

論文題名

口腔扁平上皮癌におけるマイクロサテ
ライト不安定性と癌関連遺伝子変異の
相関性に関する研究

学位申請者

宮内 美和

原著

原稿総ページ数（図表を除く） 35

写真 4

図 2

表 7

別刷数 100

連絡先 宮内 美和

（所属） 広島大学歯学部口腔外科学第二講座

電話 内線番号 3244

（住所） 〒731-0221

広島市安佐北区可部二丁目 2-28

電話番号 082(815)9076

表題

口腔扁平上皮癌におけるマイクロサテ
ライト不安定性と癌関連遺伝子変異の
相関性に関する研究

口腔扁平上皮癌におけるマイクロサテライト不安
定性と癌関連遺伝子変異の相関性に関する研究

宮内 美和

Studies on Correlation between Microsatellite
Instability and Mutations of Cancer-Related Genes in
Oral Squamous Cell Carcinoma

Miwa Miyauchi

(1月19日受付)

緒 言

癌は遺伝子の病気であり，発癌は，癌遺伝子
や癌抑制遺伝子の異常が複数個蓄積することによ
り，多段階的に起こっていることが明らかになっ
てきた¹⁾。癌遺伝子の活性化には，遺伝子の変異，
再構成，増幅などが，癌抑制遺伝子の不活化には，
遺伝子の変異や欠失が関与すると考えられている

脚注

1)。以上のことから，癌関連遺伝子の変異につき検索することは，発癌の原因遺伝子を解明する上で極めて重要であると考えられる。種々の外因や DNA 複製の過程で遺伝子変異は起こると考えられるが，細胞には変異を生じさせないようにする防御機構があり，そのため遺伝子変異の頻度は低い。この防衛機構には，DNA 修復機構とスピンドルチェックポイントがある²⁾。もしこれらの機構に異常が生じれば，遺伝子変異の頻度は上昇し，発癌が促進されることが考えられる。DNA 修復機構には，ミスマッチ修復(MMR)や，塩基除去修復，ヌクレオチド除去修復のあることが知られているが，MMR 異常は，遺伝性非腺腫症性大腸癌の原因となっており，さらに大腸癌，胃癌，膵癌，子宮内膜癌などの散発性癌でもこの異常の関与していることが明らかになっている^{3,4)}。この異常が生じると DNA 複製の過程でエラーを生じやすい少数塩基の繰り返し配列であるマイクロサテライト部位での遺伝子変異の頻度が上昇し，その結果，挿入／欠失（フレームシフト）型の異常の頻度が高くなる³⁾。この結果，マイクロサテライト配列を蛋白翻訳領域に含む癌関連遺伝子にフレー

ムシフト変異が生じやすくなるものと考えられている^{3,4)}。実際に、MMR 異常のある癌において、高頻度に異常がみられるマイクロサテライト配列部位を蛋白翻訳領域に含むいくつかの癌関連遺伝子の変異が明らかになっている⁵⁻⁸⁾。また、堀井ら⁴⁾は、高頻度に MMR 異常が認められる胃癌、大腸癌、子宮内膜癌などで、これらの癌関連遺伝子変異を検索した結果、各臓器に変異が生じている遺伝子は異なっていることから、発癌に関与する遺伝子は臓器特異性のあることが報告されている。

Higashikawa *et al*⁹⁾は、口腔扁平上皮癌(OSCC)における MMR 異常によるマイクロサテライト不安定性(MI)を検索し、単発癌と多重発癌では共に MI の頻度が低く、これらの発癌に MMR 異常は強く関与していないことを報告した。しかし、OSCC、特に多発癌における MI の関与を結論づけるには被験症例が少なく、また MI の認められた例(MI(+))における癌関連遺伝子変異の検索も十分でない。そこで、遺伝子変異の生じる頻度が上昇していると考えられる MI(+)例において癌関連遺伝子変異を検索することは重要であり、

OSCC の発生の原因遺伝子を解明する一助となると考えた。

マイクロサテライト配列部位は、繰り返し回数
の複製エラーを起こすが、さらにこの部位の広範
囲に欠失の生じやすいことも知られている^{1,10)}。
癌抑制遺伝子産物は、1 hit によりその遺伝子の
片方のアレルに部分欠失 (LOH; Loss of
heterozygosity) が生じ、2 hits で残りのアレルに点
突然変異が生じて不活化することが知られている¹¹⁾。
最近では、マイクロサテライトマーカを用
いた PCR 法により、詳細に遺伝子領域全体に渡
り LOH の検索がなされ、既存の癌抑制遺伝子異
常の検索¹⁵⁾や、新たな癌抑制遺伝子の同定が行
われるようになった。丹沢ら¹²⁾や Higashikawa *et*
*al*⁹⁾は 3q23, 9q21, 11q23, 18q21.1 には口腔扁平上
皮癌 (OSCC) に特徴的な LOH 領域が存在すること
を報告している。因みに、Kim *et al*¹³⁾は、18q21.1
領域の LOH を OSCC 検索例の 47% に認められ、
この領域に存在する癌抑制遺伝子 DPC4 の遺伝子
には、2 hits となる変異の証左は得られなかつた
と報告しており、OSCC への DPC4 異常の関与は
明確にされていない。今回の一連の検索で、DPC4

にもマイクロサテライト配列領域があることから、この領域の変異を検索する必要性を考えた。

今回、本研究では、マイクロサテライト配列を遺伝子領域内に含む各種癌関連遺伝子と癌抑制遺伝子 **DPC4** について、**MI(+)** **OSCC** 症例とこれら遺伝子の同配列部位での変異様相との関連を明らかにし、さらに **MI(+)****OSCC** に深く関与する癌関連遺伝子を同定するために、以下の検索を行った。

被験対象と実験方法

I. 被験対象

MI(+) **OSCC** 症例の検出のための **MI** の検索対象には、本学歯学部附属病院第二口腔外科で生検、または外科的に切除された単発性 **OSCC** 38 例と口腔内と食道での多発性 **OSCC** 7 例の計 45 例を用いた。平均年齢は 61.9 歳で、男性 28 例、女性 17 例、初発部位は歯肉 23 例、舌 15 例、口底 4 例、口唇 1 例、頬粘膜 2 例であった。1997 年の **UICC**(International Union Against Cancer)の分類¹⁴⁾では、I 期 12 例、II 期 6 例、III 期 18 例、IVa 期 7 例、および IVb 期 2 例であった(表 1)。な

表 1

お、正常コントロールとして、同一癌患者の非癌化部口腔 粘膜上皮や末梢血リンパ球を用いた。

今回、MI と LOH の検索にあたり、Higashikawa *et al*⁹⁾ がすでに報告した 45 症例についても、再度検索を行った。

癌関連遺伝子のマイクロサテライト配列部位における変異の検索については、今回著者の新たに検出した MI(+) 5 例に、MI(+) と LOH の判明している 5 症例⁹⁾を追加して被験対象とした(表 6-1)。

II. 実験方法

1. Genomic DNA の抽出法

新鮮組織および 10%ホルマリン固定・パラフィン包埋された癌組織、またコントロールとして正常組織から、通法により^{15,16)}、Proteinase K 消化後、フェノール・クロロホルム処理法によって Genomic DNA を抽出した。

2. MI と LOH の検索法

1) Polymerase Chain Reaction (PCR)法

による MI の検出

MI(+) OSCC 例を検出するために、マイクロサ

テライトマーカを用いた PCR 法によってマイクロサテライト領域を増幅し，MI による複製回数エラーを検出した。プライマーとして，28 回の CA の反復配列を含む領域の D2S123，また A がそれぞれ 25 回，26 回，および 40 回の反復配列を含む領域の BAT25，BAT26，および BAT40 の 4 種のマイクロサテライトマーカを用いた^{5,9)}。プライマーには，Human map pairs - polymorphic maker (Research genetics 社)や宝酒造社(株)製のものを用いた。45 症例につき前述の 4 つの領域のマーカを検索し，1 領域以上に MI が認められた場合，この症例を MI(+)と判定した。

2) PCR 法による p53 遺伝子の LOH の検出

p53 遺伝子は，種々の臓器や組織に発生する癌に遺伝子変異が生じており，癌組織の診断に極めて有用であることが知られている。p53 は，DNA 損傷時に細胞周期を G0 期に停止させ，DNA 修復を促進させることが知られているが¹⁷⁻¹⁹⁾，最近では p53 が放射線や紫外線によって損傷を受けた DNA を修復するヌクレオチド除去修復機構に関与し，この修復機構を促進させることが報告されている²⁰⁾。以上のことから，p53 に異常が生じ

れば、DNA 修復が正しく行われなくなり、遺伝子変異の頻度は上昇し、特にマイクロサテライト配列領域をもつ癌関連遺伝子変異の発現と関連している可能性が考えられる。今回、遺伝子修復異常に関与する p53 遺伝子異常とマイクロサテライト配列をもつ癌関連遺伝子変異との関連を知るために、p53 遺伝子のイントロン領域内の 25 回の CA の反復配列を含むマイクロサテライトマーカの TP53¹¹⁾をプライマーとして用いて OSCC 45 例に対し、LOH の検索を行った。LOH の判定は、Higashikawa *et al*⁹⁾が行った方法を用いた。

3. 癌関連遺伝子のマイクロサテライト配列部位におけるフレームシフト変異変異の検索法

1) PCR 法による癌関連遺伝子変異の検出

MI(+)の場合、遺伝子変異の頻度が上昇するが、特にマイクロサテライト配列は、遺伝子異常の標的になりやすいとされている^{3,4,21)}。MI(+)例でいくつかのマイクロサテライト配列をもつ癌関連遺伝子変異が報告されているが^{3,4,5-8)}、堀井ら⁴⁾は癌の原発臓器によって変異を起こしている遺伝子は異なっていると報告している。今回、MI(+)OSCC

に關与する遺伝子変異を検索するために、蛋白翻訳部位にマイクロサテライト配列がある癌関連遺伝子 (BAX, IGF1R, DPC4, PTEN, BRCA1, BRCA2, ICE, hMSH3, hMSH6) の同配列部位に特異的なプライマーを用い、フレームシフト変異を検出した (表 2)。DPC4 については、Genome Data Base より (G)₆ を含む部位にプライマーを設定した (図 1)。他の遺伝子のプライマーの配列は、Genome Data Base および既報の論文⁶⁻⁸⁾を参照し、Human map pairs-polymorphic maker (Research genetics 社) や宝酒造社 (株) 製の製品を用いた。PCR の条件としては、Genomic DNA 50ng, dNTP 1.5mM, Taq polymerase (Ampli Taq DNA polymerase, N801-0060, Perkinelme 社) 0.5U, 10×PCR buffer (Perkin - elmer 社) 1.5μl を総量 15μl に調整した。PCR 反応は、Programamable Thermal Cycler (M.J.Research) 上で、denature は 94℃ で 30 秒間、extension は 70~72℃, 0.5~1 分間のサイクルを 1 回分とし、35~40 回行った。MgCl₂ 濃度、annealing 時間や温度等の条件はマーカーにより異なるため、表 2 に総括して示した。初回の denature は 92℃ で 4 分間、また最終の extension は 72℃, 6 分間の条件で行った。

表 2

図 1

PCR産物を8M尿素-6%アクリルアミドゲル，1×TBE緩衝液上で，65ワットで，1.5~2時間電気泳動し，半日から3日間，Fuji RXフィルムによりオートラジオグラフィーを行った。腫瘍例(T)に繰り返し回数の違うPCR産物が発現した場合，回数が増加すると正常バンドの上に，回数が減少すると正常バンドの下に付加像が生じる。これを変異バンドと判定した。

2) Direct sequence法による変異部位の確認法

変異と判定されたバンドより，通法に従い^{15,16)} Genomic DNAを抽出し，Circum Vent Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit (New England Biolabs)を使用して，PCRに用いたプライマーでDirect sequence反応を行った。電気泳動は，8M尿素-6%アクリルアミドゲル上で，75ワット，1~1.5時間の条件で行った。Fuji RXフィルムによりオートラジオグラフィーを1~3日間行い，変異部位を確認した。

4. BAX 遺伝子変異の検索法

1) Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)法による変異の検出

p53 の転写因子であり、アポトーシスに参与している癌抑制遺伝子である BAX 遺伝子については、MI(-)OSCC 例 65 例で、BAX 遺伝子の全エクソン(exons1~6)につき、SSCP 法によって遺伝子変異を検索した。検索症例を表 3 に示す。プライマーは、Chou *et al*²²⁾ の用いた配列を用い (表 4)、Human map pairs-polymorphic maker (Research genetics 社) や宝酒造社 (株) 製の製品を用いた。PCR の条件として、Genomic DNA は 50ng, dNTP は 1.5mM, Taq polymerase (AmpliTaq DNA polymerase, N801-0060, Perkinelme) は 0.25U, 10× PCR buffer (Perkinelme) は 1.5 μ l, Mg 濃度は 1.5mM で、総量は 15 μ l とし、両方のプライマーを [γ -³²p] で末端ラベルし、それぞれ各 0.1mM を用いた。PCR 反応は、Programamable Thermal Cyclor (M.J.Research) 上で、denature は 94 $^{\circ}$ C で 1 分間、annealing はエクソン 1~3 で 55 $^{\circ}$ C, エクソン 4 で 58 $^{\circ}$ C, エクソン 5,6 で 60 $^{\circ}$ C をそれぞれ 2 分間、extension は 70~72 $^{\circ}$ C で 1 分間でサイクル回数は 30~35 回とし、最初の denature は 92 $^{\circ}$ C で 4 分間、最終の extension は 72 $^{\circ}$ C で 6 分間行った。PCR 産物は Stop solution で 5 倍に希釈し、85 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱し熱変性さ

表 3

表 4

せ、5%非変性アクリルアミドゲル(acrylamide : methylene-bis- acrylamide , 49:1)上に、35ワット、6~8時間電気泳動し、5~8日間、Fuji RXフィルムでオートラジオグラフィーを行った。腫瘍組織に遺伝子変異のある場合、正常コントロールに比して、移動度の異なったバンドが発現する。これらを変異バンドと判定した。

2) Direct sequence 法による変異部位の確認法

変異と判定されたバンドより、通法に従い^{11,15,16)}Genomic DNA を抽出し、Circum Vent Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing Kit (New England Biolabs)を使用して、SSCP法と同じプライマーにより Direct sequence 反応を行った。ついで前述の条件と同様に電気泳動、オートラジオグラフィーを行い、変異部位を確認した。

結 果

1) OSCCにおける MI と p53 の LOH

OSCC (単発性 38例, 多発性 7例) 計 45例に対し、前述の4種類のマイクロサテライトマーカを用いて PCR 法で MI を検索した。MI は単発

性 OSCC 38 例中 3 例(7.9 %), 多発性 OSCC 7 例中 2 例(28.6%)の計 5 例に発現した (表 5)。図 2 に MI 例を示す。この 5 例のすべてに BAT40 の MI が認められ, 症例 45 では, D2S123 においても MI が認められた。単発性 MI(+)例 3 例の初発部位は, 舌 2 例, 頬粘膜 1 例で, UICC 分類¹⁴⁾では II 期が 2 例, III 期が 1 例であった。多発性 MI(+) の 2 例は, それぞれ歯肉と舌, 歯肉と歯肉という口腔内での多発例で, UICC 分類¹⁴⁾は, III 期と IVa 期であった。この MI(+)5 例と初発部位や病期などの臨床病態には関連性はなかった (表 5)。

p53 遺伝子内のマイクロサテライトマーカである TP53 を用いて p53 の LOH を検索した結果, LOH の Informative case は 16 例 (MI(+) 5 例, MI(-) 11 例)であった。LOH はこの 16 例中 3 例(18.8%)に生じていたが, この LOH 3 例はすべて MI(+)例であった。この 3 例中 2 例は口腔内の多発性 MI(+)例であった (表 5)。

2) 癌関連遺伝子のマイクロサテライト配列部位におけるフレームシフト変異

MI(+)症例とマイクロサテライト配列を遺伝子

表 5

図 2

領域内に含む各種癌関連遺伝子の同配列部位での変異様相との関連を明らかにし、また MI(+)OSCC において変異の標的となる遺伝子を同定するために、今回検出した MI(+)例 5 例に加えて、MI(+)の判明している 5 例⁹⁾ の計 10 例 (表 6-1) について、蛋白翻訳領域内に、マイクロサテライト配列をもつ 癌関連遺伝子 BAX, IGFIIR, DPC4, PTEN, BRCA1, BRCA2, ICE, hMSH3, hMSH6 のフレームシフト変異を検索した。各遺伝子の詳細は表 2 に示す。次いで、変異が生じている症例については、シーケンス法により変異部位を確認した。上記の 9 つの癌関連遺伝子を検索した結果、MI(+) 10 例中 5 例(50%)に、フレームシフト変異が認められ、この 5 例中 3 例には 2 つの遺伝子変異が生じていた(表 6-2)。変異の詳細は、以下のとおりである。アポトーシスに関連する癌抑制遺伝子の BAX ではエクソン 3 のコドン 38~41 における(G)₈領域の 1 塩基欠失による変異を 4 例(40%)に認めた(図 3, 表 6-2)。この 4 例中 2 例は舌の単発症例、1 例は歯肉の単発症例、1 例は歯肉と食道との多発症例で、また 4 例中 2 例は UICC 分類¹⁴⁾の II 期、1 例は III 期、1 例は IVa 期の症例であった。細胞増殖に関連す

表 6

図 3

る遺伝子の IGFIIR ではコドン 1313~1316 における (G)₈ 領域の 1 塩基欠失によるフレームシフト変異を 2 例(20%)に認め、両例とも同時に BAX に変異があった(図 3, 表 6-2)。この 2 例は舌の単発症例で、それぞれ UICC 分類の II 期と III 期の症例であった(表 6-1)。本研究で初めて癌抑制遺伝子 DPC4 のマイクロサテライト領域の変異の検索を行った結果、エクソン 5 のコドン 228~229 における (G)₆ 領域の 1 塩基欠失による変異を 1 例(10%)に認めた。またこの 1 例は癌抑制遺伝子 BRCA1 のエクソン 11 のコドン 654~657 における (A)₈ 領域の 1 塩基欠失による変異も生じていた(図 3, 表 6-2)。この症例は、頬粘膜の単発症例で、UICC 分類¹⁴⁾の III 期の症例であった(表 6-1)。この遺伝子変異例全 5 例と初発部位や病期などの臨床病態との関連性はなかった。PTEN, BRCA2, ICE, hMSH3, hMSH6 の遺伝子のフレームシフト変異はいずれの例にもみられなかった(図 4, 表 6-2)。

図 4

このフレームシフト変異が検出された 4 つの遺伝子(BAX, IGFIIR, DPC4, BRCA1)では、Direct sequence によって、変異部位から下流の蛋白翻訳領域のコドンに読み枠のずれが起こったために、

ストップコドンが生じていたことが確認された(表 7)。代表例として、BAX 遺伝子の配列を図 5 に示す。

図 5

表 7

癌関連遺伝子に変異の認められた 5 例中多発癌症例は 1 例のみであった(表 6-1)。

今回検索した MI(+)の p53LOH 例の 3 例と MI(+)の p53LOH 例の 2 例⁹⁾をあわせた 5 例(単発例 2 例, 多発例 3 例)中では, 単発症例 1 例にのみ BAX と IGF1R の両遺伝子変異が認められた(表 6-1,2)。

3) BAX 遺伝子変異

MI(+)OSCC 例で BAX 遺伝子のマイクロサテライト配列部位でのフレームシフト変異の発現頻度が高かったことから, OSCC における同遺伝子の関与について明確にするために, 同遺伝子変異について詳細に検討した。SSCP 法を用いて BAX 遺伝子の全エクソン(exons1~6)における MI(-)OSCC 例の遺伝子変異を検索した結果, MI(-)例では 65 例中 1 例(1.5%)にのみ変異を認めた。これは, MI(+)例で生じている変異と同部位のエクソン 3 のコドン 38~41 における(G)₈領域の 1 塩基

欠失によるフレームシフト変異であった (図 6, 表 7)。

図 6

考 察

癌の家系解析によって各種癌関連遺伝子が同定され、発癌機構の解析が飛躍的に進歩した。しかし、OSCC では、遺伝性、家族性の症例はほとんど無く、発癌の原因遺伝子の解明は進んでいない。遺伝性大腸癌の原因遺伝子単離による研究で判明した MMR 異常では、MI と呼ばれる現象の生じることが判明している^{10,23-27)}。単発性の大腸癌、胃癌、膵癌、子宮内膜癌例などでも、約 20~30%の頻度で MI が認められ、発癌との関連性が報告されている⁵⁻⁸⁾。しかし、乳癌や肝癌などでは、MI の出現は 10%以下と低頻度であり、MMR 遺伝子の発癌への関与には臓器によって差があると考えられている³⁾。今回検索した単発性 OSCC では、38 例中 3 例 (7.9%) に MI を認めた。Higashikawa *et al*⁹⁾ の報告では 5.9% であり、また Ishwad *et al*²⁸⁾ による報告は 6.6% であり、筆者の得た報告と差はなかった。また前者は多重癌症例と単発

性 OSCC について検索し、症例数が少なかったこともあり、これらの MI の頻度に有意差はなかったと報告している。本研究では、口腔内と食道での多発性 OSCC と単発性 OSCC の MI の発現について検索した結果、多発性 7 例中 2 例(28.6%)に MI が認められ、多発性の MI の発現頻度は単発性のものに比べて高かったが、症例数が少ないことから、有意差は認められなかった。当講座における検索結果として、今回の 45 例（単発性 38 例，多発性 7 例）と MI の判明している 45 例（単発性 38 例，多発性 7 例）⁹⁾ をあわせた OSCC 計 90 例（単発性 76 例，多発性 14 例）で多発性 OSCC と単発性 OSCC の MI の発現について検索した結果、MI は単発性 OSCC 76 例中 5 例(6.6%)，多発性 OSCC 14 例中 5 例(35.7%)の計 10 例に発現し、単発性と多発性の OSCC 例における MI の発現率は Fisher の正確確率検定法により有意差が認められた。なお、MI の検索を行うにあたり、Higashikawa *et al*⁹⁾ の行った 45 例の試料を用いて再度検索を行ったが、MI については同様の結果を得た。Horii *et al*²⁹⁾ は、消化管の多発癌

例で、MI が 88% の高頻度で認められたことから、多発癌の発生に MI が深く関与しており、これを第二癌発症のリスク判定の指標に応用することが可能であると報告している。近年、頭頸部癌においても、診断、治療技術の進歩や、平均寿命の延長などにより、多発癌の報告例が増加傾向にある³⁰⁾。兼安ら³¹⁾によると、頭頸部での多発癌例は、頭頸部と食道での発生例が最も多く、ついで頭頸部同士での発生例が多かったと報告している。口腔から食道にかけては、扁平上皮が連続しているため、飲酒や喫煙などによる慢性的な刺激や他の変異誘発原因によって生じる種々の遺伝子変異が、広い範囲の扁平上皮細胞に蓄積されやすい。これらの変異の蓄積された細胞に腫瘍化が起こり、多クローン性の不均一な腫瘍病変が多発性に発生する過程として、Field Carcinogenesis が考えられている^{32,33)}。今回の結果から、MI も Field Carcinogenesis の発生の一因となり、また多発性 OSCC の発生に関わっていることが推察された。

転写因子である p53 は、細胞分裂周期中に生

じたゲノム DNA の損傷を認識して、p21 などを転写活性化し、その損傷が修復されるまで DNA 複製や細胞分裂を停止し、また損傷を修復できない細胞に対しては、BAX などを転写活性化し、アポトーシスを誘導することによって、損傷細胞を除去する一連の機構に参与している¹⁷⁾。p53 に異常が生じ、この機構が破綻した場合、ゲノムは不安定化し、遺伝子変異が蓄積して、癌が発生する^{18,19)}。種々の組織や臓器の癌には、p53 遺伝子やその遺伝子産物に変異が見つかっており、OSCC でも 40~60% に異常が認められたと報告されている^{34,35)}。本研究では、p53 遺伝子の LOH を 16 例 (MI(+)) 例 5 例、MI(-)) 例 11 例) で検索した結果、3 例 (18.8%) に LOH が認められた。これは Kiriū *et al*³⁶⁾ によって報告された 33.3%、Higashikawa *et al*¹⁹⁾ が報告した 36.8%、よりも頻度は低かった。LOH 例 3 例はすべて MI(+)) 例であり、3 例中 2 例は口腔内の多発症例であった。また、p53 LOH の Informative case 19 例⁹⁾ について再検索を行い、著者が今回検出した Informative case 16 例をあわせた計 35 例 (MI(+)) 例 9 例、MI(-)) 例 26 例) では、MI(+)) 9 例 5 例

(55.6%) に LOH を認め、5 例中多発癌例は 3 例 (60.0%) であった。p53 の異常は多発性 OSCC における MI の発現に強く関与することが考えられた。

MI(+)⁺癌で癌関連遺伝子に変異を生じている頻度は、大腸癌と胃癌では、TGFβRII 遺伝子変異が 70%以上、また BAX 遺伝子変異が 50%と高頻度であったが、食道扁平上皮癌や子宮癌ではこれらの遺伝子に変異はほとんどなかったと報告されている^{3,36,37)}。一方、Kong *et al*⁷⁾は、PTEN 遺伝子の変異が子宮内膜癌でのみ高頻度に生じたと報告している。今回、9つの癌関連遺伝子(BAX, IGF1R, DPC4, PTEN, BRCA1, BRCA2, ICE, hMSH3, hMSH6)を検索した結果、MI(+)⁺ 10 例中 5 例(50%)に変異が認められ、この 5 例中 3 例には 2 つの遺伝子変異が生じていた。BAX 遺伝子変異は 10 例中 4 例(40%)と高頻度に認めた。IGF1R では 2 例(20%)に認め、DPC4 と BRCA1 は 1 例(10%)にのみ認めた。DPC4 のマイクロサテライト部位での頻度は低く、MI(+)⁺ に DPC4 の異常はあまり関与していないと考えられた。PTEN, BRCA2, ICE, hMSH3, hMSH6 には変異は検出されなかった。ま

た、この 10 例では、TGF β RII の変異も認められなかった。以上のことから、MI(+)OSCC では、高頻度に BAX 遺伝子変異を認め、また癌関連遺伝子変異の発現様相は他臓器癌のそれとは異なっていた。堀井ら⁴⁾が報告しているように、他臓器の癌と同様に MI(+)OSCC においても、発癌過程に関わる原因遺伝子は特異的であることが考えられた。また MI(+)OSCC では BAX が発癌の原因遺伝子の 1 つである可能性も推察された。

癌関連遺伝子に変異の認められた 5 例中多発癌症例は 1 例のみであった。多発癌例の変異の標的となる癌関連遺伝子は、まだ MI の頻度の高い消化管の多発癌例でも報告されていない。多発性 OSCC では、MI の頻度が高いことから、蛋白翻訳領域にマイクロサテライト配列をもつ癌関連遺伝子の変異を検索し変異の標的となる遺伝子を同定することは、多発性 OSCC の原因遺伝子解明の一助のなると考えられた。p53 の LOH 例 5 例中、癌関連遺伝子に変異の認められた例は 1 例のみであった。この変異は BAX と IGF1R の遺伝子変異によるものであった。今回検索した癌関連遺伝子変異と p53 の異常との間には関連性は

認められなかった。本田ら³⁸⁾は、遺伝子変異の蓄積によって癌が発生するときに重要なのは、単なる遺伝子変異の蓄積ではなく、変異する遺伝子の順番であると述べている。p53 に異常が生じたときには、MI(+)でマイクロサテライト領域をもつ癌関連遺伝子に変異が蓄積される前に、癌が発生する可能性のあることが考えられた。

BAX 遺伝子は p53 によって転写活性化されるが、麻生ら³⁹⁾は、その発現量と細胞死は相関すると報告している。BAX に変異が生じると、細胞はアポトーシスを回避して癌化すると考えられ、p53 と同様に BAX も癌抑制遺伝子の 1 つであることが指摘されている⁴⁰⁾。今回検索した MI(+)OSCC 例では BAX 遺伝子における変異の頻度は高かったが、MI(-)OSCC 例では 65 例中 1 例 (1.5%) にしか変異はみられず、その頻度は低かった。またこの変異は MI(+)と同じ部位のグアニンが 8 回連続したマイクロサテライト配列領域で生じているフレームシフト変異であった。これは、Yamamoto *et al*⁶⁾が胃癌症例で検索した発現頻度の結果と同様であり、彼らは MI が BAX 遺伝子変異の発現に深く関与すると報告している。以上

の結果より， BAX 遺伝子の変異の頻度は， MI(+)OSCC 例では高かったが， MI(-)OSCC 例では低く， このことから OSCC でも BAX 遺伝子の変異は MI によって引き起こされる異常の 1 つと考えられること， さらに同遺伝子の異常が MI(+)OSCC の発癌に関与している可能性の強いことが推定された。

結 論

MI(+)OSCC 症例とマイクロサテライト配列を遺伝子領域内に含む各種癌関連遺伝子の同配列部位での変異様相との関連を検索し， 以下の結論を得た。

(1) MI(+)OSCC の 10 例中 5 例(50%)に癌関連遺伝子の変異が生じていた。この 5 例中多発癌症例は 1 例のみであり， 多発癌例の変異の標的となる癌関連遺伝子は確認できなかった。しかし， 口腔内と食道での多発性 OSCC と単発性 OSCC の MI の発現について検索した結果， 多発性 OSCC では， MI の発現頻度は高く， 今後， 蛋白翻訳領域にマイクロサテライト配列をもつ癌関連遺伝子を検索する

ことは、多発性 OSCC の原因遺伝子解明の一助になると考えられた。

(2) p53LOH MI(+)例 5 例中 1 例にのみ BAX と IGFIIR の癌関連遺伝子変異が認められたが、p53 の異常と今回検索した癌関連遺伝子の変異には関連性がなかった。

(3) MI(+)OSCC の 10 例中 4 例(40%)に BAX, 2 例(20%)に IGFIIR, また 1 例(10%)に DPC4 と BRCA1 の変異が生じていたが、PTEN, BRCA2, ICE, hMSH3, hMSH6 には変異は認められなかった。MI(+)OSCC では BAX 遺伝子変異の発現頻度は高かったが、MI(-)OSCC では低頻度であった。OSCC 例での BAX 遺伝子変異のすべては、グアニンが 8 回連続したマイクロサテライト配列部位で生じており、同遺伝子変異は、複製エラーによって生じた変異であると考えられた。

以上のことより、蛋白翻訳領域にマイクロサテライト配列をもつ癌関連遺伝子を検索することは、多発性 OSCC の原因遺伝子解明の一助になると考えられ、また MI(+)OSCC における遺伝子変異の標的となる癌関連遺伝子の 1 つは BAX 遺

伝子であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の遂行に終始御懇切なるご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石川武憲教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重なる御助言、御校閲を賜った本学口腔病理学講座二階宏昌教授と、本学口腔生化学講座加藤幸夫教授に深謝致します。

さらに本研究の遂行および本論文の作成に、ご指導と御助言を賜った本学歯学部口腔外科学第二講座杉山勝助教授、東川晃一郎先生に謹んでお礼を申し上げます。また、御支援を戴きました本学歯学部口腔外科学第二講座原田直講師並びに教室員各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 黒瀬圭輔, 江見 充, 中村祐輔: 多段階発癌.
遺伝子医学 1, 204-208, 1997.
- 2) 武田俊一: ゲノム不安定性と癌. 実験医学 16,
1610-1618, 1998.
- 3) 堀井 明: DNA ミスマッチ修復異常と発がん.
遺伝子医学 2, 198-203, 1997.
- 4) 堀井 明: ミスマッチ修復の異常と癌. 実験
医学 16, 180-184, 1998.
- 5) Persons, R., Myeroff, L. L., Liu, B., Willson, J. K. V.,
Markkowitz, S. D., Kinzler, K. W., Vogelstein, B.:
Microsatellite instability and mutations of the
transforming growth factor β type II receptor gene in
colorectal cancer. *Cancer Res.* 55, 5548-5550, 1995.
- 6) Yamamoto, H., Sawai, H., Perucho, M.: Frameshift
somatic mutations in gastrointestinal cancer of the
microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.* 57, 4420-
4426, 1997.
- 7) Kong, D., Suzuki, A., Zou, T. T., Sakurada, A., Horii, A *et*
al.: PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial
carcinomas. *Nature Genet.* 17, 143-144, 1997.

- 8) Ouyang, H., Furukawa, T., Abe, T., Kato, Y., Horii, A.: The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach, and endmetrium. *Clin. Cancer Res.* **4**, 1071-1074, 1998.
- 9) Higashikawa, K., Miyauchi, M., Sugiyama, M., Ishikawa, T.: Analysis of microsatellite instability and frameshift mutation of TGF β type II receptor gene in oral squamous cell carcinomas. *J. Hiroshima Univ. Dent. Soc.* **31**, 148-152, 1999.
- 10) Thibodeau, S. N., Bren, G., Schaid, D.: Microsatellite instability in cancer of proximal colon. *Science* **260**, 816-819, 1993.
- 11) Jones, M. H., Nakamura, Y.: Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. *Genes Chrom. Cancer* **5**, 89-90, 1992.
- 12) 丹沢秀樹, 鶴澤一弘, 福田正勝, 宮川昌久, 椎葉正史, 渡辺俊英, 宮 恒夫, 横江秀隆 : 口腔扁平上皮癌の悪性度に関する DNA 診断分析法. *頭頸部腫瘍* **25**, 65-69, 1999.
- 13) Kim, S, K., Fan, Y., Papadimitrakopoulou, V., Clayman, G., Mao, L.: DPC4, a Candidate Tumor Suppressor Gene,

Is Altered Infrequently in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 2519-2521, 1996.

- 14) 臨床・病理頭頸部癌取り扱い規約. 第2版, 金原出版, 東京, 1991.
- 15) Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.: *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- 16) Goelz, S. E., Hamilton, S. R., Vogelstein, B.: Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**, 118-126, 1995.
- 17) 西垣玲子, 土田信夫: p53 によって転写制御を受ける遺伝子. *細胞工学* **16**, 529-535, 1997.
- 18) Erber, R., Conradt, C., Homann, N., Enders, C., Bosch, X. F *et al.*: TP53 DNA contact mutations are selectively associated with allelic loss and have a strong clinical impact in head and neck cancer. *Oncogene* **16**, 1671-1679, 1998.
- 19) Shin, D. M., Kim, J., Ro, J. Y., Hittelman, J., Roth, J. A *et al.*: Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res.* **54**, 321-326, 1994.
- 20) 瀬川 薫: p53 の新しい機能: DNA 修復を

中心として. 細胞工学 16, 536-541, 1997.

- 21) 真木寿治, 愿山 郁: DNA ミスマッチ修復と発癌. 現代医療 30, 1819-1824, 1998.
- 22) Chou, D., Miyashita, T., Mohrenweiser, H. W., Ueki, K., Louis, D. N.: The BAX gene maps to the glioma candidate region at 19q13.3, but is not altered in human gliomas. Cancer Genet. Cytogenet. 88, 136-140, 1996.
- 23) Shibata, D., Peinado, M. A., Ionov, Y., Malkhosyan, S., Perucho, M.: Genomic instability in repeated sequence is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. Nature genet. 6, 273-281, 1994.
- 24) Aaitonen, L. A., Peltomaki, P., Mecklin, J., Jass, J.R *et al.*: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. Cancer Res. 54, 1645-1648, 1994.
- 25) Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkbosyan, S., Shibata, D., Perucho, M.: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 363, 558-561. 1993.
- 26) Marx, J.: New colon cancer gene discovered. Science 260, 751, 1993

- 27) Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L *et al.*: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **363**, 258-261, 1994.
- 28) Ishward, C. S., Ferrell, R. E., Rossie, K. M., Appel, B. N., Johnson, J. T *et al.*: Microsatellite instability in oral cancer. *Int. J. Cancer* **64**, 332-335, 1995.
- 29) Horii, A., Han, H. J., Shimada, M., Yanagisawa, M., Nakamura, Y.: Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Res.* **54**, 3373-3375, 1994.
- 30) 徳丸 裕, 行木英生, 藤井正人, 神崎 仁 : 頭頸部における重複癌症例の検討. *耳鼻臨床* **89**, 1001-1005, 1996.
- 31) 兼安祐子, 喜多みどり, 小島菜穂子, 姫井健悟, 石井哲夫 : 頭頸部三重複癌症例の臨床的検討. *頭頸部腫瘍* **25**, 112-117, 1999.
- 32) Hussain, S. P., Harris, C. C.: Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* **58**, 4023-4037, 1998.
- 33) Gluckman, J. L., Crissman, J. D., Donegan, J. O.:

- Multicentric squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Head and Neck Surg.* **3**, 90-96, 1980.
- 34) Boyle, J. O., Hakim, J., Koch, J., Ruppert, J. M., Sidransky, D.: The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck. *Cancer Res.* **53**, 4477-4480, 1993.
- 35) Shin, D. M., Ro, J. Y., Shah, T., Hong, Y. K *et al.*: p53 expression and genetic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Proc. Am. Assoc.* **35**, 158, 1994.
- 36) Kiriu, H., Yokozaki, H., Yasui, W., Ito, K., Tahara, E.: Microsatellite instability associated with primary head and neck cancers and secondary esophageal cancers. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **28**, 733-739, 1998.
- 37) Iwaya, T., Maesawa, C., Nishizuka, S., Suzuki, Y., Tamura, G. *et al.*: Infrequent frameshift mutations of polynucleotide repeats in multiple primary cancers affecting the esophagus and other organs. *Genes Chromosomes Cancer* **23**, 317-322, 1998.
- 38) 本田 聡, 樋野興夫: 腎癌の他段階発癌. *Molecular Medicine* **36**, 425-432, 1999.
- 39) 麻生定光: アポトーシス誘導因子 Bax の作用機作. *日医大誌* **64**, 463-466, 1997.

- 40) Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J.: Bcl-2 heterodimerize in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619, 1993.

表題脚注

広島大学歯学部口腔外科学第二講座 (主任 : 石川武憲教授)

本論文の要旨は, 第 53 回日本口腔科学会総会(平成 11 年 4 月, 東京都), 第 58 回日本癌学会総会(平成 11 年 10 月, 広島市)において発表した。

図の説明

図 1 DPC4 遺伝子の塩基配列 (マイクロサテライト領域)

M; 開始コドン.

(G)₆ 配列を含んだ部位にプライマーを設定した (矢印の部分).

図 2 OSCC における MI 例 (BAT40)

MI(+)の症例 42 では, 腫瘍部(T)に繰り返し配列違う PCR 産物が発現したため, 泳動されたバンドが下方にシフトしている (矢印の部分).

図 3 PCR 法による癌関連遺伝子検索 (1)

(I)BAX,(II)IGFIIR,(III)BRCA1,(IV)DPC4

腫瘍(T)では, 矢印に示すように下方に変異バンドが発現.

Direct sequence による変異部位の確認.

図 4 PCR 法による癌関連遺伝子検索 (2)

右矢印は, 各癌関連遺伝子のマイクロサテライトリピート回数と, PCR 産物の正常位置を示す.

図 5 BAX 遺伝子の塩基配列

(1)BAX は 6つのエクソンからなっている.

(2)図中の矢印に示したように, (G)₈ 配列を含ん

だ部位にプライマーを設定し、PCR法で検索した。BAXは579個の塩基で構成されている。(G)₈配列中の1塩基が欠失し、(G)₇配列になった場合、翻訳段階での読み取り枠にずれを起こすため、図中のように下流の塩基配列中にストップコドンが生じる。

図 6 SSCP法で検出されたMI(-)例のBAX遺伝子変異

症例30の腫瘍部(T)では、矢印の位置にシフトバンドが発現している。

Direct sequenceにより変異部位を確認した結果、コドン38~41における(G)₈領域の1塩基欠失した変異であった。

Patient		45
Mean age		61.9
Sex(M/F)		28/17
Occurrence site		Stage (UICC, 1997)
Gingiva	15	I 12
Tongue	23	II 6
Mouth floor	4	III 18
Lip	1	IVA 7
Buccal mucosa	2	IVB 2

表1. MI検索症例の概要

Gene	Function	Repeat*	PCR condition	
			MgCl ₂ (mM)	Annealing Tm.**
BAX	Bcl-2 associated X protein regulator of apoptosis tumor suppressor	(G) ₈	1.5	55 (0.5)
IGF1R	Insulin like growth factor II receptor Involved in cell growth	(G) ₈	1.5	55 (0.5)
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4 tumor suppressor	(G) ₆	1.5	55 (1.0)
PTEN	Phosphatase and tensin homologue detected on chromosome 10 tumor suppressor	(A) ₆	1.5	55 (0.5)
BRCA1	Breast cancer 1 tumor suppressor	(A) ₈	2.5	57 (0.5)
BRCA2	Breast cancer 2 tumor suppressor	(A) ₈	2.5	57 (0.5)
ICE	Interleukin-1b converting enzyme regulator of apoptosis	(A) ₈	1.5	55 (1.0)
hMSH3	h mutS homolog3 mismatch repair gene	(A) ₈	1.5	55 (0.5)
hMSH6	h mutS homolog6 mismatch repair gene	(C) ₈	1.5	55 (0.5)

* ; nucleoside repeat within an exon, ** ; annealing temperature and time (min)

表2. 検索した癌関連遺伝子

Patient		65
Age (mean)		64.5
Sex (M/F)		34/31
Occurrence site		Stage (UICC, 1997)
Tongue	29	I 19
Gingiva	22	II 12
Floor of mouth	7	III 24
Lip	3	IVA 8
Buccal mucosa	2	IVB 2
Maxillary sinus	2	

表3. BAX遺伝子変異検索症例(MI(-))の概要

Exon	Primer Sequence	Annealing Temperature (°C)	Product Length (bp)
1	5'- cgttcagcggggctctca -3' 5'- cagccggttaggaaggat -3'	54	207
2	5'- cccctagaaccaagagtc -3' 5'- ggctgagagtcctgtgtcc -3'	58	200
3	5'- atccaggatcgagcagggcg -3' 5'- cactcgtcagcttcttggtgg -3'	55	100
4	5'- tctcctgcaggatgattgc -3' 5'- tcccagggtcctcacagat -3'	58	209
5	5'- caggcagtggtgggacaagggtt -3' 5'- gcggtggtgggggtgaggag -3'	60	192
6	5'- cccctggccgagtcactgaa -3' 5'- aatgcccatgtcccacaatc -3'	60	237

表4. SSCP法で用いたBAX 遺伝子のプライマー

Case No. (Age & Sex)	Primary cancer	TNM & Staging	Other Cancer	Microsatellite Markers*	TP53
2 (48, M)	Tongue	T2N0M0, II		BAT40	LOH
35 (50, M)	Gingiva	T4N0M0, IVA	Tongue	BAT40	LOH
38 (33, M)	Tongue	T2N0M0, II		BAT40	— **
42 (89, F)	Buccal mucosa	T3N0M0, III		BAT40	—
45 (89, M)	Gingiva	T3N0M0, III	Gingiva	BAT40, D2S123	LOH

* ; instability of microsatellite markers, ** ; wild type case

表5. OSCCにおけるMI (+)とLOH症例

Case No. (Age & Sex)	Primary cancer	TNM & Staging	Other Cancer
2 (48, M)	Tongue	T2N0M0, II	
35 (50, M)	Gingiva	T4N0M0, IVA	Tongue
38 (33, M)	Tongue	T2N0M0, II	
42 (89, F)	Buccal mucosa	T3N0M0, III	
45 (89, M)	Gingiva	T3N0M0, III	Gingiva
MF21*	Gingiva	T4N0M0, IVA	Palate
S22*	Gingiva	T1N0M0, I	
M27*	Gingiva	T4N2aM0, IVA	Esophagus
MF29*	Palate	T2N1M0, III	Tongue
S44*	Tongue	T3N0M0, III	

*; 東川によりMI (+) と判明した症例

表6-1. MI(+)-症例の概要

Case No.	TP53	BAX(G)8	IGFIIR(G)8	DPC4(G)6	BRCA1(A)8	BRCA2(A)8	ICE(A)8	PTEN(A)6	hMSH3(A)8	hMSH6(C)8
2	LOH	+d****	-	-	-	-	-	-	-	-
35	LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-***	+d	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	+d	-	-	-	-	-	-	-
45	LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MF21*	LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S22*	LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M27*	/**	+d	-	-	-	-	-	-	-	-
MF29*	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S44*	/	+d	-	-	-	-	-	-	-	-

*; 東川によりMI (+) とLOH が判明した症例 **; Homozygous ***; wild type, ****; 1bp deletion

表6-2. MI(+)-症例における遺伝子変異の検索結果

Genes	Case No.	Codon	Nucleotides	Amino acid
BAX	2	Codons38~41	(G)8→(G)7	Frameshift (Stop codon at codon 59)
	38	Codons38~41	(G)8→(G)7	Frameshift (Stop codon at codon 59)
	30*	Codons38~41	(G)8→(G)7	Frameshift (Stop codon at codon 59)
	M27**	Codons38~41	(G)8→(G)7	Frameshift (Stop codon at codon 59)
	S44**	Codons38~41	(G)8→(G)7	Frameshift (Stop codon at codon 59)
IGFIIR	2	Codons1313~1316	(G)8→(G)7	Frameshift (Stop codon at codon 1382)
	S44**	Codons1313~1316	(G)8→(G)7	Frameshift (Stop codon at codon 1382)
DPC4	42	Codons228~229	(G)6→(G)5	Frameshift (Stop codon at codon 275)
BRCA1	42	Codons654~657	(A)8→(A)7	Frameshift (Stop codon at codon 755)

*;SSCP法で変異が判明したMI(-)例

**;東川によりMI(+)とLOHが判明した症例

表7. 癌関連遺伝子変異例の検索結果

121 ttgaacaat ggacaatatg tctattacga atacaccaac aagtaatgat gcctatctga
 781^M..... ctgtggcttc cacaagtcag cctgccagta tactgggggg cagccatagt
 831 gaaggactgt tgcagatagc atcagggcct cagccaggac agcagcagaa tggatttact
 881

→ Primers used for genomic amplification
 ←

図1. DPC4遺伝子の塩基配列
 (マイクロサテライト領域)

M; 開始コドン

(G)₆配列を含んだ部位にプライマーを設定した(矢印の部分)。

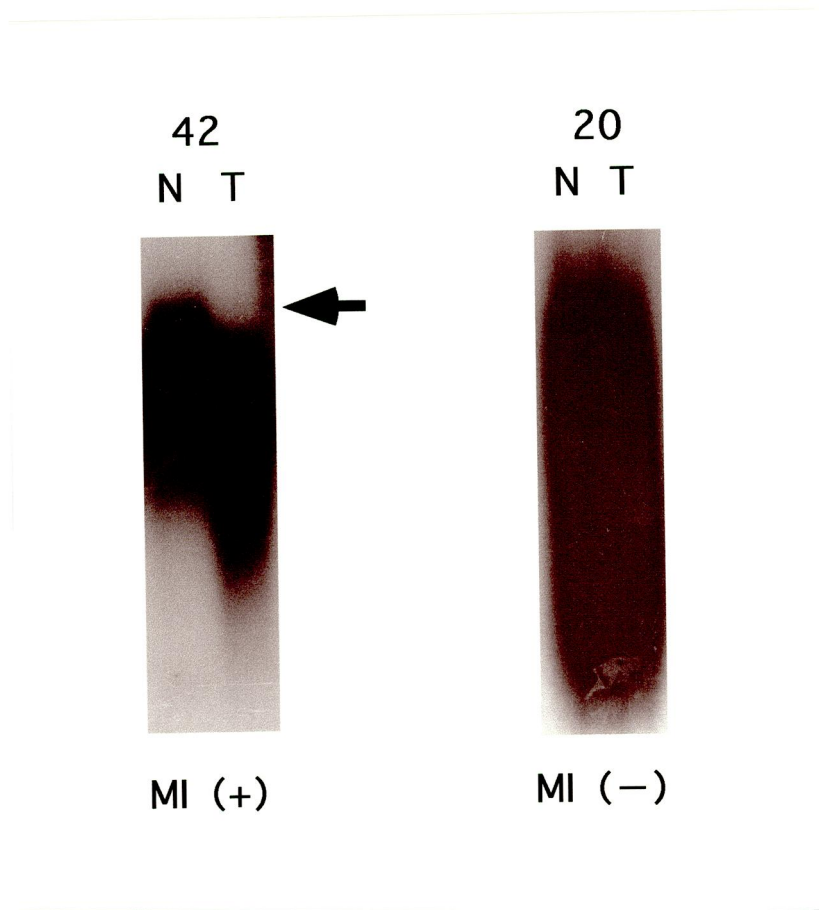


図 2. OSCCにおける Microsatellite Instability(BAT40)

MI(+)の症例42では、腫瘍部(T)に繰り返し回数の違うPCR産物が発現したため、泳動されたバンドが下方にシフトしている(矢印の部分)。

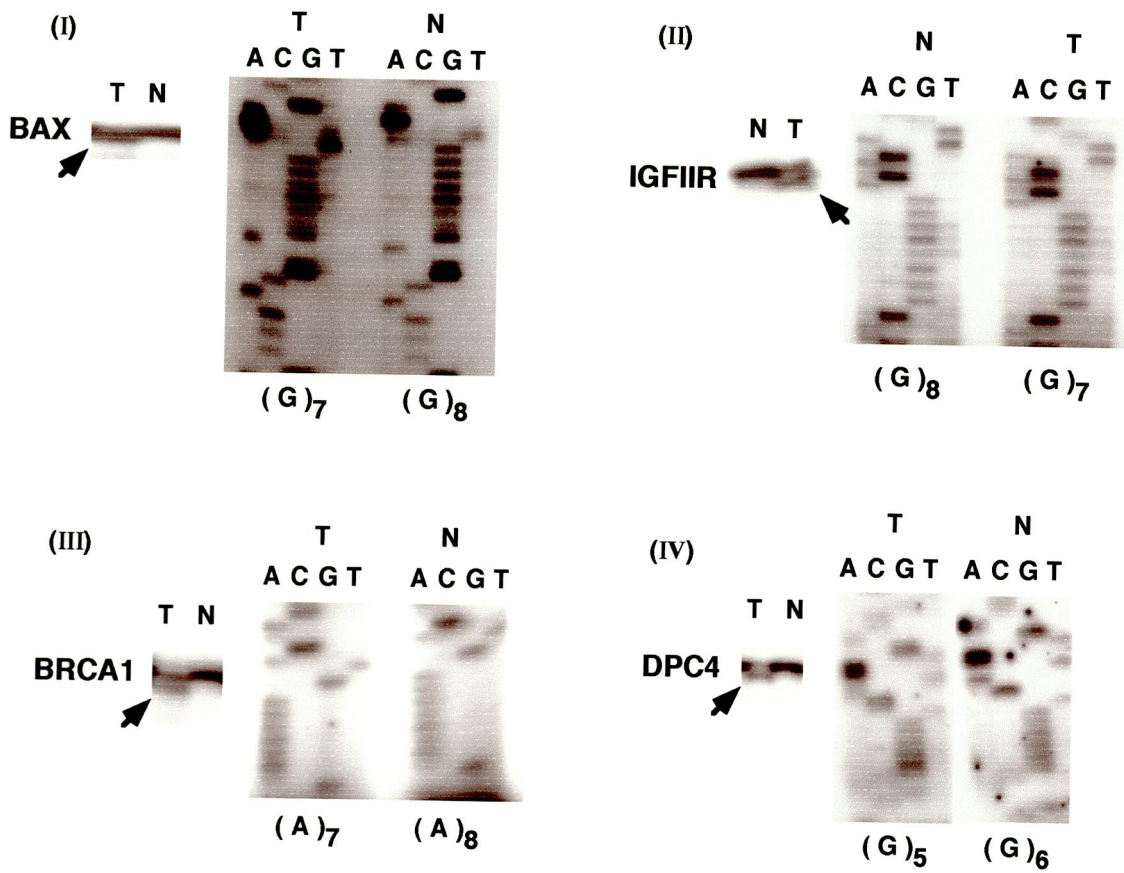


図 3. PCR法による癌関連遺伝子検索結果(1)

(I) BAX, (II) IGFIIR, (III) BRCA1, (IV) DPC4

腫瘍(T)では, 下方(矢印部)に変異バンドが発現.

Direct sequence による変異部位.

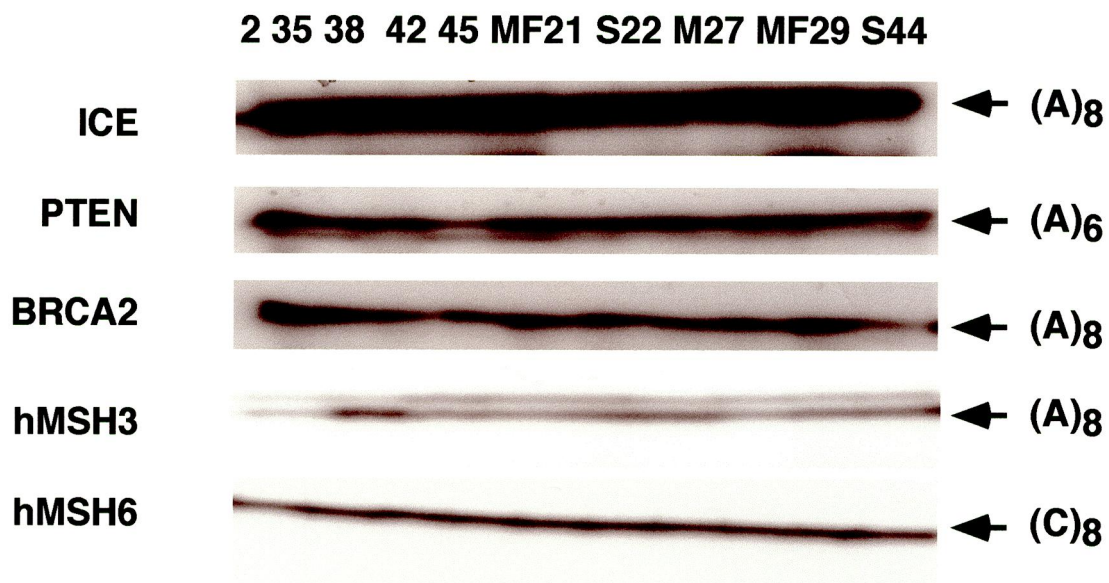
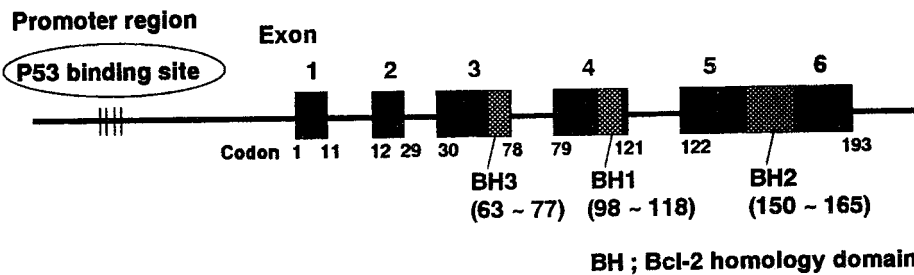


図 4. PCR法による癌関連遺伝子検索結果(2)
 右矢印は、各遺伝子領域のマイクロサテライトリピート回数と、PCR産物の正常位置を示す。

(1)



(2)

Poly (G)₈ Repeats in BAX Gene mRNA

1 atggacgggt ccggggagca gccagagggc ggggggcca ccagctctga gcagatcatg
 61 aagacagggg cccitttgct tcagggttgc atccaggatc gacagggcg aatggggggg
 121 gag gca ccc gag ctg gcc ctg gac ccg gtg cct cag gat gcg tcc acc aag aag ctg agc
 181 gagtgtctca agcgcacg gg atgggctga₁₉₃
stop codon

↔ Primers used for genomic amplification

Poly (G)₇ Repeats in mtBAX Gene mRNA

1 atggacgggt ccggggagca gccagagggc ggggggcca ccagctctga gcagatcatg
 61 aagacagggg cccitttgct tcagggttgc atccaggatc gacagggcg aatggggggg
 121 agg cac ccg agc tgg ccc tgg acc cgg tgc ctg agg atg cgt cca cca aga agc tga gc
stop codon
 181 gagtgtctca agcgcacg gg atgggctga₁₉₃
stop codon

図5. BAX遺伝子の塩基配列

(1) BAXは6つのエクソンからなっている。
 (2) 図中の矢印に示したように、G₈配列を含んだ部位にプライマーを設定し、PCR法で検索した。BAXは579個の塩基で構成されている。G₈配列中の1塩基が欠失し、G₇配列になった場合、翻訳段階での読み取り枠にずれを起すため、図中のように下流の塩基配列中にストップコドンが生じる。

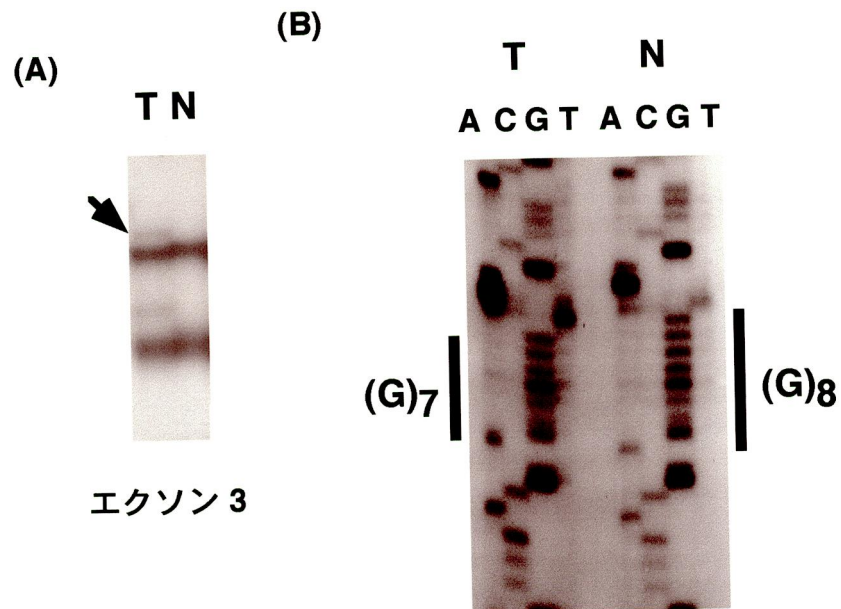


図 6. SSCP法によるMI(-)例のBAX遺伝子変異

- (A) 症例30の腫瘍部(T)には、シフトバンドが発現（矢印の位置）。
 (B) Direct sequenceによる変異部位の確認では、コドン38~41における(G)₈領域の1塩基欠失変異であった。