



表面型大腸腫瘍におけるDCC遺伝子コドン201の多型性に関する検討

南, 利江子

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 58(1/2/3):19-28

(Issue Date)

1997-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177378>



表面型大腸腫瘍におけるDCC遺伝子コドン201の 多型性に関する検討

神戸大学医学部病理学第二講座（指導：前田 盛教授）

南 利 江 子

（平成9年2月20日受付）

要 旨

大腸においても表面型腺腫・癌が多く発見されるようになり、分子生物学的にはK-ras遺伝子変異が極めて低率であることが明らかにされ、その形態像の特異性ととも従来ポリープ・癌相関とは異なる発育進展機序が想定されている。

大腸癌の発生・進展に関与する、第18染色体長腕上に存在する癌抑制遺伝子の候補遺伝子とされているDCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) 遺伝子について、私達はコドン201に(Arg/Gly)多型性が存在し、進行大腸癌と201(Gly)型が相関することを見出した。今回、DCC遺伝子コドン201(Arg/Gly)多型性について表面型と隆起型腫瘍とを比較検討した。

腫瘍高が正常粘膜以下のもの（平坦・陥凹型）を表面型とし、組織学的には軽度異型群（以下low群）、粘膜内癌を含む高度異型群（以下high群）、粘膜下層浸潤癌（以下sm癌）に分類した。末梢血あるいは正常大腸粘膜でのDCC遺伝子コドン201(Gly)型の頻度は、対照（全大腸内視鏡検査および家族歴で大腸腫瘍性病変を認めない例）17%（5/30例）、隆起型腫瘍を有する例ではlow群18%（3/17例）、high群49%（17/35例）、sm癌52%（15/29例）、および進行癌例では49%（36/74例）であった。表面型腫瘍を有する例では、high群64%（9/14例）、およびsm癌54%（7/13例）であり、隆起型high群、sm癌および進行癌と同様に高率であったが、表面型low群では67%（6/9例）と、対照（17%）および隆起型low群（18%）に比して有意に高率であった。片対立遺伝子の欠失（LOH）を認めた10例を除いて、コドン201の多型性は正常組織と腫瘍組織とで同一結果であった。腫瘍組織でLOHを認めた10例のうち9例はコドン201(Arg) アレルが欠失し、(Gly) アレルが残存していた。以上より、DCC遺伝子コドン201(Gly)型は大腸癌の有用な genetic markerであるとともに、表面型腫瘍にも関連してい

ることが示唆された。

緒 言

大腸癌においては、前癌病変としての腺腫の状態が存在することから、正常粘膜から良性腺腫を経て悪性の大腸癌へと腫瘍が発生・進展していく過程を追跡することが可能であり、Vogelsteinらによって各段階に関与する遺伝子が同定され、隆起型の腺腫の形成から進行癌に至る過程の遺伝子モデルが組み立てられた¹⁻³⁾。このモデルの中で、大腸腫瘍に関与する癌遺伝子としてはK-ras⁴⁾が同定され、高頻度に欠失する第5、17、18染色体領域の候補癌抑制遺伝子としてはそれぞれAPC (Adenomatous Polyposis Coli)⁵⁾、p53⁶⁾、DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma)⁷⁾ 遺伝子が想定されており、1つの癌の発生・進展過程に複数の癌抑制遺伝子が関与することが示され、多段階発癌における癌抑制遺伝子の不活化の意義が重要視されている^{1、2)}。

通常の隆起型腫瘍を対照としてなされたこれらの解析において、発癌過程の比較的早期に起こるとされてきたK-ras遺伝子変異が、浸潤癌では高度異型腺腫に比較して低率であることから¹⁾、ポリープ・癌相関とは異なる発癌経路の存在も想定されていた。

一方、日本において、隆起型の大腸腫瘍とは臨床病理学的に異なった特徴を有すると考えられる表面型腫瘍の発見頻度が増加しており⁸⁻¹¹⁾、分子生物学的な検討により、表面型癌では、腫瘍の大きさ、組織型や転移の有無にかかわらず、K-ras遺伝子変異が極めて低率であること¹²⁾、p53遺伝子に関しては隆起型早期癌とほぼ同様に変異を認めたことが報告されている¹³⁾。表面型腫瘍におけるK-ras遺伝子変異の検討から、従来のポリープ・癌相関とは異なる大腸発癌の存在が強く示唆されるようになった。

DCC遺伝子は大腸癌の約70%で欠失している第18染色体長腕の領域から、Fearonらによって1990

キーワード：表面型大腸腫瘍、癌抑制遺伝子、DCC遺伝子、遺伝子多型性、genetic marker

年に単離された癌抑制遺伝子の候補遺伝子である^{1, 2, 7, 14-17)}。大腸腫瘍におけるDCC遺伝子の構造変異として、5' 端の欠失⁷⁾、イントロン内およびアミノ酸翻訳領域内での点突然変異が報告されている^{7, 18-20)}。また、DCC遺伝子mRNAおよびDCC蛋白の発現低下・消失が大腸癌において高率に報告されている^{7, 17, 20, 21)}。最近、ヒト脳腫瘍でアレル特異的なDCC遺伝子mRNAの発現消失も報告された²²⁾。DCC遺伝子の機能に関する研究は少ないが、現在までに、①DCC遺伝子mRNAの発現が認められない大腸癌細胞株に正常ヒト第18染色体を移入すると、細胞同士の接着性が発現し、増殖速度・ヌードマウスでの造腫瘍能が低下すること²³⁾、②DCC遺伝子のアンセンスRNAをラットの不死化細胞(Rat-1)に導入することにより、増殖速度の増加、軟寒天中でのコロニー形成能の獲得、ヌードマウスでの造腫瘍性の促進と細胞接着性の低下が認められたことが報告されている²⁴⁾。さらに、③褐色細胞腫の細胞株(PC-12)でDCC遺伝子アンセンスRNAを発現させた実験では、樹枝状突起形成能の抑制、増殖能の獲得、さらに一旦形成された突

起の消失が観察された²⁵⁾。以上のことから、DCC遺伝子は細胞の分化、腫瘍の発生や増殖・進展に変化を及ぼす癌抑制遺伝子として機能していることが示唆されている²³⁻²⁶⁾。DCC遺伝子が関与する多型性は今までに4種類が報告されているが^{7, 27, 28)}、私達は、DCC遺伝子コドン201に(Arg/Gly)多型性が存在し、コドン201(Gly)型と進行大腸癌とが関連することを見出した²⁹⁾。

今回、表面型と隆起型大腸腫瘍との分子生物学的な相違を検討するために、表面型腫瘍を厳密に定義し、DCC遺伝子コドン201の多型性を解析した。

対象と方法

1) 病理組織学的検索

ポリベクトミーないし外科切除で得られた標本はホルマリン固定後にパラフィン包埋し、厚さ4 μ mのHE染色標本を作成した。組織学的に表面型腫瘍は、粘膜筋板から表層まで伸びた単一管状腺管が水平方向に配列し、オリンパス自動解析装置SP 500で測定し

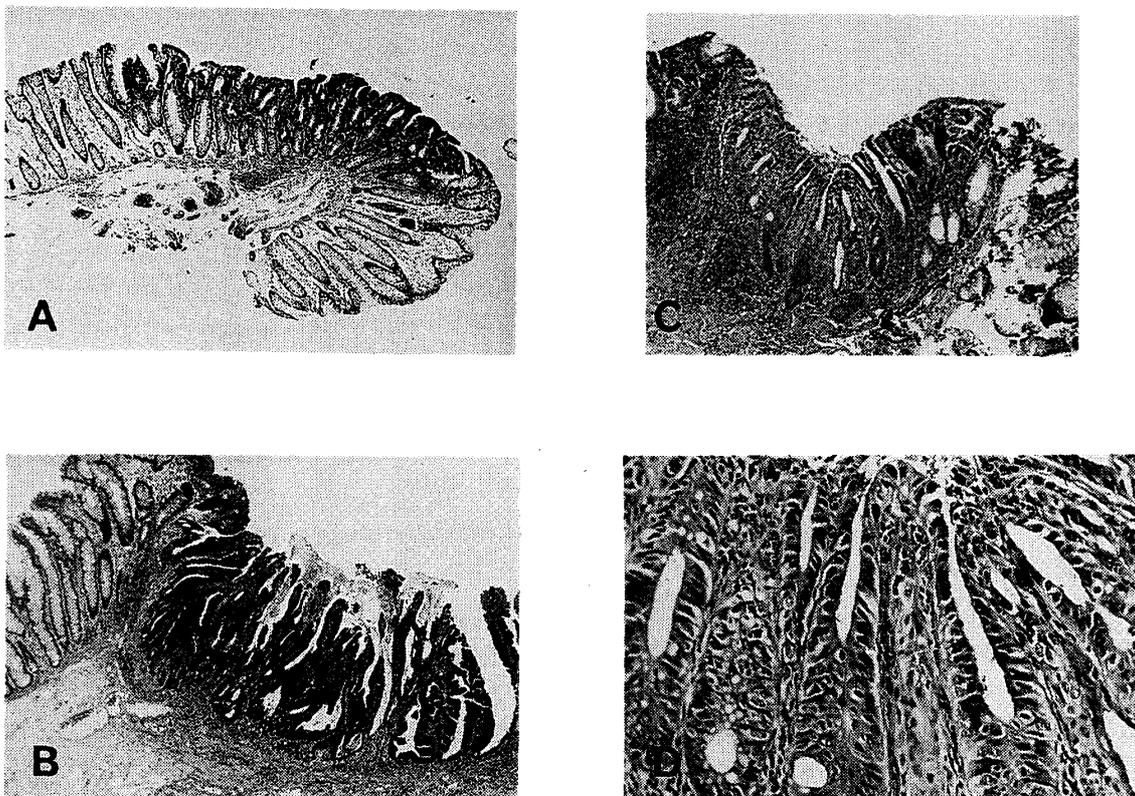


Figure 1. 表面型大腸腫瘍の組織像(HE染色)。腫瘍粘膜の高さは周囲正常粘膜の高さとほぼ等しいかそれよりも低く、単一管状腺管が水平方向に発育している。A. S状結腸にみられ大きさ4mmの陥凹性病変で、軽度異型腺腫である($\times 20$)。B. S状結腸にみられた大きさ6mmの陥凹性病変で、高分化腺癌が粘膜下層に浸潤している($\times 40$)。C. D. 下行結腸にみられた大きさ4mmの平坦性病変で、高度異型腺腫である($\times 20$, $\times 200$)。

た粘膜筋板からの腫瘍高が正常粘膜と同じかそれ以下の症例(平坦・陥凹型)と定義し³⁰⁾, それ以外のものを隆起型とした。表面型および隆起型腫瘍をそれぞれ, 軽度異型群 (adenoma with low-grade dysplasia, 以下low群), 粘膜内癌を含む高度異型群 (adenoma with high-grade dysplasia, 以下high群), 粘膜下層浸潤癌 (以下sm癌) に分類した (Fig. 1)。

2) 対象

東京女子医科大学消化器病センター, 神戸大学付属病院およびその関連施設で, 1983年から1995年の13年間に得られた表面型腫瘍36例, 隆起型腫瘍81例, 進行癌74例の腫瘍組織および正常組織(末梢血リンパ球あるいは正常大腸粘膜)について検討した。対照として, 全大腸内視鏡検査および家族歴で大腸腫瘍性病変を認めない症例30例について検討した。2種類のヒト大腸癌細胞株, SW480(ATCCより供与) およびWiDr (Japanese Cancer Research Resources Bankより供与) を使用した。

3) DNA抽出

迅速標本にて病巣部を同定した凍結標本あるいは末梢血リンパ球からは, proteinase K消化, フェノール/クロロホルム抽出で高分子量DNAを抽出した。パラフィン包埋標本は厚さ4 μ mの組織切片を作成し, HE染色した上検鏡にて腫瘍の存在を確認後, これに連続する厚さ10 μ mの切片をDNA抽出に使用した。切片をキシレンで2度脱パラフィンし, 95%エタノールで2度洗浄した後, ヘマトキシリン染色で核染色を行い, HE染色と対比させながら顕微鏡下に80%以上の腫瘍組織を含む病巣部およびそれより10腺管以上離れた正常部を同定して切り出し³¹⁾, proteinase K消化, boiling法でDNAを抽出した。

4) PCR-RFLP法によるDCC遺伝子コドン201 (Arg/Gly) 多型性の解析

プライマーの3'末端に1塩基のmismatchが存在してもアニーリングの温度を少し下げることによりPCR反応に影響しないことを利用して, 制限酵素の切断認識部位を人為的に作成するという方法により解析した³²⁾。使用したプライマーの塩基配列は5'-GTC TTG CCC TCT GGA GCA TTG CAG ATC AGT-3'(upstream), 5'-CTG AAG GCA ACA AAG AGC A-3'(downstream)で, 制限酵素Sal Iの認識部位を人為的に作成するために, upstream側のプライマーのコドン200の位置にアンダーラインで示した1塩基のmismatchを導入した。このプライ

マーを用いて増幅することにより, DCC遺伝子コドン201がCGA(Arg)の場合にはPCR反応物にGTCGACというSal I認識部位が形成され, 制限酵素処理することにより125bpのバンドを生じるが, コドン201がGGA(Gly)の場合には制限酵素で切断されずに155bpのバンドを生じる。

抽出したDNAの数 μ lに, 各50pmolのプライマー, 各0.2mMのdNTP, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0) および2.5単位の Taq-polymerase (TOYOBO, Osaka, Japan) を加えて全量50 μ lのPCR混合液を作成し, ミネラルオイルを重層した後反応を行った。Perkin-Elmer-Cetus社のthermal programmerを使用し, 94°Cで1分間, 58°Cで2分間, 72°Cで1分間を1サイクルとして35サイクルの反応を行った。PCR反応物の適量を10単位の制限酵素Sal I (TOYOBO, Osaka, Japan) で37°C, 12時間反応させた後, 8%のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色した。

5) PCR反応物のダイレクトシーケンス

upstream側のprimerは5'-CTG ACT CCA ATC CCA GGT GAC-3'で, downstream側のprimerは方法の4)で示したPCR-RFLPと同じものを使用してPCR反応を行った。PCR反応物をこの2種類のプライマーによりDye Deoxy Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて両方向からサイクルシーケンス反応を行い, 蛍光でラベルされたPCR反応物を精製後, 6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, コンピューターファイルになった塩基配列を遺伝子解析プログラム (Model 373A, Applied Biosystems) で解析した。

結 果

1) 表面型と隆起型腫瘍の臨床病理学的比較

表面型腫瘍(男性 29例, 女性 7例)および隆起型腫瘍(男性 64例, 女性 17例)の平均年齢はそれぞれ61.8 \pm 7.7歳(49~81歳), 60.2 \pm 12.1歳(20~86歳)で有意差はなかった。病変部位では右側結腸(脾彎曲より口側)に占める割合は表面型では42%であり, 隆起型(28%)より多い傾向がみられた (Table 1)。粘膜下層浸潤癌の大きさの平均値は隆起型15.3mmに対し, 表面型8.5mmで有意に小さかった。

Table 1. 大腸腫瘍の組織型と分布

組織型	計	直腸	S状結腸	下行結腸	横行結腸	上行結腸 盲腸
隆起型腫瘍	81	21(26%)	28(35%)	9(11%)	8(10%)	15(19%)
表面型腫瘍	36	2(6%)	12(33%)	7(19%)	7(19%)	8(22%)
進行癌	74	24(32%)	23(31%)	3(4%)	8(11%)	16(22%)

2) DCC遺伝子コドン201(Arg/Gly) 多型性の検討

PCR-RFLP法ではコドン201がArgの場合は125bp, Glyの場合には155bpのバンドを生じ, 電気泳動パターンに違いが生じることから多型性を検討した (Fig. 2)。PCR-RFLP法による解析は全症例について2回以上行い, 155bpのバンドを認めた症例のうち30例について, 制限酵素の作用不足による誤判定でないことを確認するために制限酵素量を倍量に増量して反応させ, 結果を確認した。221症例のうち55症例についてPCR-direct sequenceを行い, PCR-RFLP法と結果を比較し, コドン201(Arg/Gly) 多型性がコドン201の第1塩基の違い (CGA/GGA) であることを確認した (Fig. 3)。

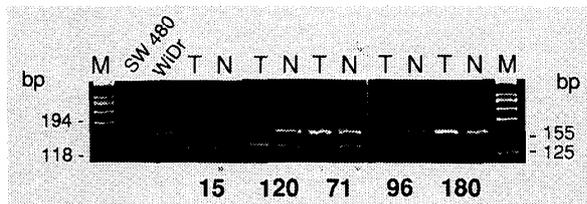


Figure 2. PCR-RFLP法によるDCC遺伝子コドン201(Arg/Gly)多型性の解析。制限酵素Sal Iの認識部位を作成するために3'末端に1塩基のmismatchを導入したプライマーを用いてPCR反応を行った。155bpのPCR反応物を制限酵素Sal Iで酵素処理し, 8%のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色した。DCC遺伝子コドン201がCGA(Arg)の場合は制限酵素Sal Iで切断され125bpのバンドを生じ, GGA(Gly)の場合には切断されずに155bpのバンドとして認められた。各レーンの数字は患者番号を示し, Nは正常組織, Tは腫瘍組織を示す。腫瘍組織においてレーン120ではコドン201(Gly)アレルの欠失が, レーン71では(Arg)アレルの欠失が認められた。コントロールとして2種類のヒト大腸癌細胞株SW 480(Arg型), WiDr(Gly型)を用いた。レーンMはDNAサイズマーカーを示す。

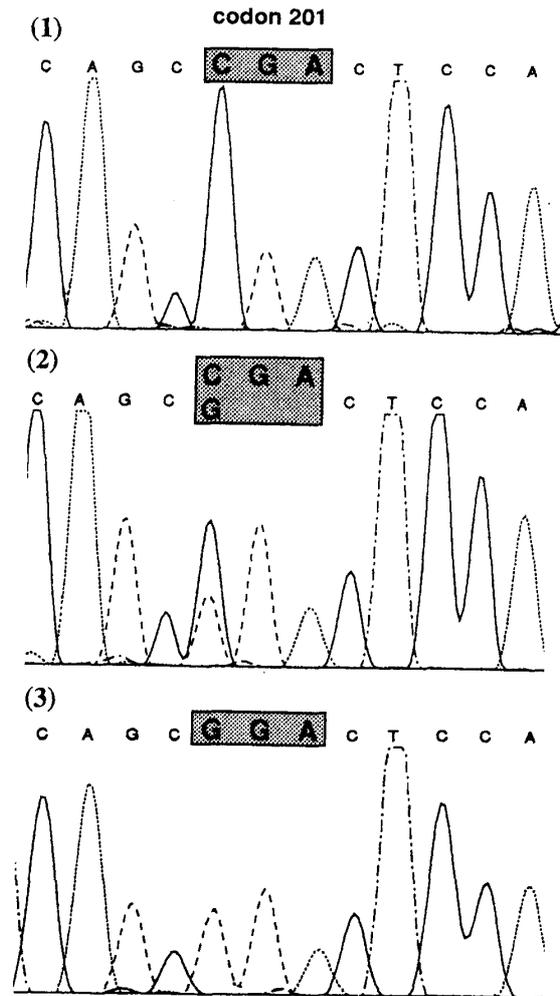


Figure 3. 腫瘍組織でのDCC遺伝子コドン201のPCRダイレクトシーケンスの結果。(1)患者番号15, 隆起型軽度異型腺腫例。コドン201はCGA(Arg)。(2)患者番号96, 表面型高度異型腺腫例。コドン201はCGA(Arg)/GGA(Gly)のヘテロであった。(3)患者番号180, 進行癌例。コドン201はGGA(Gly)。いずれもFig. 2のPCR-RFLP法と同一結果であることが確認された。

(A) 末梢血・正常大腸粘膜におけるDCC遺伝子コドン201(Gly)型の頻度 (Table 2A)

表面型腫瘍を有する例ではlow群67% (6/9例), high群64% (9/14例), sm癌54% (7/13例)で, 異型度によらずコドン201(Gly)型が高頻度であった。隆起型腫瘍を有する例での頻度はlow群18% (3/17例), high群49% (17/35例), sm癌52% (15/29例)であった。進行癌例での頻度は49% (36/74例), 対照では17% (5/30例)であった。正常組織でのコドン201(Gly)型の頻度は, high群, sm癌を有する例では腫瘍の形態像にかかわらず進行癌例と同様に高率であったが, 表面型low群では対照および隆起型low

群に比して有意に高率であった。

Table 2. DCC遺伝子コドン201(Arg/Gly)多型性と組織型

A. 正常組織 (末梢血あるいは正常大腸粘膜)での検討

組織型	計	DCC遺伝子コドン201多型性		
		Arg	Arg/Gly	Gly
対照	30	4(13%)	21(70%)	5(17%)
隆起型				*
low群	17	2(12%)	12(71%)	3(18%)
high群	35	5(14%)	13(37%)	17(49%)
sm癌	29	3(10%)	11(38%)	15(52%)
表面型				*
low群	9	1(11%)	2(22%)	6(67%)
high群	14	0	5(36%)	9(64%)
sm癌	13	0	6(46%)	7(54%)
進行癌	74	4(5%)	34(46%)	36(49%)

B. 腫瘍組織での検討

組織型	計	DCC遺伝子コドン201多型性		
		Arg	Arg/Gly	Gly
隆起型				*
low群	17	2(12%)	12(71%)	3(18%)
high群	35	5(14%)	13(37%)	17(49%)
sm癌	29	3(10%)	11(34%)	16(55%)
表面型				*
low群	9	1(11%)	2(22%)	6(67%)
high群	14	0	5(36%)	9(64%)
sm癌	13	0	5(38%)	8(62%)
進行癌	74	5(7%)	26(35%)	43(58%)

* :p<0.05(χ²test); 対照, 全大腸内視鏡検査および家族歴に大腸腫瘍性病変を認めない症例; low群, adenoma with low-grade dysplasia; high群, adenoma with high-grade dysplasia; sm癌, submucosal carcinoma

(B) 腫瘍組織でのDCC遺伝子コドン201(Gly)型の頻度 (Table 2 B, 3)

腫瘍組織に片対立遺伝子の欠失 (LOH) を認めた10例を除いて, コドン201(Arg/Gly) 多型性は正常組織と同一結果であった (Fig. 2)。腫瘍組織でLOHを認めた10例のうち9例 (表面型および隆起型sm癌各1例, 進行癌7例) はコドン201(Arg)アレルが欠失し, (Gly)アレルが残存していた (Table 3)。

LOHが生じた結果, 腫瘍組織でのコドン201(Gly)型の頻度は表面型 sm癌62% (8/13例), 隆起型sm癌55% (16/29例), 進行癌58% (43/74例) となったが, いずれも隆起型low群に比して有意に高率であった。(Table 2 B)。

Table 3. DCC遺伝子コドン201におけるLOHのパターンと組織型

コドン201におけるLOHのパターン	組織型					
	正常組織	腫瘍組織	隆起型sm癌	表面型sm癌	進行癌	計
Arg/Gly→Arg			0	0	1	1
Arg/Gly→Gly			1	1	7	9
計			1	1	8	10

LOH, loss of heterozygosity; sm癌, submucosal carcinoma

考 察

大腸癌の増加に伴って大腸の診断学, 特に内視鏡診断も急速に進歩を遂げ, 大腸においても微小な表面型早期病変が同定されるようになり, 大腸癌の組織発生・進展に新たな問題を投げている⁸⁻¹¹⁾。

表面型腺腫は, 腫瘍の大きさが同程度であっても隆起型腺腫より異型度の高い病変が多く^{8, 9)}, 10mm以下の微小な病変であっても隆起型に比較して粘膜下層浸潤率が有意に高率であることが報告され^{10, 11)}, 両者の臨床病理学的な相違が明らかになりつつある。

分子病理学的検討からは, 1994年以来私達のグループを含む本邦の研究者により, 表面型腫瘍では腺腫・癌ともにK-ras遺伝子の変異率が0~8%と, 隆起型と比較して極めて低いことが報告され^{12, 33)}, 非Vogelsteinモデル (非ポリープ・癌相関) による発癌経路が示唆されている。

私達は, DCC遺伝子コドン201に (Arg/Gly) 多型性が存在し, 進行大腸癌とコドン201(Gly)型が相関することを見出した²⁹⁾。今回, 表面型腫瘍の遺伝子変化をより明らかにするために, DCC遺伝子コドン201(Arg/Gly)多型性について隆起型と比較検討した。表面型は施設によりその定義が異なるが, 私達は, 腫瘍高の測定により正常粘膜と同じ高さかそれより低い (平坦・陥凹型) 病変のみを表面型として厳密に定義して検討した³⁰⁾。その結果, 正常組織でのDCC遺伝子コドン201(Gly)型の頻度は, 表面型・隆起型にかかわらず異型度の高い群 (high群, sm癌) を有する症例では, 進行癌例と同様に対照に比して有意に高率であることが示された。さらに, 特徴的であ

たのは、表面型low群を有する例(67%)では、対照(17%)および隆起型low群(18%)より有意に高率にコドン201(Gly)型が認められたことであった。以上より、コドン201(Gly)型が異型度の低い表面型腫瘍にも関与していることが示唆され、従来の隆起型腫瘍でなされてきた異型度診断を表面型腫瘍にもあてはめることの問題点を渡辺らが指摘しているが³⁴⁾、その見解に合致する結果と考えられた。

DCC遺伝子産物は細胞膜に存在し、細胞外ドメインは免疫グロブリン(Ig)様ドメインの4回繰り返しとフィブロネクチンⅢ型ドメインの6回繰り返しから成り、神経細胞接着因子(N-CAM)に類似した構造を持つと推定されている^{7, 19, 20)}。第18染色体長腕の欠失、DCC遺伝子mRNAの発現低下・消失が進行大腸癌、特に肝転移例で高率とする報告が多くあり^{16, 17)}、DCC遺伝子の異常は構造上の特徴から、細胞間もしくは間質との相互作用やそれによる情報伝達の異常を引き起こし、細胞増殖能の亢進、細胞分化の異常(異形成)、転移能の獲得に関与し、大腸癌の発生・進展過程の後期、特に肝転移に関与すると考えられている。DCC遺伝子コドン201は細胞外ドメインのIg様ドメイン4回繰り返し部分の2番目に位置している。大腸腫瘍においてコドン201(Gly)型が進行癌のみならず形態像にかかわらず異型度の高い群、浸潤傾向のあるものに高率であったこと、LOHを認めた10例のうち9例で腫瘍組織にコドン201(Gly)アレルが残存していたことから、コドン201が塩基性側鎖を持つArgから非極性側鎖を持つGlyに変化することにより細胞接着分子と類似した構造を有するDCC遺伝子の機能に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

大腸癌のなかで家族性大腸ポリポシス(FAP: Familial Adenomatous Polyposis)と遺伝性非ポリポシス大腸癌(HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma)が主要な遺伝性大腸癌として挙げられ、FAPの原因遺伝子としてはAPC遺伝子³⁾が、HNPCCではDNAミスマッチ修復遺伝子³⁵⁻³⁷⁾が同定されているが、それぞれの頻度は全体の約1%、5%と低頻度であり、家族歴を有するその他多くの大腸癌例³⁸⁾の遺伝素因は不明である。臨床的に診断容易なFAPと異なり、孤発性大腸癌で非典型的なHNPCCと鑑別困難な症例も多く存在すると考えられている。DNAミスマッチ修復遺伝子の異常はRER(replication error)として検出容易で、HNPCCでは高率にRER陽性となるが³⁵⁻³⁷⁾、孤発性大腸癌でも約15%に、さらに35歳以下の若年者では約58%にRERが認められると報告されており³⁹⁾、DNAミスマッチ修復遺伝子異常のgermlineでのスクリーニングが大

腸癌の高危険因子群の選別につながる可能性が示唆されている。DCC遺伝子コドン201の多型性を2家系で検索したところ、メンデルの法則に従って遺伝していることが示された。今回の検討症例は多施設から集められたため、家族歴に関して十分な検討を加えることが出来なかったが、今後、大腸癌の高危険因子群選別のgenetic markerとしてのコドン201(Gly)型の有用性について、樹形図に従った検討を加えていく必要があると考えている。

早期胃癌で培われた消化管の診断学が大腸にも適用され、腺腫を中心とした大腸腫瘍性病変が多く発見されるようになってきた。しかし、癌にまで進展する腺腫はその中の5~10%に過ぎず⁴⁰⁾、いかに大腸癌の高危険因子群を同定するかが今後の課題とされており、表面型腫瘍の存在やDNAミスマッチ修復遺伝子異常の意義が臨床病理学的な検討に新たな知見を重ねている。今回の検討により、DCC遺伝子コドン201に(Arg/Gly)多型性が存在し、コドン201(Gly)型が形態像によらず異型度の高い群および進行癌に高率であることが示され、大腸癌高危険因子群選別の有用なgenetic markerとしてスクリーニングに利用できる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました前田 盛教授ならびに春日雅人教授に心から謝意を表します。また、研究遂行にあたり直接指導を頂きました神戸大学第二内科 青山伸郎博士、獨協医科大学第二病理教室 藤盛孝博教授に深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Vogelstein, B., Fearon, ER., Hamilton, SR., Kern, SE., Preisinger, AC., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, AMM., Bos, JL.: Genetic alteration during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319 : 525-532, 1988.
- 2) Fearon, ER., Vogelstein, B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 : 759-767, 1990.
- 3) Finley, GG., Schulz, NT., Hill, SA., Geiser, JR., Pipas, JM., Meisler, AI. : Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer. *Oncogene* 4 : 963-971, 1989.

- 4) Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Vries, M.V., van Boom, J.H., van Der Eb, A.J., Vogelstein, B. : Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327 : 293-297, 1987.
- 5) Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hamilton, S.R., Hedge, P., Markham, A., Carlson, M., Joslyn, G., Groden, J., White, R., Miki, Y., Miyoshi, Y., Nishisho, I., Nakamura, Y. : Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251 : 1366-1370, 1991.
- 6) Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., van Tuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R., Vogelstein, B. : Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244 : 217-221, 1989.
- 7) Fearon, E.R., Cho, K.R., Nigro, J.M., Kern, S.E., Simons, J., Ruppert, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Thomas, G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. : Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247 : 49-56, 1990.
- 8) Adachi, M., Muto, T., Okinaga, K., Morioka, Y. : Clinicopathological features of the flat adenoma. *Dis. Colon Rectum* 34 : 981-986, 1991.
- 9) Wolber, R.A., Owen, D.A. : Flat adenomas of the colon. *Hum. Pathol.* 22 : 70-74, 1991.
- 10) Kuramoto, S., Oohara, T. : Flat early cancers of the large intestine. *Cancer* 64 : 950-955, 1989.
- 11) Ikegami, M. : A pathological study on colorectal cancer-From de nove carcinoma to advanced carcinoma. *Acta. Pathol. Jpn.* 37 : 21-37, 1987.
- 12) Fujimori, T., Satonaka, K., Yanamura-Idei, Y., Nagasako, K., Maeda, S. : Non-involvement of ras mutations in flat colorectal adenomas and carcinomas. *Int. J. Cancer* 57 : 51-55, 1994.
- 13) Yamamura-Idel, Y., Satonaka, K., Fujimori, T., Maeda, S., Chiba, T. : p53 mutation in flat-and polypoid-type colorectal tumors detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Dig. Dis. Science* 39 : 2043-2048, 1994.
- 14) Sasaki, M., Okamoto, M., Sato, C., Sugio, K., Soejima, J., Iwama, T., Ikeuchi, T., Tonomura, A., Miyaki, M., Sasazuki, T. : Loss of constitutional heterozygosity in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli and those with nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 49 : 4402-4406, 1989.
- 15) Miyaki, M., Seki, M., Okamoto, M., Yamanaka, A., Maeda, Y., Tanaka, K., Kikuchi, R., Iwama, T., Ikeuchi, T., Tonomura, A., Nakamura, Y., White, R., Miki, Y., Utsunomiya, J., Koike, M. : Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 50 : 7166-7173, 1990.
- 16) Ookawa, K., Sakamoto, M., Hirohashi, S., Yoshida, Y., Sugimura, T., Terada, M., Yokota, J. : Concordant p53 and DCC alterations and alleic losses on chromosomes 13q and 14q associated with liver metastases of colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* 53 : 382-387, 1993.
- 17) Iino, H., Fukayama, M., Maeda, Y., Koike, M., Mori, T., Takahashi, T., Kikuchi-Yanoshita, R., Miyaki, M., Mizuno, S., Watanabe, S. : Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. 17p, 18q and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with metastatic potential. *Cancer* 73 : 1324-1331, 1994.
- 18) Miyake, S., Nagai, K., Yoshino, K., Oto, M., Endo, M., Yuasa, Y. : Point mutations and allelic deletion of tumor suppressor gene DCC in human esophageal squamous cell carcinomas and their relation to metastasis. *Cancer Res.* 54 : 3007-3010, 1994.
- 19) Cho, K.R., Oliner, J.D., Simons, J.W., Hedrick, R., Fearon, E.R., Preisinger, A.C., Hedge, P., Silvermann, G.A., Vogelstein, B. : The DCC gene ; Structural analysis and mutation in colorectal carcinomas.

- Genomics 19 : 525-531, 1994.
- 20) Reale, MA., Hu, G., Zafar, AI., Getzenberg, RH., Levine, SM., Fearon, ER. : Expression and alternative splicing of the Deleted in Colorectal Cancer (DCC) gene in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 54 : 4493-4501, 1994.
 - 21) Itoh, F., Hinoda, Y., Ohe, M., Ohe, Y., Ban, T., Endo, T., Imai, K., Yachi, A. : Decreased expression of DCC mRNA in human colorectal cancers. *Int. J. Cancer* 53 : 260-264, 1993.
 - 22) Ekstrand, BC., Mansfield, TA., Bigner, SH., Fearon, ER. : DCC expression is altered by multiple mechanisms in brain tumours. *Oncogene* 11 : 2393-2402, 1995.
 - 23) Goyette, MC., Cho, K., Fasching, CL., Levy, DB., Kinzler, KW., Paraskova, C., Vogelstein, B., Stanbridge, EJ. : Progression of colorectal cancer associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition to tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 1387-1395, 1992.
 - 24) Narayanan, R., Lawlor, KL., Scaapveld, RQJ., Cho, KR., Vogelstein, B., Tran, PBV., Osborne, MP., Telang, NT. : Antisense RNA to putative tumor-suppressor gene DCC transforms Rat-1 fibroblasts. *Oncogene* 7 : 553-561, 1992.
 - 25) Lawlor, K., Narayanan, R. : Persistent expression of the tumor suppressor gene DCC is essential for neuronal differentiation. *Cell. Growth. Differ.* 3 : 609-616, 1992.
 - 26) Hedrick, L., Cho, KR., Fearon, ER., Wu, TC., Kinzler, KW., Vogelstein, B. : The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes. Dev.* 8 : 1174-1183, 1994.
 - 27) Nishisho, I., Tateishi, H., Motomura, K., Miki, T., Yoshida, M., Ikeuchi, T., Yamamoto, K., Okazaki, M., Takai, S., Mori, T. : Assignment of a polymorphic locus of OS-4 (D18S5) DNA segment to human chromosome region 18q21.3→qter. *Jpn. J. Hum. Genet.* 32 : 1-7, 1987.
 - 28) Devilee, P., van Vliet, M., Cho, KR., Vogelstein, B. : Hind III polymorphism in the DCC gene. *Nucleic Acids Res.* 19 : 6965, 1991.
 - 29) 青山伸郎, 藤盛孝博, 前田 盛. 大腸癌とDCC遺伝子異常. *内科*74 : 181-184, 1994.
 - 30) Nagasako, K., Satonaka, K., Hirayama, D., Fujimori, T., Maeda, S. : A clinicopathological study on the mucosal heights fo superficial type (Type II) early colon cancer. (In Japanese) *Jpn. J. Gastroenterol.* 88 : 763, 1991.
 - 31) Whetsell, L., Maw, G., Nadon, N., Ringer, DP., Schaefer, FV. : Polymerase chain reaction microanalysis of tumors from stained histological slides. *Oncogene* 7 : 2355-2361, 1992.
 - 32) Jiang, W., Kahn, SM., Guillem, JG., Lu, SH., Weinstein, IB. : Rapid detection of ras oncogenes in human tumors : Applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene* 4 : 923-928, 1989.
 - 33) Yamagata, S., Muto, T., Uchida, Y., Masaki, T., Sawada, T., Tsuno, N., Hirooka, T. : Lower incidence of K-ras codon 12 mutation in flat colorectal adenomas than in polypoid adenomas. *Jpn. J. Cancer Res* 85 : 147-151, 1994.
 - 34) 渡辺英伸, 味岡洋一, 早期大腸癌の病理組織診断—その差はどこにあるのか。 *胃と腸* 27 : 667-671, 1992.
 - 35) Lynch, HT., Smyrk, TC., Watson, P., Lanspa, SJ., Lynch, JF., Lynch, PM., Cavalieri, RJ., Boland, CR. : Genetics, natural history tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer : An updated review. *Gastroenterol.* 104 : 1535-1549, 1993.
 - 36) Fishel, R., Lescoe, MK., Rao, MRS., Copeland, NG., Jenkins, NA., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R. : The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75 : 1027-1038, 1993.
 - 37) Papadopoulos, N., Nicolaidis, NC., Wei, YF., Ruben, SM., Carter, KC., Rosen, CA., Haseltine, WA., Fleischmann, RD., Fraser,

- CM., Adems, MD., Venter, JC., Hamilton, SR., Petersen, GM., Watson, P., Lynch, HT., Peltomaki, P., Mecklin, JP., de la Chapelle, A., Kinzler, KW., Vogelstein, B. : Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263 : 1625-1629, 1994.
- 38) Houlston, RS., Collins, A., Slack, J., Morton, NE. : Dominant genes for colorectal cancer are not rare. *Ann. Hum. Genet.* 56 : 99-103, 1992.
- 39) Liu, B., Farrington, SM., Petersen, GM., Hamilton, SR., Parsons, R., Papadopoulos, N., Fujiwara, T., Jen, J., Kinzler, KW., Wyllie, AH., Vogelstein, B., Dunlop, MG. : Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nature Med.* 1 : 348-352, 1995.
- 40) Morson, BC. : The polyp cancer sequence in the large bowel. *Proc. Roy. Soc. Med.* 67 : 451-457, 1974.

Codon 201^{Arg/Gly} Polymorphism of the DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) Gene in Flat- and Polypoid-Type Colorectal Tumors

RIEKO MINAMI

Second Department of Pathology, Kobe University

Abstract

Recent studies have identified the distinct existence of flat-type colorectal tumors. The low incidence of *ras* gene mutations in these tumors suggests that their genetic pathways of tumor progression may be different from those of the polypoid type. To elucidate further genetic alterations in flat-type colorectal tumors, codon 201^{Arg/Gly} polymorphism in the DCC (deleted in colorectal carcinoma) gene was analyzed in normal tissue (normal colonic mucosa or peripheral lymphocytes), and tumor tissue from 191 patients with colorectal tumors (36 patients with flat-type colorectal tumors, 81 patients with polypoid-type colorectal tumors, and 74 patients with advanced carcinomas). For normal controls, 30 samples obtained from patients who had neither colorectal tumors (confirmed by total colonoscopy) nor a family history of colorectal carcinoma were analyzed. DCC gene codon 201^{Arg/Gly} polymorphism was investigated by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis, fluorescence-based dideoxy sequencing, or both. For the flat type, the frequency of codon 201^{Gly} of the DCC gene was 64% and 54% in the normal tissue of patients with adenoma with high-grade dysplasia and submucosal carcinoma, respectively. It was 49%, 52%, and 49% in the normal tissue of patients with polypoid-type adenoma with high-grade dysplasia, submucosal carcinoma, and advanced carcinoma, respectively. In the normal tissue, codon 201^{Gly} of the DCC gene was more frequently observed in patients with flat-type adenoma with low-grade dysplasia (67%) than in those with polypoid-type adenoma with low-grade dysplasia (18%) or in normal controls (17%) ($p < 0.05$, χ^2 test). Codon 201^{Arg/Gly} polymorphism in tumor tissues did not differ from that in the corresponding normal tissues, except for ten cases of carcinoma with loss of heterozygosity (LOH). In carcinomas with LOH, preferential loss of the codon 201^{Arg} allele was noted (9/10 cases). These results suggest that codon 201^{Gly} of the DCC gene is not only associated with flat-type colorectal tumors, but that it may serve as a useful genetic marker for identifying groups at higher risk for colorectal cancer.

Key words: flat-type colorectal tumor, tumor suppressor gene, DCC gene, polymorphism, genetic marker