

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

(平成12年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。この防御機構には、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、発癌が促進されると考えられる。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ーを用いた 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

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。

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ったと報告しており、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ーを用いた 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ーを用いた^{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つの領域のマーカーを検索し、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ーの 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。

表1 MI 検索症例の概要

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

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 に関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 (Perkinelme 社) 1.5 μl を総量 15 μl に調整した。PCR 反応は、Programamable Thermal Cycler (M. J. Research) 上で、denature は 94°C で 30 秒間、extension は 70~72°C, 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°C で 4 分間、また最終の extension は 72°C, 6 分間の条件で行った。

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、回数が増加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)

表 2 検索した癌関連遺伝子

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

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

```

121 ttgaacaaat ggacaatag tctattacga atacaccaac aagtaatgat gcctatctga
781 .....M..... ctgtggcttc cacaagtag cctgccagta tactgggggg cagccatagt
831 gaaggactgt tgcagatagc atcagggcct cagccaggac agcagcagaa tggattact
881 .....
    
```



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)。

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、アポトーシスに関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(exons 1~6)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1.5 mM、Taq polymerase (AmpliTaq DNA polymerase, N801-0060, Perkinelme)

表3 BAX 遺伝子変異検索症例 (MI(-)) の概要

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		

は0.25U、10×PCR buffer (Perkinelme) は1.5 μl、Mg 濃度は1.5 mMで、総量は15 μl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0.1 mMを用いた。PCR反応は、Programamable Thermal Cycler (M. J. Research) 上で、denature は94°Cで1分間、annealing はエクソン1~3で55°C、エクソン4で58°C、エクソン5、6で60°Cをそれぞれ2分間、extension は70~72°Cで1分間でサイクル回数は30~35回とし、最初の denature は92°Cで4分間、最終の extension は72°Cで6分間行った。PCR 産物は Stop solution で5倍に希釈し、85°Cで10分間加熱し熱変性させ、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ーを用いて

表4 SSCP 法で用いた BAX 遺伝子のプライマー

Exon	Primer Sequence	Annealing Temperature (°C)	Product Length (bp)
1	5'-cgttcagcgggctctca-3'	54	207
	5'-caggccggttaggaaggat-3'		
2	5'-ccctagaaccaagagtc-3'	58	200
	5'-ggctgagagtctgtgtcc-3'		
3	5'-atccaggatcagcaggcgc-3'	55	100
	5'-cactcgtcagctcttggtg-3'		
4	5'-tctctgcaggatgattgc-3'	58	209
	5'-tccccaggtcctcacagat-3'		
5	5'-caggcagtgaggacaaggtt-3'	60	192
	5'-gcggtggtggggtgaggag-3'		
6	5'-cccctggccagtcactgaa-3'	60	237
	5'-aatgccatgtccccaatc-3'		

表5 OSCCにおけるMI(+)とLOH症例

Case No. (Age & Sex)	Primary cancer	TNM & Staging	Other Cancer	Microsatellite Markers*	TP53
2 (48, M)	Tongue	T2NOMO, II		BAT40	LOH
35 (50, M)	Gingiva	T4NOMO, IVA	Tongue	BAT40	LOH
38 (33, M)	Tongue	T2NOMO, II		BAT40	—**
42 (89, F)	Buccal mucosa	T3NOMO, III	BAT40		—
45 (89, M)	Gingiva	T3NOMO, III	Gingiva	BAT40, D2S123	LOH

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

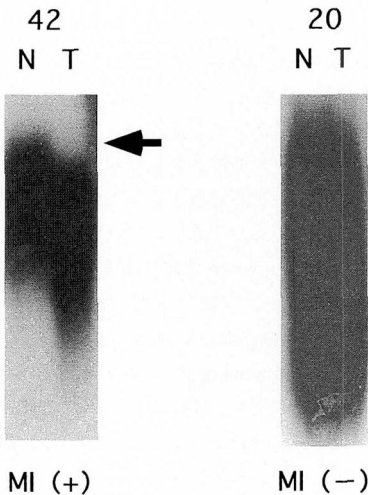


図2 OSCCにおけるMI例(BAT40)

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)。

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ーである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LOH3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領域内を含む各種癌関連遺伝子の同配列部位での変異様

表6-1 MI(+)症例の概要

Case No. (Age & Sex)	Primary cancer	TNM & Staging	Other Cancer
2 (48, M)	Tongue	T2NOMO, II	
35 (50, M)	Gingiva	T4NOMO, IVA	Tongue
38 (33, M)	Tongue	T2NOMO, II	
42 (89, F)	Buccal mucosa	T3NOMO, III	
45 (89, M)	Gingiva	T3NOMO, III	Gingiva
MF21* (55, F)	Gingiva	T4NOMO, IVA	Palate
S22* (46, M)	Gingiva	T1NOMO, I	
M27* (71, M)	Gingiva	T4N2aMO, IVA	Esophagus
MF29* (51, M)	Palate	T2N1MO, III	Tongue
S44* (68, M)	Tongue	T3NOMO, III	

*; 東川よりMI(+)と判明した症例

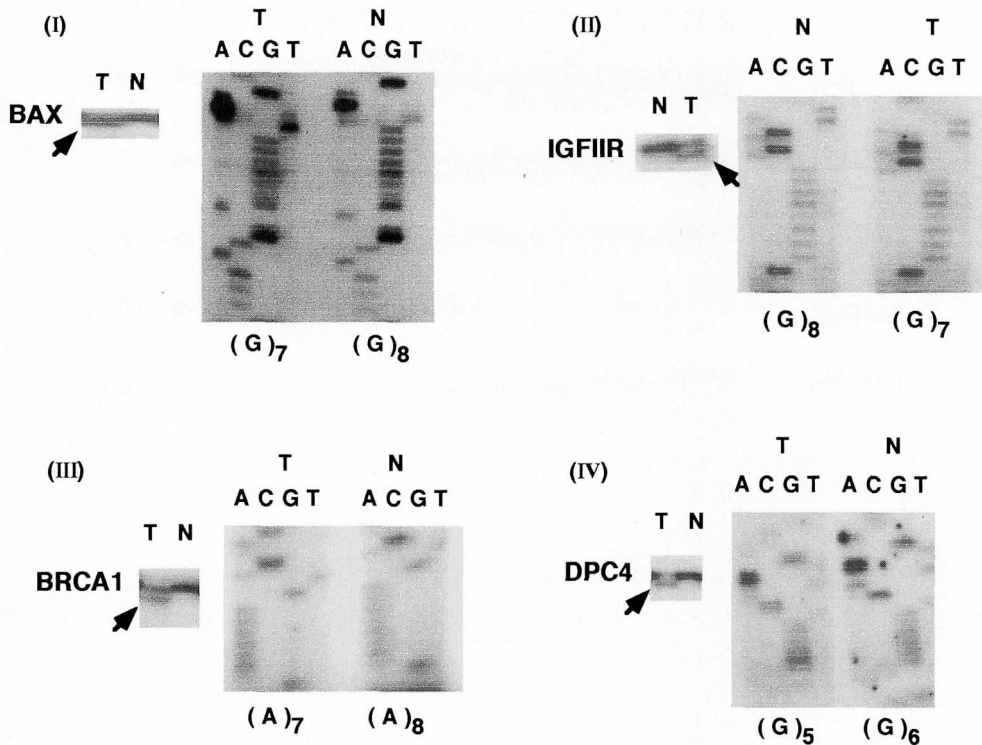


図3 PCR法による癌関連遺伝子検索 (1)

(I) BAX, (II) IGFIIIR, (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。

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, IGFIIIR, 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(+) 例 10 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 IV a 期の症例であった。細胞増殖に関連する遺伝子の

IGFIIIR 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)。

このフレームシフト変異が検出された 4 つの遺伝子 (BAX, IGFIIIR, 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

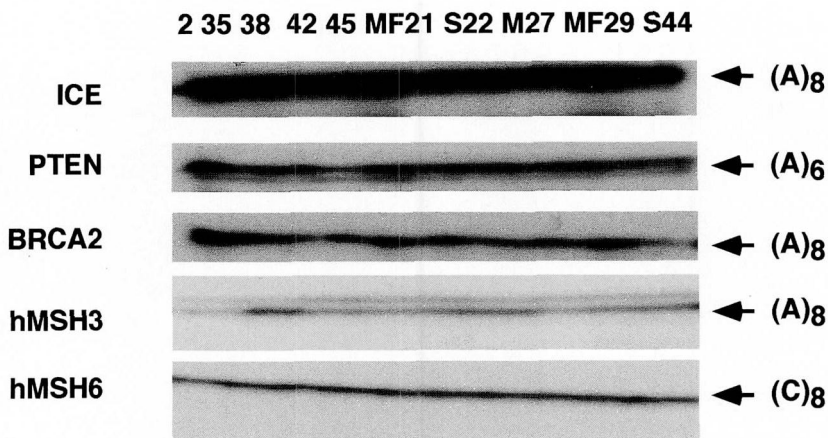


図4 PCR法による癌関連遺伝子検索(2)
右矢印は、各癌関連遺伝子のマイクロサテライトリピート回数と、PCR産物の正常位置を示す。

表6-2 MI(+)症例における遺伝子変異の検索結果

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

Case No.	PTEN(A) ₆	hMSH3(A) ₈	hMSH6(C) ₈
2	—	—	—
35	—	—	—
38	—	—	—
42	—	—	—
MF21*	—	—	—
S22*	—	—	—
M27*	—	—	—
MF29*	—	—	—
S44*	—	—	—

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

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。

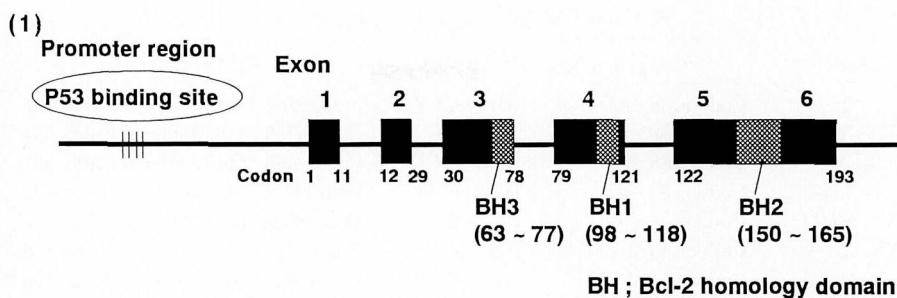
癌関連遺伝子に変異の認められた5例中多発癌症例は1例のみであった(表6-1)。

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

IGFIIR 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



(2) **Poly (G)₈ Repeats in BAX Gene mRNA**

```

1  atggacgggt ccggggagca gccagaggc ggggggcca ccagctctga gcagatcatg
61  aagacagggg cccttttgc tcaagggttc atccaggatc gagcagggcg 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 ..... atgggctga 193
                                     stop codon
    
```

⇌ Primers used for genomic amplification

Poly (G)₇ Repeats in mtBAX Gene mRNA

```

1  atggacgggt ccggggagca gccagaggc ggggggcca ccagctctga gcagatcatg
61  aagacagggg cccttttgc tcaagggttc atccaggatc gagcagggcg aatggggggg
121  agg cac ccg agc tgg ccc tgg acc cgg tgc ctc agg atg cgt cca cca aga agc tga gc
                                     stop codon 59
181  gagtgtctca agcgcacg gg ..... atgggctga 193
                                     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、(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。

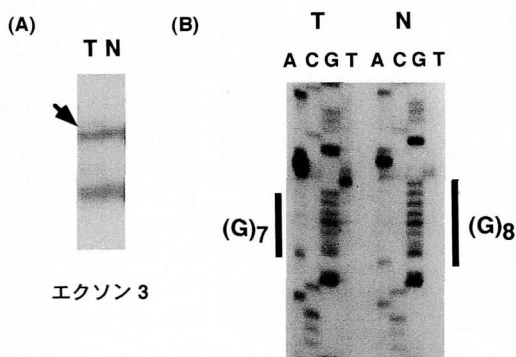


図6 SSCP 法で検出された MI(-) 例の BAX 遺伝子変異

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。

(exons 1~6) 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)。

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

表7 癌関連遺伝子変異例の検索結果

Genes	Case No.	Codon	Nucleotides	Amino acid
BAX	2	Codons 38~41	(G) ₈ → (G) ₇	Frameshift (Stop codon at codon 59)
	38	Codons 38~41	(G) ₈ → (G) ₇	Frameshift (Stop codon at codon 59)
	30*	Codons 38~41	(G) ₈ → (G) ₇	Frameshift (Stop codon at codon 59)
	M27**	Codons 38~41	(G) ₈ → (G) ₇	Frameshift (Stop codon at codon 59)
	S44**	Codons 38~41	(G) ₈ → (G) ₇	Frameshift (Stop codon at codon 59)
IGFIIR	2	Codons 1313~1316	(G) ₈ → (G) ₇	Frameshift (Stop codon at codon 1382)
	S44**	Codons 1313~1316	(G) ₈ → (G) ₇	Frameshift (Stop codon at codon 1382)
DPC4	42	Codons 228~229	(G) ₆ → (G) ₅	Frameshift (Stop codon at codon 275)
BRCA1	42	Codons 654~657	(G) ₈ → (G) 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

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³¹。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関与している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 Kiriou *et al*³⁶⁾ によって報告された33.3%、Higashikawa *et al*⁹⁾ 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例は口腔内の多発癌例であった。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 (+) 例9中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%) にもみ認められた。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、TGFβRII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になると考えられた。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IGF1R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IGF1R, 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 b 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 TGFb 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, 恩山 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) Kiri, 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 の作用機構. 日医大誌 **64**, 463–466, 1997.
- 40) Oltvai, Z.N., Millman, 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.