 遺伝子・タンパク質 実験操作プロットイング法. ソフトサイエンス社, 東京
- 23) Scharf, J.S., Horn, T.G., Erlich, A.H. (1986): Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequence. *Science*, 233, 1076-1078
- 24) Howard, T.E., Shai, S., Langford, K.G., Martin, B.M., and Bernstein, K.E. (1990): Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic *ACE* gene. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4294-4302
- 25) Yoshimatsu, T., and Nagawa, F. (1989): Control of gene expression by artificial introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 244, 1346-1348
- 26) Rettenmier, C.W., Chen, J.H., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1985): The product of the *c-fms* proto-oncogene: A glycoprotein with associated tyrosine kinase activity. *Science*, 228, 320-322
- 27) Roussel, M.F., Dull, T.J., Rettenmier, C.W., Ralph, P., Ullrich, A., and Sherr, C.J. (1987): Transforming potential of the *c-fms* proto-oncogene (CSF-1 receptor). *Nature*, 325, 549-552
- 28) Dorshkind, K. (1988): IL-2 inhibits B cell differentiation in long term

bone marrow cultures. *J.Immun.*, 141, 531-538

29) Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1989): Mouse NIH3T3 cells expressing human colony-stimulating factor 1 (CSF-1) receptors overgrow in serum-free medium containing human CSF-1 as their only growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7924-7927

30) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491

31) Wong, C., Dowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.A., and Kazazian, H.H. (1987): Characterization of β -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature*, 330, 384-386

32) Engelke, D.R., Hoener, P.A., and Collins, F. (1988): Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 544-548

33) Gyllensten, U.B. and Erlich, H.A. (1988): Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the *HLA-DQA* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7652-7656

34) Ikeda, I., Ishizaka, Y., Ochiai, M., Sakai, R., Itabashi, M., Onoda, M., Sugimura, T., and Nagao, M. (1988): No correlation between L-*myc* restriction fragment length polymorphism and malignancy of human colorectal cancers. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79, 674-676

35) Heighway, J., Thatcher, N., Cerny, T., and Hasleton, P.S. (1986): Genetic predisposition to human lung cancer. *Br. J. Cancer*, 53, 453-457

36) Yamashita, S., Hui, D.Y., Sprecher, D.L., Matsuzawa, Y., Sakai, N., Tarui, S., Kaplan, D., Wetterau, J.R., and Harmony, J.A. (1990): Total deficiency of plasma cholesteryl ester transfer protein in subjects homozygous and heterozygous for the intron 14 splicing defect.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 170, 1346-1351

37) 中谷喜洋 (1991): 転写調節に関与するDNAエレメントおよび蛋白因子. *実験医学*, 9, 204-211

38) Stanley, E.R., and Heard, P.M. (1977): Factors regulating macrophage production and growth. *J. Biol. Chem.*, 252, 4305-4312

39) Motoyoshi, K., Takaku, F., Mizoguchi, H. and Miura, Y. (1978): Purification and some properties of colony-stimulating factor from normal human urine. *Blood*, 52, 1012-1020

40) Kawasaki, E.S., Ladner, M.B., Wang, A.M., Arsdell, J.V., Warren, M.K., Coyne, M.Y., Schweickart, V.L., Lee, M., Wilson, K.J., Boosman, A., Stanley, E.R., Ralph, P., and Mark, D.F. (1985): Molecular cloning of a complementary DNA encoding human macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1). *Science*, 230, 291-296

41) Boultonwood, J., Rack, K., Kelly, S., Madden, J., Sakaguchi, A.Y., Wang, L., Oscier, D.G., Buckle, V.J., and Wainscoat, J.S. (1991): Loss of both CSF1R (*FMS*) alleles in patients with myelodysplasia and a chromosome 5 deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6176-6180

42) Solomon, E., Voss, R., Hall, V., Bodmer, W.V., Jass, J.R., Jeffreys, A.J., Lucibello, F.C., Patel, I., and Rider, H. (1987): Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature*, 328, 616-619

43) Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y., and White, R. (1989): Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 244, 207-211,