

熊本大学博士（医学）論文

論文名： ‘*de novo*’ 型大腸癌の発癌遺伝子経路の解明

Genetic pathways of ‘*de novo*’ colorectal carcinogenesis

著者名： 塩 盛 建 二  
S h i o m o r i K e n j i

指導教官名： 外科学第二講座教授 小川 道雄

審査員名： 1) 腫瘍医学担当教授 佐谷 秀行  
2) 第二病理学担当教授 竹屋 元裕  
3) 分子遺伝学担当教授 森 正敬  
4) 器官形成部門組織  
制御分野担当教授 山泉 克

2003 年 3 月

## 目 次

目次	1
要旨	3
発表論文リスト	5
謝辞	6
略号	7
第1章 研究の背景と目的	8
第2章 材料と実験方法	15
1) 組織	15
2) 抗体	15
3) Western blot 法	16
4) 免疫組織染色	17
5) 染色の評価	18
6) micro-dissection	18
7) プライマー	19
8) PCR-SSCP 法	21
9) PCR-FSSCP 法	22
10) クローニング法および DNA sequence	22
第3章 結果	24
1) 抗 BGP 抗体の特異性	24
2) 'de novo' 型大腸癌と BGP foci における BGP の発現	25
3) 'de novo' 型大腸癌と BGP foci の遺伝子変異	28
4) 'de novo' 型大腸癌と BGP foci における p53 と APC の変異解析	33

第4章	考察	34
1)	癌ならびに前癌病変における BGP 発現の意義	34
2)	'de novo' 型大腸癌の前癌病変の候補としての BGP foci	35
3)	BGP foci と'de novo' 型大腸癌の癌遺伝子変化	36
4)	BGP foci からみた'de novo' 型大腸癌発生のメカニズム	37
第5章	結論	39
参考文献		40

## 要 旨

背景と目的：散発性の大腸癌の発癌機構には、'adenoma-carcinoma sequence' (ACS)と'*de novo*'型発癌の2つの経路が考えられている。ACS発癌機構は一般的に受け入れられ、実際、様々な癌遺伝子や癌抑制遺伝子による多段階発癌の過程が明らかにされた。しかし、'*de novo*'型大腸癌の発生については、未だその発癌機構が殆ど明らかとなっていない。'*de novo*'型発癌は、肉眼的にも明瞭な腺腫から発生するACSと異なり、正常大腸粘膜から直接に癌の発生をみるものである。その初期変化の病像を得ることは困難である。しかし、その変化を捕えることができなければ、'*de novo*'型発癌機構の解明は不可能であると考えられる。glycogen phosphorylase (GP) は、癌において活性が上昇することが知られている嫌氣的解糖系の主役を担う重要な酵素である。GPの活性は正常の消化管粘膜においては殆ど検出されないが、胎児期の消化管粘膜や消化器癌においては強い発現がある。またGPには筋、肝、脳型(胎児型) (BGP)の3種のアイソザイムがあり、そのうち胎児と癌に発現するものはBGPである。以前より当教室では、癌の発生部位と考えられる消化管粘膜の増殖細胞群に注目し研究を行っており、BGP陽性の増殖細胞を含む大腸粘膜 (BGP foci)に *p53* 遺伝子の変異を高頻度に認めることより、'*de novo*'型大腸癌の前癌病変である可能性を示した。しかし、'*de novo*'型大腸癌においては、腺腫成分を全く含まないにもかかわらず、なぜ腺腫形成に関与する *APC* 遺伝子の変異が高頻度に検出されるのかなど不明のままである。今回の研究の目的は、BGP fociの *APC*、*K-ras*、*p53* 遺伝子変化を検索し、謎の多い'*de novo*'型大腸癌の発癌機構を明らかにすることである。

方法：'*de novo*'型大腸癌には *p53* 蛋白発現が高い。そこで、168例の大腸癌切除症例から *p53* 蛋白発現を認め腺腫成分が全くない粘膜下層及び表層の固有筋層に限局している'*de novo*'型大腸癌切除症例 28例を

選択した。免疫組織化学的検索による結果から'*de novo*'型大腸癌病巣およびBGP fociをmicrodissectionし、一連のAPC、*K-ras*、*p53*の遺伝子変化をPCR-FSSCPでスクリーニングし、さらにTAクローニングとシーケンスを行った。

結果：p53 蛋白発現のある'*de novo*'型大腸癌切除症例 28 例の全てにBGPの発現を認め、同時に、癌病巣近傍にBGP fociの散在性分布を検出した。遺伝子レベルの検討では、'*de novo*'型大腸癌病巣およびBGP fociには*K-ras*の変異は全く検出されなかった。これに対して、'*de novo*'型大腸癌病巣では*p53*、APCの遺伝子変異はそれぞれ14例(50.0%)、9例(32.1%)に認めた。一方、BGP fociでは*p53*、APCの遺伝子変異はそれぞれ11例(39.3%)、1例(3.6%)に検出された。'*de novo*'型大腸癌病巣ならびにBGP fociに*p53*、APC両方の遺伝子変異を認めるものはそれぞれ8例(28.5%)、1例(3.6%)、*p53*のみに遺伝子変異を認めるものはそれぞれ6例(21.4%)、10例(35.7%)、APCのみに遺伝子変異を認めるものは1例(3.6%)、0例(0%)であった。

結論：BGP fociは'*de novo*'型発癌における前癌病変とみなすことができる初期変化であった。さらに、このBGP fociと'*de novo*'型大腸癌の遺伝子変化の詳細な解析によって、'*de novo*'型発癌には、*p53*-APC経路と*p53*単独経路の2つの主経路があることが示唆された。また、前者においてAPC遺伝子変異はlate eventであり、このことが'*de novo*'型大腸癌においては腺腫を形成しない大きな理由であることが考えられた。

## 発表論文

主論文

1 編 1 冊

著者名

Kenji Shiomori, Shinya Shimada, Takashi Marutsuka, Ichiro  
Hatayama, Michi Ogawa

論文題

Genetic pathways of '*de novo*' colorectal carcinomas with reference  
to fetal-type glycogen phosphorylase positive foci

雑誌名

International Journal of Oncology

巻, 頁, 年

22:65-74,2003 in press

## 謝 辞

本研究は熊本大学大学院医学研究科外科学第二講座において小川道雄教授の御指導のもとに行われた。研究ならびに多面の御指導を賜りました小川道雄教授に深甚なる謝意を捧げます。

また、研究ならびに論文作成に直接御指導、御助言頂いた外科学第二講座講師島田信也博士に深く感謝いたします。

更に、研究に御協力下さった教室員諸兄に感謝の意を表します。

## 略 号

GP: glycogen phosphorylase

BGP: brain (fetal)-type glycogen phosphorylase

ACS: adenoma-carcinoma sequence

KLH: keyhole limpet hemocyanin

PBS: phosphate buffered saline

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

BSA: bovine serum albumin

PCR: polymerase chain reaction

PCR-SSCP: PCR-single strand conformation polymorphism

PCR-FSSCP: fluorescence-based PCR-SSCP

APC: adenomatous polyposis coli

FAP: familial adenomatous polyposis

MCR: mutation cluster region



## 第1章

### 研究の背景と目的

明らかな遺伝性を示さない一般的な大腸癌（散发性大腸癌）の発癌機構には、腺腫を大腸癌の前癌病変とする'adenoma-carcinoma sequence' (ACS)と、腺腫を介さず大腸粘膜から直接癌が発生するとする'*de novo*'型発癌の2つの経路が考えられている。いわゆる大腸ポリープから発生する ACS 発癌に関するシナリオは一般的に受け入れられ、実際、様々な癌遺伝子や癌抑制遺伝子による多段階発癌の過程が明らかにされた (Morson, et al., 1974; Vogelstein, et al., 1988; Fearon, et al., 1990; 1992) (図 1)。大腸ポリープは (1) 隆起という形状から内視鏡的に発見されやすい、(2) 悪性度の進行によって肉眼的にその形状が変化することが多い、(3) ACS の各ステップが病理組織学的に診断できる、という特徴が分子生物学とうまく融合し、ACS 説における遺伝子変異経路がほぼ確立した。一方、最近の内視鏡機器の改良によって、以前には発見されなかった腺腫成分を含まない表面陥凹型早期癌の存在が明らかになったものの、その所謂'*de novo*'型発癌についてはその機構が殆ど明らかとなっていない。

APC 遺伝子は、1986年に5番染色体長腕21-22に同定され、1991年にクローニングされた (Grodin et al., 1991)。300kDの巨大な蛋白質の遺伝情報をコードしている。アミノ酸の情報を担う exon は15存在し、第15番目の exon は6,500塩基対以上でかなり巨大である。familial adenomatous polyposis (FAP)の症例で germline mutation を、また散发性大腸癌でも点変異を80%以上に認めると報告されている (Polakis, et al., 1997)。この遺伝子の不活化が ACS における発癌の早期の段階で重要な役割を担っているとされ、さらに APC の変異は翻訳領域の約10%に満たない codon 1286 から 1514 の mutation cluster region (MCR)と呼ばれ

る領域に約 80%が集中しているといわれている (Be'roud et al., 1996; Miyoshi et al., 1992)。すなわち、この APC の変異によって ACS の最初のステップである腺腫形成が引き起こされていることになる。

*p53* 遺伝子は、17 番染色体短腕 12-13 に同定され、分子量 53kD の核蛋白質をコードしている。真核細胞の細胞周期には、 $G_1/S$  移行期と  $G_2/M$  移行期にチェックポイントがあり、これらのチェックポイントに *p53* 遺伝子関わっている。*p53* 蛋白は、その半減期が約 20 分と短いため通常は細胞内で低濃度となっているが、種々の刺激で DNA ダメージを受けると細胞内 *p53* 蛋白の濃度が急速に上昇し、*p53* 蛋白のもつ転写活性化能が高まり、DNA 修復が完了するまでの間、細胞周期を  $G_1$  で停止させる (Lane DP et al., 1992; Kastan MB et al., 1991)。また、遺伝子異常に応じアポトーシスを誘導する作用も持っている。従って、正常な *p53* 遺伝子が失われてしまえば、アポトーシスを回避するか増殖を続けてしまうことになる (Levine AJ et al., 1992)。多くの癌において *p53* 遺伝子の変異がおきていることから非常に重要な遺伝子であり、その変異の約 90%以上が exon 5 から 8 に集中しているといわれている (Harris et al., 1993)。

*K-ras* 遺伝子は、12 番染色体短腕 12 に同定され、4 つの exon が存在する 189 個のアミノ酸より構成される蛋白質をコードしている。散在性大腸癌の約 50%以上に変異を認め、その約 80%以上が codon 12 に集中しており、約 10%が codon 13 である。ACS においては、APC 遺伝子の変異後の早期の段階で変異がおき、腺腫の増殖・異型度の亢進に関係すると報告されている (Vogelstein B et al., 1988)。

'*de novo*' 型発癌は大腸粘膜から adenoma を経ずに直接癌化するもの (Shimoda, et al., 1989; Mueller, et al., 1996) である。ACS と '*de novo*' 型大腸癌における遺伝子変異は APC、*K-ras*、*p53* において、それぞれ、43-60% vs. 35-42% (Powell, et al., 1992; Aoki, et al., 1994; Miyaki, et al., 1994; Olschwang, et al., 1998; Umetani, et al., 2000)、45-68% vs. 0-11% (Aoki, et al., 1994; Olschwang, et al., 1998; Umetani, et al., 2000; Fujimori, et al., 1994; Minamoto, et al., 1994; Saito, et al., 2000)、36-60% vs. 40-66% (Aoki, et al.,

1994; Hasegawa, et al., 1995; Roa, et al., 2000; Shimada, et al., 2001)と報告されている。以上より、'de novo' 型大腸癌においては腺腫成分を全く含まないにも関わらず、ACS と同様に APC 遺伝子の不活性化が必要であることは明らかである。従って、'de novo' 型発癌のメカニズムの解明にあたってはその前癌病変を捉えることが必要となってくる。しかし、'de novo' 型発癌は、肉眼的にも明瞭な腺腫から発生する ACS と異なり、正常大腸粘膜から直接に癌の発生をみるものであるため、その初期変化の病像を得ることは困難であるが、その変化を捕えることができなければ、'de novo' 型発癌機構の解明は不可能であると考えられる。

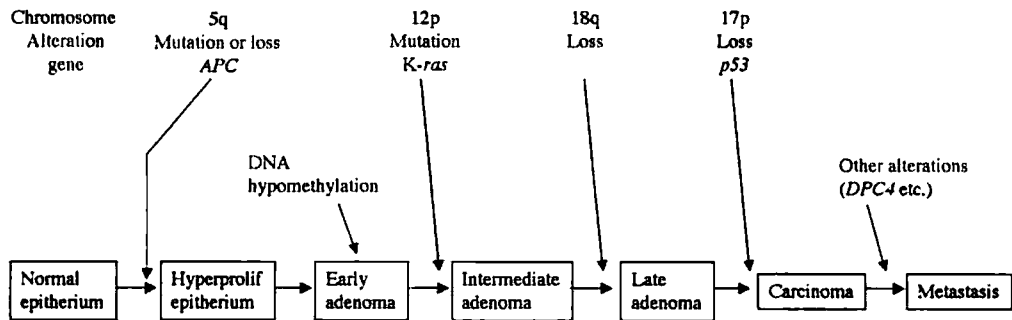
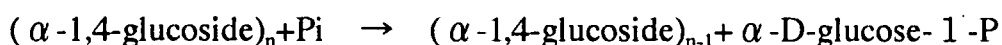


図 1 adenoma-carcinoma sequence (Fearon ER et al., 1990を改変)

glycogen phosphorylase (GP) (1,4  $\alpha$ -D-glucan : orthophosphate  $\alpha$ -D-glucosyltransferase, E.C.2.4.1.1)は嫌氣的解糖系の主役を担う重要な酵素である。1936年に発見され (Cori, et al., 1936)、1956年にこの酵素の活性/不活性型の変換が phosphorylase b kinase/phosphorylase phosphatase によるリン酸化/脱リン酸化であることが世界で初めて明かとなった (Krebs, et al., 1956)。Fischer と Krebs はこの生体制御機構としての可逆的タンパク質リン酸化の発見という功績によってノーベル医学賞を

1992年に受賞した。これまで主に、家兎の筋肉を用いた研究でその構造や作用が明らかにされてきており、歴史的にみて最も注意深く研究されてきた蛋白の一つと言える。

GPは次の反応を触媒する。



この酵素はグリコーゲンの1、4結合の加リン酸分解に特異的で、グルコース1-リン酸を生成し、グリコーゲン分解の律速段階となっている。グリコーゲンの生体での存在から、GPは体内では肝や筋肉に多く存在するが、その他の組織にも広く存在が認められる。この反応は図2に示すようにリン酸化された活性型のホスホリラーゼaによって促進されるが、脱リン酸化された不活性型のホスホリラーゼbでは一般に促進されない。グリコーゲン代謝は主にGPとグリコーゲンシンセターゼによって調節されている。その調節機構はこれらの酵素自身がアロステリックな機構で調節されたり、リン酸化や脱リン酸化による修飾などの一連の複雑な反応によって調節されている。cAMPを經由する調節では、エピネフリンなどの作用で生じたcAMPがcAMP依存性プロテインキナーゼを活性化し、ホスホリラーゼキナーゼが活性型のホスホリラーゼaキナーゼとなり、このリン酸化作用でGPをホスホリラーゼaへと活性する。筋肉の収縮がおこると、Ca<sup>2+</sup>によりホスホリラーゼキナーゼが活性化されることによるホスホリラーゼの急速な活性化がおこり、筋肉中のグリコーゲン分解が数百倍に増大する。Takeuchiら (Takeuchi, et al., 1955) は、酵素組織学的手法を用いて、このGP活性の局在を組織内や細胞内で同定できることを示した。さらに、筋肉や肝臓等のように生理的な存在が証明される以外にも、胎児やある種の癌組織に強いGP活性があることが明らかにされた (Takeuchi, et al., 1955; Shimada, et al., 1984; Takashi, et al., 1989; Hashimoto, et al., 1995)。

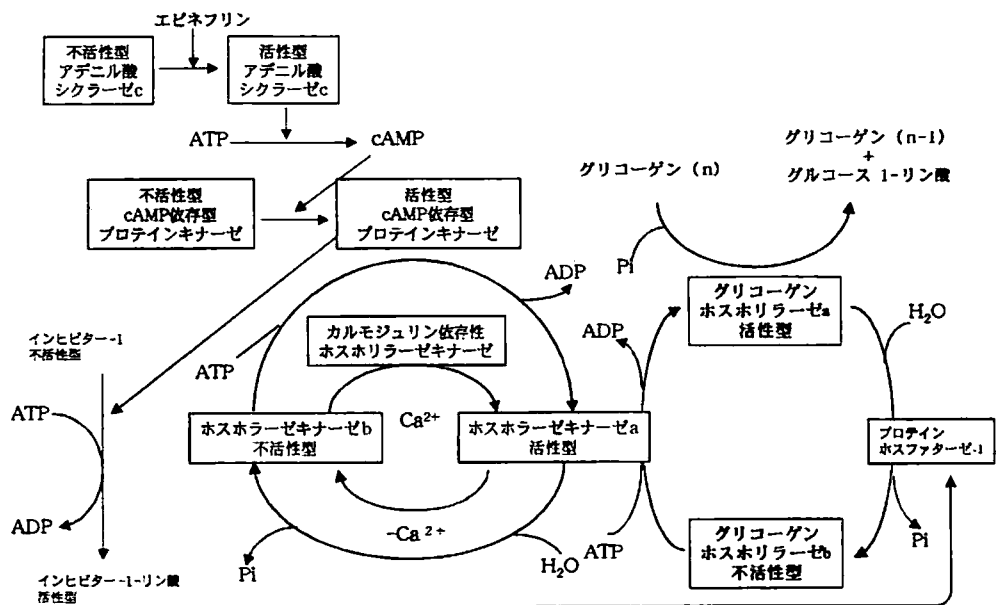


図2 ホスホリラーゼの機能とその調節

哺乳類においては、GP アイソザイムの存在が見い出されている (Nakano, et al., 1986; Newgard, et al., 1986; Burke, et al., 1987; Newgard, et al., 1988)。その主なものは、筋型 (muscle-type)、肝型 (liver-type)、脳型 (brain-type) (BGP) である。胎児ラットでは BGP が優位に発現しているが、筋肉および肝臓では胎生期に優位であった brain-type は成長とともにそれぞれ muscle-type、liver-type に置き換わってゆく。Sato ら (Sato, et al., 1972) は BGP は胎児に優位であるが癌腫においても発現することから、BGP を胎児型 (fetal-type) と呼んでいる。

近年の生化学的実験手法の発展により表 1 に示すようにこれらのアイソザイムのアミノ酸配列や cDNA 配列が明らかになった (Nakano, et al., 1986; Newgard, et al., 1988; 1989; Gelinias, et al., 1989)。また、それらの cDNA の存在するクロモソームの違いも明らかとなり、muscle-type GP、liver-type GP、BGP はそれぞれ 11 番、14 番、20 番染色体上にあることが示された (Newgard, et al., 1988)。

表1 グリコーゲンホスホリラーゼのアイソザイム

Isozyme	Physiological role	mRNA size	Gene mapping (chromosome)
Muscle-type	Rapid mobilization of metabolizable carbohydrate provides the energy for muscular function	3.2kB	11
Liver-type	Provides free glucose for extrahepatic tissues, regulates blood glucose	3.2kB	14
Brain-type	Provides glucose for short anoxic or hypoglycemic episodes	4.2kB	20

(Newgard CB et al., 1989)

教室ではこれまでに消化器癌、とくに胃癌における検討を行ってきた。胃粘膜においても胎生期に GP 活性が認められ生後は陰性となるが、胃癌組織では再び高率に GP 活性の発現があること、癌細胞の GP 活性には正常の筋や肝細胞におけるものとは違いがあることなどを明らかにしてきた (Maeno, et al., 1980; Shimada, et al., 1984)。また、GP アイソザイムの muscle-type GP、liver-type GP、BGP は免疫組織学的に区別して同定できることを示し (Shimada, et al., 1986)、胃癌に発現する GP は BGP であることや胃癌の前癌病変とされる腸上皮化生の一部に BGP を発現する興味深い増殖細胞群を指摘した (Shimada, et al., 1987; 1992)。さらに、136 例の胃癌ならびにその隣接する腸上皮化生について詳細な検討を行った。その結果、BGP は腸型胃癌に高頻度に発現しており、増殖細胞に BGP 陽性の腸上皮化生 (BGP-IM) は腸型胃癌と密接な関連性を認めた。また、腸上皮化生の増殖能ならびに癌遺伝子の発現を検討した結果、BGP-IM の増殖細胞群が有意に他の腸上皮化生よりも増殖能が強いこと、その一部のみ p53 蛋白の異常発現を認めることを明らかにした (Matsuzaki, et al., 1998)。従ってその

発生機構の違いから、われわれは BGP の発現によって容易に腸型胃癌と胃型胃癌を識別することが可能であることを示した(Shimada, et al., 2001)。さらに、最近、標準治療として頻繁に行われている早期胃癌局所療法において臨床的に重要な問題となっている残胃再発の問題点を、残胃から内視鏡的に生検を行い、BGP-IM の出現によって異時性再発の予測を行うことで解決できる可能性を示し(Shimada, et al., 2002)、反響を呼んでいる。

このような結果をもとに、われわれはさらに大腸癌の発癌機構に関する研究を行った。そして、ACS における BGP の発現は、p53 蛋白の過剰発現する以前に腺腫細胞の細胞異型度ならびに構造異型度と非常によく相関するので、強い malignant potential を持っていないながら形態的变化のない前癌病変のマーカーにもなり得る可能性を示し (Tashima, et al., 2000)、実際、'de novo' 型大腸癌の隣接正常粘膜に興味ある BGP 陽性の増殖細胞を含む大腸粘膜 (BGP foci)を見だし、'de novo' 型大腸癌と同等の p53 遺伝子変異をもつことを明らかにした (Shimada, et al., 2001)。このことは肉眼的な前癌病変がないとされる'de novo' 型大腸癌の発癌機構の解明に貢献する可能性を示唆するものであった。

本研究の目的は、'de novo' 型大腸癌の前癌病変として可能性の高い BGP foci に注目し、その一連の APC、K-ras、p53 遺伝子変化を詳細に検索し、BGP foci と'de novo' 型大腸癌の遺伝子変化を比較・解析したうえで、不明な点が山積している'de novo' 型大腸癌の発癌メカニズムを明らかにすること、である。

## 第 2 章

### 材料と実験方法

#### 1) 組織

当教室で切除した大腸癌 168 例の切除標本を 10%ホルマリン緩衝液中で 4 日間浸透し、50mmX10mm に分割、パラフィン包埋の後、薄切連続切片を作製した。腺腫成分を有さない粘膜下層または表層の固有筋層（表層から 1 / 3 まで）に浸潤し、p53 蛋白の過剰発現を認める 'de novo' 型大腸癌 28 症例を対象とした。免疫組織学的検討のため 3  $\mu$ m の連続切片を 3 枚ずつ、DNA 抽出のため 8  $\mu$ m の連続切片を 10 枚ずつ切り出し以下の検討に用いた。

#### 2) 抗体

抗 BGP 抗体の作成に関しては、Ignacio らの方法(Ignacio, et al., 1990) を改変しておこなった。まず BGP に特異的な合成ペプチド (CDLQIPPPNIPRD) を作成した。これは BGP に特異的な 12 残基の C 端側に cysteine を結合させたもので、この合成ペプチドが liver-type および muscle-type GP のみならず他の蛋白との一次構造上の相同性がないことを、GENE WORKS (Intelli Genetics, Mountain View, CA, USA) ホモロジーサーチにて確認した。ペプチドの cysteine は活性化 keyhole limpet hemocyanin (KLH) (PIERCE, Rockford, IL, USA) と結合させた。免疫動物は成体家兎を用い、100  $\mu$ g の KLH ペプチドを Freund の完全および不完全アジュバントとともに 1 週間隔で 4 回皮下注して免疫した。最終投与の 1 週間後、同量の KLH ペプチドのみを皮下注しブーストした。1 週間後、頸静脈から採血した。集められた抗血清 (約 100ml) の



IgG 分画は $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50%液)を加え沈降させ、100ml の phosphate buffered saline(PBS)に溶解し、透析を行った。IgG 分画の一部 (2ml) を免疫原に用いた BGP ペプチドを結合させた Sepharose (1mg BGP ペプチド/1ml Hi Trap NHS 活性化 Sepharose; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) のカラムに室温で 0.5ml/min の流速で充填した。カラムはバッファーA とバッファーB で洗浄し、結合している抗体は 0.1mol/L glycine-hydrochloric acid buffer (pH 2.5; 1mol/L NaCl 含有) で溶出した。抗体の含まれる分画は 280nm の波長で吸光度を測定した後、ただちに 1mol/L の sodium hydroxide で中和し、PBS で透析した。作成した抗 BGP 抗体は Western blot 法にて特異性を確認した。抗 p53 抗体 (BP53.12) は ZYMED Laboratory 社 (San Francisco, CA, USA)を用いた。

バッファーA ;	0.5mol/L monoethanolamine 0.5mol/L sodium chloride , pH 8.3
バッファーB ;	0.1mol/L acetate buffer 0.5mol/L sodium chloride, pH 4.0

### 3) Western blot 法

細胞のペレットと組織は 10mmol/L tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride (Tris-HCl; pH7.2)/0.2mmol/L calcium chloride 液中に入れ、氷上で 3 分間ホモジナイズした後、UCD200G (COSMO BIO, Tokyo, Japan) を用い超音波処理した。その後 10,000 g で 10 分間遠心し、その上清を採取した。このタンパクの濃度は Lowry 法 (Lowry, et al., 1951) を用いて測定した。試料はタンパク量として 60 $\mu$ g を使用した。sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) サンプル緩衝液で希釈し、5%~10%の濃度勾配の SDS-PAGE を用いて解析した。電気泳動の後、タンパクは polyvinylidene difluoride filter membrane (0.45- $\mu$ m pore size) に室温で 2 時間かけてメンブレンにトランスファーした。5% bovine serum albumin (BSA) PBS 溶液で処理した後、0.05%

polysorbate 20 を含有する PBS 溶液で洗浄した。そして  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度の抗 BGP 抗体溶液と室温で 2 時間反応した。その後 ECL Western Blotting Kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いてタンパクを同定した。このプロトコールではビオチン化 2 次抗体を 3,000 倍希釈して用いた。

SDS-PAGE サンプル緩衝液；

0.125mol/L Tris-HCL 液, pH6.8

4% SDS

20% glycerol

0.025% bromophenol blue

#### 4) 免疫組織染色

免疫組織染色は BGP は ABC Elite kits (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA) for rabbit IgG を用い、p53 は ABC Elite kits for mouse IgG を用いた。組織はホルマリン固定したのちパラフィンに包埋し、ミクロトーム操作にて  $3\mu\text{m}$  の切片を作製した。切片は十分乾燥後、キシレン 10 分間、3 回浸透、脱パラフィン操作の後 100%、90%、80%、70%、50%のエタノール液に 15 秒間浸透し、親水操作を行った。0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  のエタノール液に 30 分間浸透して内因性ペルオキシダーゼ活性のブロッキングを行い、正常ウマ血清でブロッキングの後、1 次抗体を滴下し湿潤箱中に  $4^\circ\text{C}$  で一晩静置した。ビオチン化抗体と室温で 30 分間反応させ、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体と室温で 30 分間反応させた。それぞれのインキュベーション間は 10mmol/L PBS 溶液 (pH7.2) で洗浄した。発色反応は DAB (diaminobenzidine) 法で行った。カウンター染色は Mayer's hematoxylin を用いた。p53 の染色においては heat antigen retrieval 法 (Shi, et al., 1991) を用い抗原性を高めた。すなわち切片を内因性のペルオキシダーゼ活性ブロッキングの後、 $90^\circ\text{C}$  のクエン酸緩衝液に 30 分間浸透し、上記の免疫反応を行った。1 次抗体は 1%BSA/PBS 緩衝液にて抗 BGP 抗体を  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈して行った。

抗 p53 抗体は原液を使用した。陰性対照として非免疫正常家兎およびマウスの IgG2a を 1 次抗体として用い同様の染色を行った。さらに作成した BGP 抗体の特異性を確認するために、抗 BGP 抗体 1  $\mu$ g/ml を 500ng/mL の BGP 合成ペプチドと 37°C で 1 時間反応し、10,000 g 1 時間遠心して免疫沈降させ、その上清を 1 次抗体に代わり用いた。

#### PBS 緩衝液

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O	64.54g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	9.00g
NaCl	160.00g
蒸留水 (イオン交換水)	20L

#### クエン酸緩衝液

0.1M citric acid	9mL
0.1M sodium citrate	41mL
蒸留水	450mL

### 5) 染色の評価

染色した切片は弱拡大で全体を検鏡し、10 視野中の陽性細胞数の割合で分類した。検鏡は 3 人の検者がそれぞれ行った。すなわち (-) は陽性細胞がないものあるいはその割合が 10% に満たないもの。(1+) はその割合が 10~25% のもの。(2+) はその割合が 25~60% のもの。(3+) はその割合が 60% 以上のものとし、陽性細胞が 10% 以上のものを陽性と判定した。

### 6) micro-dissection

抗 BGP 抗体を用いた免疫染色をもとに、癌組織、BGP foci および BGP 陰性正常粘膜をパラフィン切片から切り出した (図 5B)。切片は免疫染色した切片の連続切片を 8  $\mu$ m の厚さに薄切し、10 枚の切片からそ

それぞれの部分の腺管を顕微鏡下に確認しながら削り出した。組織間の contamination を避けるために、BGP 陰性正常粘膜、BGP foci、BGP 陽性癌組織の順に削りだし、それぞれの採取には新しい針を用いた。採取したパラフィンからの DNA の抽出は Sambrook ら (Sambrook, et al., 1992)の方法をもとにして Proteinase K で処理後、フェノール/クロロホルム法を用いた。

## 7) プライマー

PCR (polymerase chain reaction) のための合成オリゴヌクレオチドの配列は、既知の *p53* 遺伝子 exon 5 から 8 をもとに以下の様に設定した。

EX-05f: 5'-TCTGTCTCCCTTCCTCTTCCT-3'  
EX-05r: 5'-TCTCCAGCCCCAGCTGCT-3'  
EX-F05r: F-5'-TCTCCAGCCCCAGCTGCT-3'  
EX-06f: 5'-TGATTCCTCACTGATTGCTCT-3'  
EX-06r: 5'-GAGACCCCAGTTGCCA-AACC-3'  
EX-F06r: F-5'-GAGACCCCAGTTGCCAAACC-3'  
EX-07f: 5'-TCTTGGGCCTGTGTTATCTC-3'  
EX-07r: 5'-AGGGTGGCAAGTGGCTCC-3'  
EX-F07r: F-5'-AGGGTGGCAAGTGGCTCC-3'  
EX-08f: 5'-GCTTCTCTTTTCCTATCCTGA-3'  
EX-08r: 5'-CGCTTCTTGTCTGCTTGC-3'  
EX-F08r: F-5'-CGCTTCTTGTCTGCTTGC-3'

各プライマーの数字は PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)と fluorescence-based PCR-SSCP (PCR-FSSCP) 解析時の *p53* 遺伝子の exon ナンバーを示している。'f' と 'r' はそれぞれ forward と reverse primer を表している。reverse primer は 5'末端を Fluore prime 法 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)を用いて fluorescein derivatives でラ

ベルした。 'F' は 5'末端にリン酸と linker を介して結合する carboxyfluorescein を示している。

K-*ras* 遺伝子の codon 12 における変異を解析するための PCR-SSCP 時のプライマーとして以下の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

K1203f: 5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGT-3'

K1204r: 5'-CATGAAAATGGTCAGAGAAACC-3'

'f' と 'r' はそれぞれ forward と reverse primer を表している。

APC 遺伝子の変異は、散在性大腸癌の 80%以上が、MCR に集中しており (Miyosi, et al., 1992; Be'roud, et al., 1996)、MCR を全て含む exon 15 の codon 1251-1536 を増幅させるプライマーとして以下の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

MCR1f: 5'-ACTTATTGTGTAGAAAGATACTC-3',

MCR1r: 5'-GTGACACTGCTGGAACTTC-3',

MCRF1r: F-5'-GTGACACTGCTGGAACTTC-3'

MCR2f: 5'-TCAGCTGAAGATCCTGTCAGC-3',

MCR2r: 5'-GGGTGTCTGAGCACCCT-3',

MCRF2r: F-5'-GGGTGTCTGAGCACCCT-3'

MCR3f: 5'-GAATCAGCCAGGCACAAAG-3',

MCR3r: 5'-ATGGTTCACCTCTGAACGGA-3',

MCRF3r: F-5'-ATGGTTCACCTCTGAACGGA-3'

MCR4f: 5'-TCTGTCAGTTCACCTTGATAG-3',

MCR4r: 5'-AGGTACTTCTCGCTTGGTTT-3',

MCRF4r: F-5'-AGGTACTTCTCGCTTGGTTT-3'

MCR5f: 5'-AAACCAAGCGAGAAGTACCT-3',

MCR5r: 5'-TATCAGCATCTGGAAGAACC-3',

MCRF5r: F-5'-TATCAGCATCTGGAAGAACC-3',

MCR6f: 5'-GGTTCTTCCAGATGCTGATA-3',

MCR6r: 5'-CATTTGATTCTTTAGGCTGC-3' and

MCRF6r: F-5'-CATTTGATTCTTTAGGCTGC-3'.

'F' と 'r' はそれぞれ forward と reverse primer を表している。reverse primer は 5'末端を Fluore prime 法 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いて fluorescein derivatives でラベルした。'F' は 5'末端にリン酸と linker を介して結合する carboxyfluorescein を示している。

## 8) PCR-SSCP 法

各サンプルの genomic DNA 100ng は 1  $\mu$ M 濃度の プライマーと 100  $\mu$ M 濃度の dATP、dCTP、dGTP、TTP および 0.125 単位の Amplitaq (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) ならびに添付の buffer を加え総量 50  $\mu$ l とし PCR 反応にて増幅した。全ての PCR 反応は Robo-Cycler<sup>TM</sup> (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA)で行った。PCR の反応条件を以下に示す。

step 1 : 95°C 60 秒

step 2 : 58°C 90 秒

step 3 : 72°C 90 秒

step 1-3 までを 40 サイクル繰り返す。

step 4 : 72°C 15 分

10  $\mu$ l の PCR 産物は 20mM EDTA、96% formamide、0.05% bromophenol blue および 0.05% xylene cyanol を含む buffer で 2 倍に希釈したのち、95°C で 5 分間、氷上 5 分間静置した。各サンプル 10  $\mu$ l ずつを 7.5% neutral small polyacrylamide gel (8 cm X 9 cm) にアプライし、5 V/cm

の条件で 3~4 時間電気泳動した。ゲルは ethidium bromide で染色し UV light 下にバンドを検出した。

## 9) PCR-FSSCP 法

各サンプルの genomic DNA 100ng を reverse primers として 5' 末端を fluorescein でラベルしたプライマーを用いて、上記の割合で混合し PCR 反応を行った。PCR 産物は stop solution (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) で 50 倍に希釈し、95℃で 5 分間、氷上 5 分間静置した。このうち 4  $\mu$ l を FSSCP gel にアプライした。

### FSSCP gels

7% polyacrylamide gel

5% glycerol

解析には ALF II automated DNA sequencer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いた。30 W でゲルの温度を 25℃に保ちながら 3~ 4 時間電気泳動した。

## 10) クローニング法および DNA sequencing

EX-05f/EX-05r 、 EX-06f/EX-06r 、 EX-07f/EX-07r 、 EX-08f/EX-08r 、 MCR1f/ MCR1r 、 MCR2f/ MCR2r 、 MCR3f/ MCR3r 、 MCR4f/ MCR4r 、 MCR5f/ MCR5r および MCR6f/ MCR6r のプライマーを用いて、上記のように PCR を行った。T4 DNA ligase (Takara Shuzo, Tokyo, Japan) を用いて、クローニングベクター pCR II<sup>TM</sup> cloning vector (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) の TA クローニング部位に挿入し、PCR 産物のクローニングを行った。TB (Terrific Broth, USA) medium にて培養し、約 20 個のクローンを選択し、EX-05f/ EX-F05r 、 EX-06f/ EX-F06r 、 EX-07f/

EX-F07r 、 EX-08f/ EX-F08r 、 MCR1f/ MCRF1r 、 MCR2f/ MCRF2r 、 MCR3f/ MCRF3r、 MCR4f/ MCRF4r、 MCR5f/ MCRF5r または MCR6f/ MCRF6r のプライマーを用いて増幅させ、PCR-FSSCP 法を行い変異ピークを示すクローンを選択し、M13 primers を用いて、サイクルシーケンスにより塩基配列を決定した。ALF II automated DNA sequencer analyzer を用いて解析を行った。polymorphism を除外するため、同症例より正常組織の genomic DNA のシーケンスを行った。



### 第3章

### 結果

#### 1) 抗 BGP 抗体の特異性

ヒト astrocytoma 細胞株の U251、筋肉組織、肝組織、ヒト胃癌細胞株の AGS と AZ521 よりタンパクを抽出し、60  $\mu$ g を泳動し、Western blot 法により作成した抗 BGP 抗体の特異性を確認した。

図 3 に示すように U251 およびヒト胃癌細胞株 AGS のみに予測された分子量の約 100 kD にバンドが検出されたが、他のレーンには全く検出されなかった。酵素組織・細胞化学的な GP 活性反応は、U251、筋肉組織、肝臓組織、ヒト胃癌細胞株 AGS に認め、AZ521 では陰性であった。また、作成した BGP 抗体を免疫したペプチドで吸収したもので免疫染色をおこなうと、BGP 染色性のあった部位が消失した (図 4C)。このことから作成した抗 BGP 抗体は BGP に特異的であり、胃癌細胞に発現する活性を持った GP は BGP であることが確認された。

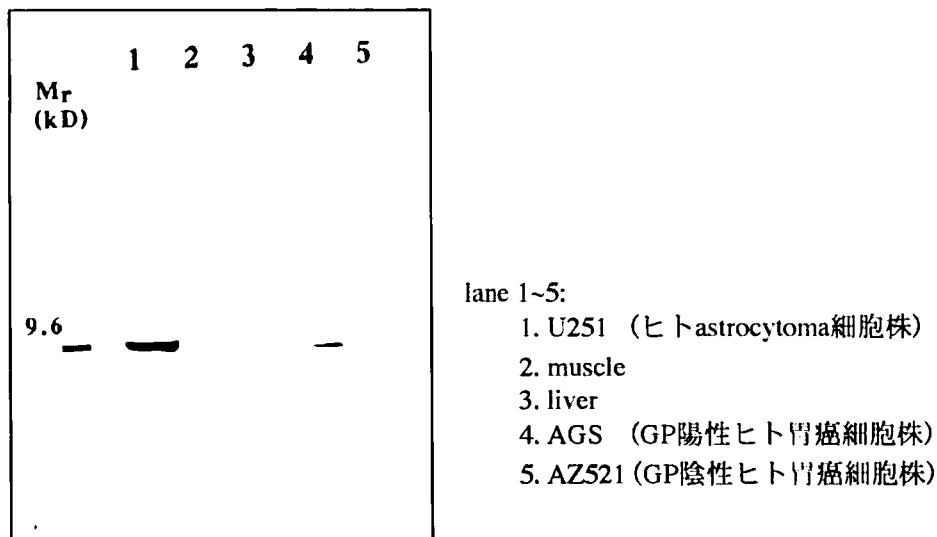
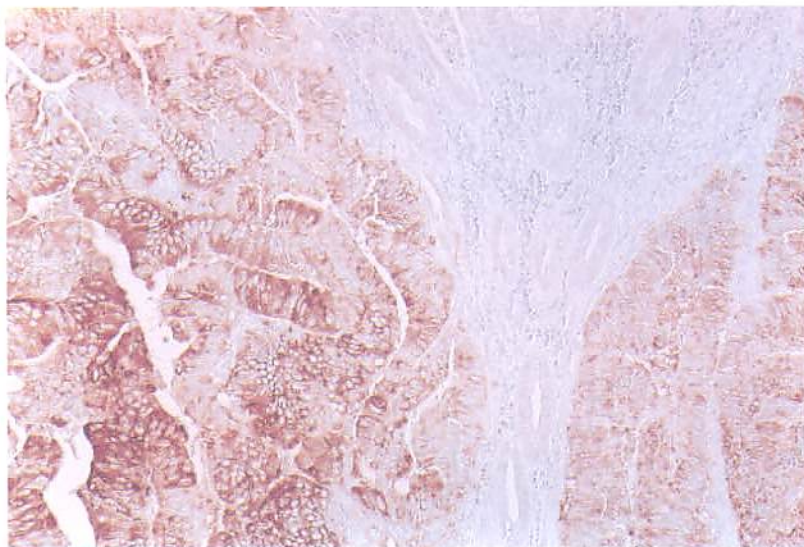


図3 抗BGP抗体を用いたWestern blotによる解析

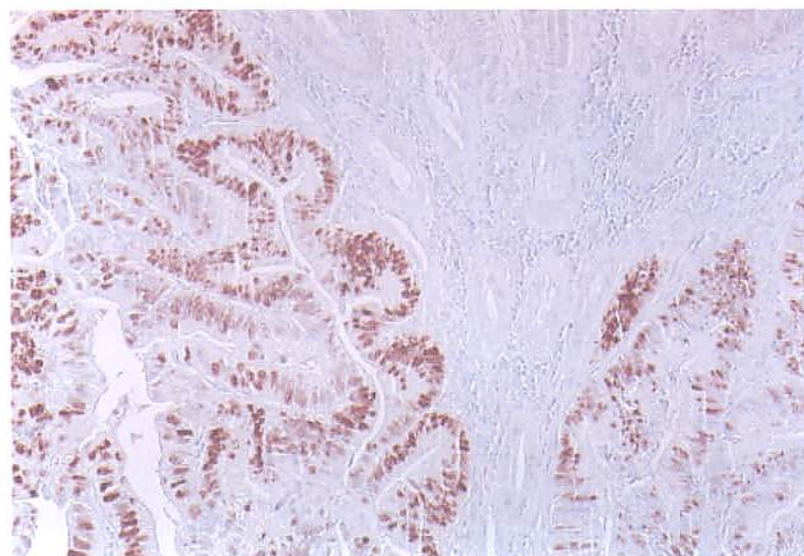
## 2) 'de novo' 型大腸癌と BGP foci における BGP の発現

この特異的 BGP 抗体を用いた 'de novo' 型大腸癌における BGP 染色ならびに p53 蛋白の過剰発現を図 4A、4B に示した。p53 蛋白の過剰発現のある 'de novo' 型大腸癌において全症例に細胞質に強い BGP の発現を認めた。癌病巣から離れた正常大腸粘膜には BGP の染色は全く認められなかったが、'de novo' 型大腸癌病巣近傍に散在する BGP 陽性の増殖細胞を含む大腸粘膜、すなわち BGP foci、は全症例に存在した。その BGP foci を図 5A に示した。BGP foci における染色性は増殖帯のみならず、しばしば被蓋上皮にも認めた。また BGP 陰性大腸粘膜と比較し、BGP foci は Filipe らが指摘している "transitional mucosa" (Filipe, et al., 1974) に特徴的なクリプトの延長や過形成粘膜を認めたが、BGP 陰性大腸粘膜と同様に異型などの明らかな形態的変化はなかった。BGP foci の定量的解析を行ったところ、1 切片あたりの個数は平均  $3.8 \pm 2.6$  個、平均径は  $2.7 \pm 1.8$  mm、癌病巣からの平均距離は  $20.3 \pm 19.5$  mm であった。

A



B



C

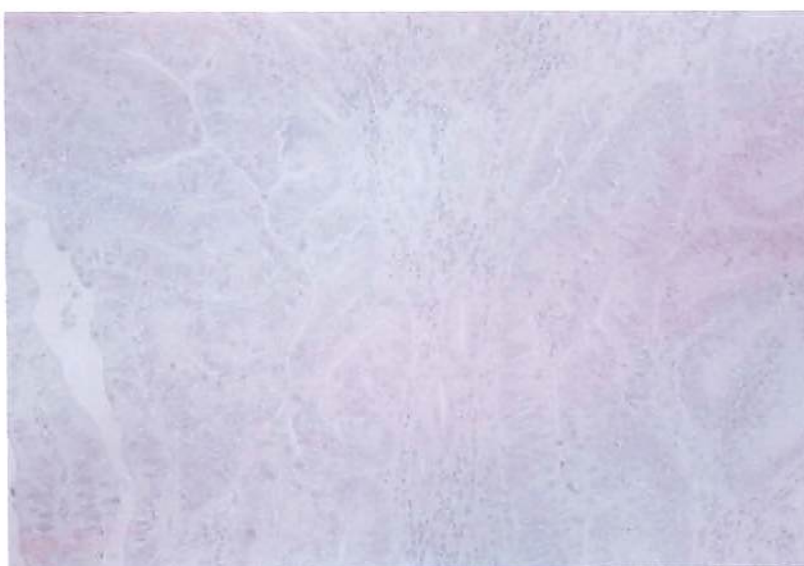
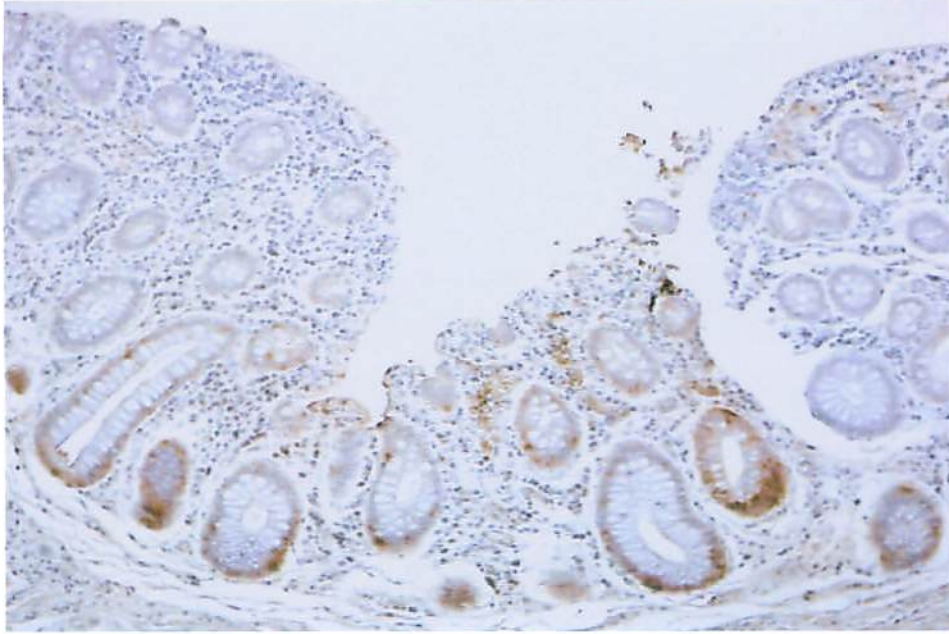


図 4 大腸癌における免疫組織染色  
A: 抗BGP抗体  
B: 抗p53抗体  
C: BGP抗体免疫沈降後上清

A



B

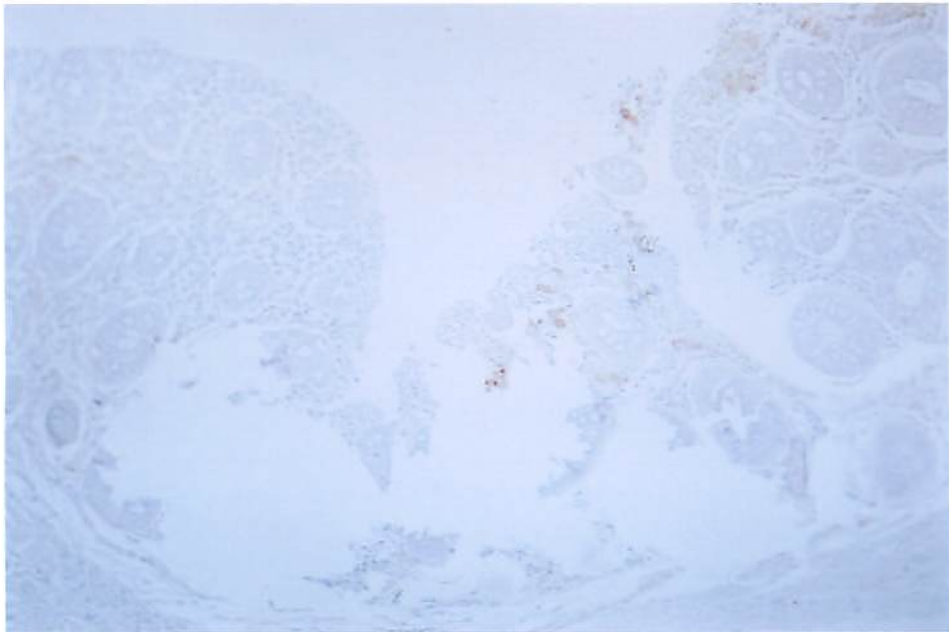


図 5 癌病巣周囲正常大腸粘膜におけるBGP陽性巣

A: 抗BGP抗体免疫染色

B: microdissection

### 3) 'de novo' 型大腸癌と BGP foci の遺伝子変異

'de novo' 型大腸癌と BGP foci の遺伝子変異を表 2 にまとめた。

*K-ras* 遺伝子の codon12 における変異は、'de novo' 型大腸癌病巣、BGP foci および BGP 陰性大腸粘膜のいずれにおいても認めなかった。

一方、*p53* 遺伝子の変異は 'de novo' 型大腸癌病巣において 28 例中 14 例 (50.0%) に検出した。BGP foci では *p53* 蛋白の過剰発現は認められなかったにも関わらず、*p53* 遺伝子の変異は 28 例中 11 例 (39.3%) で点遺伝子変異を同定できた (図 6)。BGP 陰性大腸粘膜においては *p53* 遺伝子の変異を検出できなかった。'de novo' 型大腸癌病巣で変異は、exon 5 に 5 例、exon 6 に 1 例、exon 7 に 3 例、exon 8 に 5 例検出した。BGP foci で変異を、exon 5 に 4 例、exon 6 に 2 例、exon 7 に 3 例、exon 8 に 2 例認めた。4 例で 'de novo' 型大腸癌病巣と BGP foci での変異遺伝子の exon が一致した。4 例では 'de novo' 型大腸癌病巣と BGP foci での変異遺伝子の exon が一致せず、3 例では BGP foci のみに、6 例では 'de novo' 型大腸癌病巣のみに変異を同定した。

*p53* 遺伝子の変異と同様に、比較的高頻度の *APC* 遺伝子の変異を 'de novo' 型大腸癌病巣において検出できた (図 7)。*APC* 遺伝子の変異は、'de novo' 型大腸癌病巣において 28 例中 9 例 (32.1%) に認められた。これに対して、BGP foci では *APC* 遺伝子の変異は 28 例中わずか 1 例 (3.6%) にしか認められなかった。BGP 陰性大腸粘膜においては *APC* 遺伝子の変異を検出できなかった。'de novo' 型大腸癌病巣での 9 例の変異のうち、7 例 (77.8%) は frame-shift であり、残り 2 例 (22.2%) は nonsense mutation であった。BGP foci の変異は frame-shift であった (表 2)。

Patient no.	Site	Tumor stage TMN/grade/Dukes'	P53 gene		APC gene	K-ras gene
			exon/codon/mutation		codon/mutation	
1 Ca BGP(+) BGP(-)	T	T2N0M0/I/A	5/145/CTG(Leu) to CAG(Gln) missense	1457/GCA(Ala) toGACA insertion	wild	
			8/299/CGG(Leu) to CGG(Arg) missense	1489/TTAT(Leu) to TAT deletion	wild	
			wild	wild	wild	
2 Ca BGP(+) BGP(-)	S	T2N1M0/III/C	5/163/TAC(Tyr)toTGC(Cys) missense	1295/GAAG(Glu) to GAG deletion	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
3 Ca BGP(+) BGP(-)	R	T1N0M0/I/A	wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
4 Ca BGP(+) BGP(-)	D	T2N0M0/I/A	7/258/GAA(Glu)toAAA(Lys) missense	1400/TCGA(Ser) to TGA deletion	wild	
			7/258/GAA(Glu)toAAA(Lys) missense	wild	wild	
			wild	wild	wild	
5 Ca BGP(+) BGP(-)	T	T1N0M0/I/A	wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
6 Ca BGP(+) BGP(-)	S	T1N0M0/I/A	7/238TGT(Cys)toTAT(Tyr) missense	wild	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
7 Ca BGP(+) BGP(-)	A	T2N0M0/I/A	5/NA	wild	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
8 Ca BGP(+) BGP(-)	R	T1N0M0/I/A	6/187/GGT(Gly) to GGC(Gly) silent	1270/TGTT(Cys) to TGT deletion	wild	
			6/189/GCC(Ala) to ACC(Thr) missense	wild	wild	
			wild	wild	wild	
9 Ca BGP(+) BGP(-)	D	T1N0M0/I/A	wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
10 Ca BGP(+) BGP(-)	A	T1N1M0/III/C	8/265/CTACTGGGA to CTACACTGGA 2bp insertion	1477/CAGA(Gln) to CAA deletion	wild	
			8/NA	wild	wild	
			wild	wild	wild	
11 Ca BGP(+) BGP(-)	S	T2N0M0/I/A	wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
12 Ca BGP(+) BGP(-)	S	T1N0M0/I/A	wild	1349/CAC(His) to GCAC insertion	wild	
			5/148/GAT(Asp)toAAT(Asn) missense	wild	wild	
			wild	wild	wild	
13 Ca BGP(+) BGP(-)	S	T2N0M0/I/A	wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	
14 Ca BGP(+) BGP(-)	D	T1N0M0/I/A	8/295/CCT(Pro)toCTCT insertion	1477CAG(Gln) to TAG(stop) nonsense	wild	
			wild	wild	wild	
			wild	wild	wild	

表2 BGP fociと'de novo'型大腸癌のp53とAPC遺伝子変異の解析(その1)



Patient no.	Site	Tumor stage TMN/grade/Dukes'	P53 gene		APC gene	K-ras gene
			exon/codon/mutation		codon/mutation	
15 Ca BGP(+) BGP(-)	A	T2N0M0/I/A	wild		wild	wild
			7/233/CAC(His)toCCAC insertion		wild	wild
			wild		wild	wild
16 Ca BGP(+) BGP(-)	S	T2N0M0/I/A	wild		wild	wild
			wild		wild	wild
			wild		wild	wild
17 Ca BGP(+) BGP(-)	C	T1N0M0/I/A	wild		wild	wild
			5/NA		wild	wild
			wild		wild	wild
18 Ca BGP(+) BGP(-)	R	T1N0M0/I/A	wild		wild	wild
			wild		wild	wild
			wild		wild	wild
19 Ca BGP(+) BGP(-)	A	T1N0M0/I/A	wild		wild	wild
			wild		wild	wild
			wild		wild	wild
20 Ca BGP(+) BGP(-)	R	T1N0M0/I/A	8/273/CGT(Arg)toCAT(His) missense		1474/GCT(Ala)toAGCT insertion	wild
			7/240/AGT(Ser)toATT(Ile) missense		wild	wild
			wild		wild	wild
21 Ca BGP(+) BGP(-)	S	T1N0M0/I/A	wild		wild	wild
			wild		wild	wild
			wild		wild	wild
22 Ca BGP(+) BGP(-)	S	T2N0M0/II/B	5/NA'		wild	wild
			5/NA		wild	wild
			wild		wild	wild
23 Ca BGP(+) BGP(-)	T	T1N0M0/I/A	8/273/CGT(Arg)toTGT(Cys) missense		wild	wild
			wild		wild	wild
			wild		wild	wild
24 Ca BGP(+) BGP(-)	A	T1N0M0/I/A	wild		wild	wild
			wild		wild	wild
			wild		wild	wild
25 Ca BGP(+) BGP(-)	A	T1N0M0/I/A	8/282/CGG(Arg) to TGG(Trp) missense		wild	wild
			5/NA		wild	wild
			wild		wild	wild
26 Ca BGP(+) BGP(-)	A	T2N0M0/I/A	wild		wild	wild
			wild		wild	wild
			wild		wild	wild
27 Ca BGP(+) BGP(-)	D	T2N0M0/I/A	7/248/CGG(Arg)toTGG(Trp) missense		1295/GAA(Glu)toTAA(stop) nonsense	wild
			6/199/GGA(Gly)toGGG(Gly) silent		wild	wild
			wild		wild	wild
28 Ca BGP(+) BGP(-)	R	T1N0M0/I/A	5/NA		wild	wild
			wild		wild	wild
			wild		wild	wild

' Ca, carcinoma; BGP(+), brain (fetal)-type glycogen phosphorylase (BGP) positive foci in the transitional mucosa; BGP(-), brain (fetal)-type glycogen phosphorylase (BGP) negative normal colorectal mucosa; NA, not available; C, caecum; A, ascending colon; T, transverse colon; D, descending colon; S, sigmoid colon; R, rectum

表2 BGP fociと'de novo'型大腸癌のp53とAPC遺伝子変異の解析(その2)

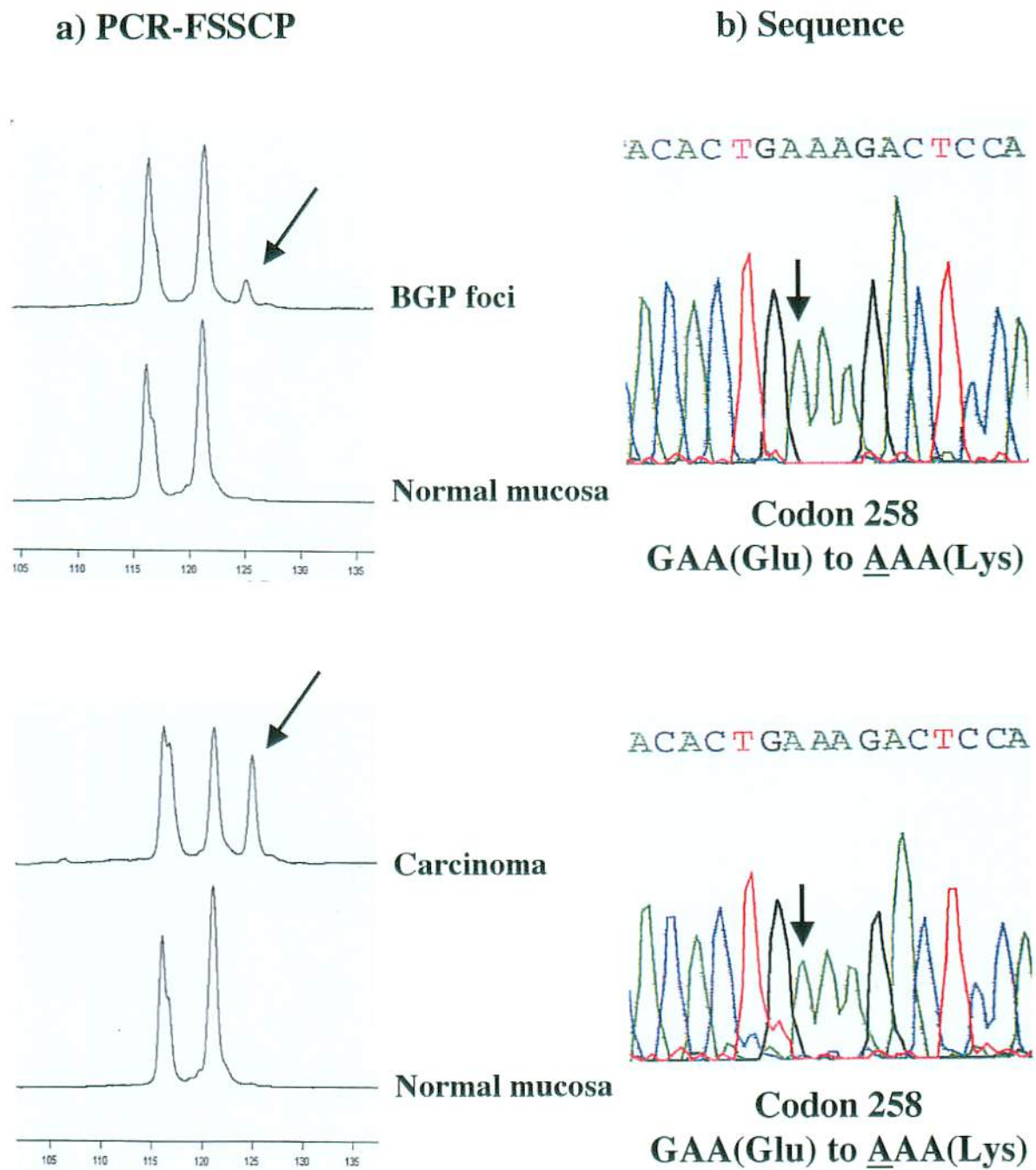
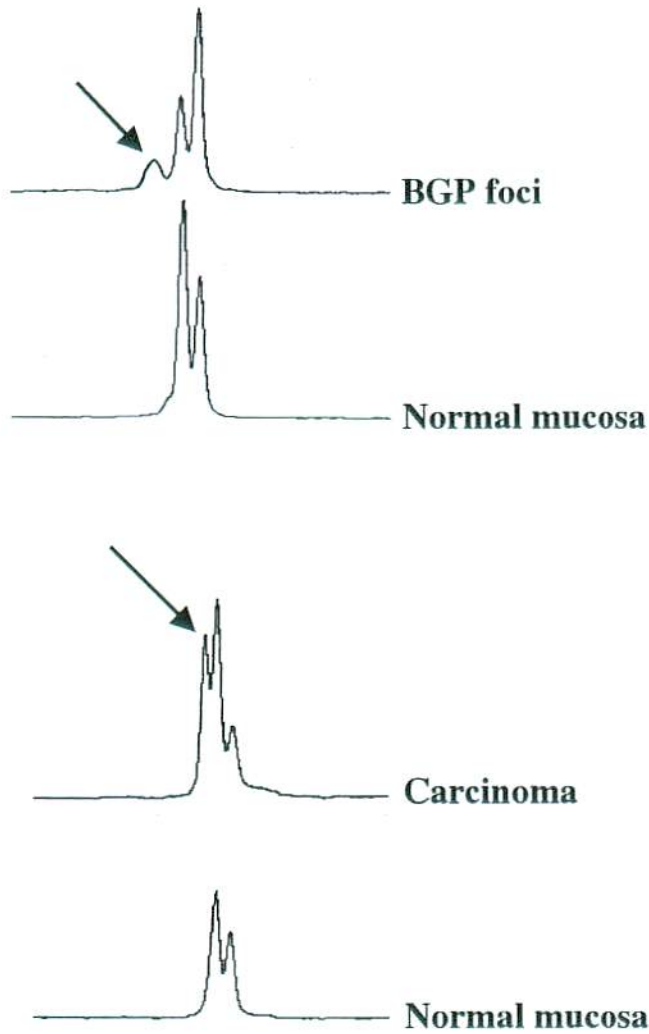


図6 BGP fociと'de novo'型大腸癌における  
p53遺伝子変異の検出



**a) PCR-FSSCP**



**b) Sequence**

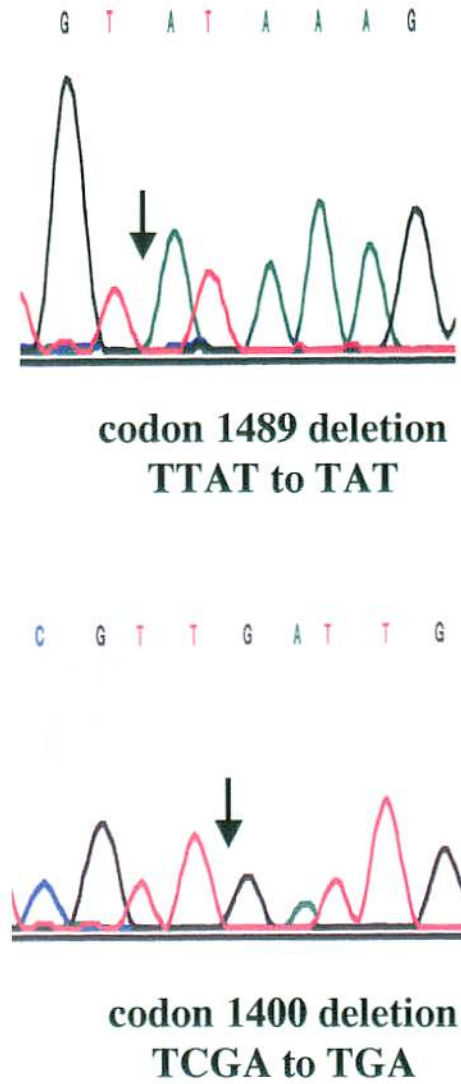


図7 BGP fociと'*de novo*'型大腸癌における  
*APC*遺伝子変異の検出

#### 4) 'de novo' 型大腸癌と BGP foci における p53 と APC の変異

##### 解析

'de novo' 型大腸癌と BGP foci における一連の p53 と APC 変異を解析し、表 3 にまとめた。'de novo' 型大腸癌において p53 遺伝子と APC 遺伝子の両方に変異を同定できた症例は 8 例 (28.6%)、p53 遺伝子の変異を同定できた症例は 6 例 (21.4%)、APC 遺伝子の変異を同定できた症例は 1 例 (3.6%) であった。BGP foci において p53 遺伝子と APC 遺伝子の両方に変異を認めた症例は 1 例 (3.6%)、p53 遺伝子の変異を認めた症例は 10 例 (35.7%) であったが、APC 遺伝子の変異を認めた症例はなかった。

p53/APC	+/+	+/-	-/+	-/-	sum of p53(+)	sum of APC(+)
carcinoma(%) (n=28)	8 (28.6)	6 (21.4)	1 (3.6)	13 (46.4)	14 (50.0)	9 (32.1)
BGP foci(%) (n=28)	1 (3.6)	10 (35.7)	0 (0)	17 (60.7)	11 (39.3)	1 (3.6)

表 3 BGP foci と 'de novo' 型大腸癌の p53 遺伝子と APC 遺伝子の変異

## 第4章

### 考 察

#### 1) 癌ならびに前癌病変における BGP 発現の意義

GP のアイソザイムのうち muscle-type は筋運動時のエネルギー源としての迅速なグルコース供給、liver-type は肝外組織へのグルコース供給と血糖のコントロールとしての意義が明確となっているが、BGP の場合、その脳における生理学的な発現の意義ですら十分に解明されていない。しかし、一般的に脳の緊急時におけるグルコースの動員に重要な働きをしているものではないかと考えられている (Newgard, et al., 1989)。その緊急時とはすなわち、脳の虚血状態を意味している。癌組織においてもその過増殖と虚血状態、それに伴う血管新生は周知のことであり、癌細胞内に発現する BGP の役割の一面を説明しているのかもしれない。ここで、胃・十二指腸潰瘍 (Shimada, et al., 1984) や大腸潰瘍の病巣や再生上皮 (Tashima et al., 2000) に BGP 発現が全く認められないことは、BGP が炎症や一般的な細胞増殖によって induction されるものではないことを示している。また、BGP は、hepatocellular carcinoma や fetal liver の組織から分離された GP と同一であり、'胎児型'(fetal-type)とも呼ぶことができる (Sato, et al., 1972; 1976)。従って、癌における BGP は、消化器癌における carcinoembryonic antigen(CEA) (Gold, et al., 1965) や肝癌における alfa-fetoprotein(AFP) (Kroes, et al., 1973) と同様に、癌組織における腫瘍性胎児抗原の発現のひとつとも考えられる。

これまでに ACS における BGP 発現を検討したが、腺腫の病理学的異型度の各ステップと正の相関をしめした。とくに、その発現率は moderate dysplasia から急激な上昇を示した (Tashima et al., 2000)。また

われわれは大腸腺腫における細胞構造異型度の特徴を電子顕微鏡を用いて検討した。その結果、ACS の超微細構造は mild dysplasia では正常粘膜と、moderate dysplasia では癌と細胞共通性を示すことが明らかとなった (Matsuda, et al., 1989) 。これらの結果から、ACS における BGP 発現は、腺腫細胞の細胞異型度ならびに構造異型度と非常によく相関することが示され、moderate dysplasia は癌細胞へ変化する重要なステップ (point of no return) であることが示唆される。従って、BGP の発現は ACS 発癌過程における腫瘍マーカーであるのみならず、強い malignant potential を持っていないながら形態的変化のない前癌病変のマーカー、すなわち point of no return の指標、にもなり得る可能性が示された。

## 2) 'de novo' 型大腸癌の前癌病変の候補としての BGP foci

現在、大腸癌発癌に関してはもう一つの経路、いわゆる 'de novo' 型が散発性大腸癌の主要な発癌機構として注目されてきている (Shimoda, et al., 1989; Minamoto, et al., 1994; Yamagata, et al., 1994; Mueller, et al., 1996) 。これは小さな早期大腸癌であるにもかかわらず全く腺腫の存在が認められないため、正常粘膜から直接発生したと考えるべき大腸癌が存在するためである。しかし、この研究は緒についたばかりであり、その発癌機構の殆どが明らかとなっていない。もし、'de novo' 型による発癌がかなりの散発性の大腸癌発生の機構であるならば、大腸癌の背景粘膜 (形態的には全くの正常大腸粘膜) に malignant transformation を起こしつつあるかなりの腺管が存在すると考えることは妥当と考えられる。大腸潰瘍にはその再生上皮にすら BGP 発現を全く認めないにもかかわらず、'de novo' 大腸癌周囲には形態的に正常大腸粘膜と変わらない BGP foci が複数存在した。これまでの ACS の検討から、BGP の発現は mild dysplasia に殆どなく moderate dysplasia から急激に発現することから、BGP foci の細胞群は形態的変化はないものの遺伝子的には moderate dysplasia と同等以上の悪性形質の変化を獲

得しているものと考えられる。“transitional mucosa”は大腸癌における発生母地の候補のひとつに挙げられている(Filipe et al.,1974)。BGP fociはこの“transitional mucosa”内に存在しており、またBGP fociの局在は発癌の場とされる増殖細胞帯(Ming et al.,1967; Nagayo et al.,1975; Oohara et al.,1982; Shimada et al.,1984; 1992; Matsuzaki et al.,1998)にあり、BGP fociはクリプトの延長・過形成粘膜を認めるものの、BGP陰性大腸正常粘膜と比べ著明な形態的变化をきたしていなかった。われわれが示したとおり、BGP fociにおいて、癌に匹敵する高頻度のp53遺伝子の変異を認めた。このことは、BGP fociはp53遺伝子の変異が生じ細胞増殖能が高まった状態であり、さらなる遺伝子変化によって、高度の細胞異型を突然生じるポテンシャルを持っており、'de novo'型発癌における初期変化とするに相応しいものであることが強く示唆される。

### 3) BGP foci と' de novo' 型大腸癌の癌遺伝子変化

本研究では' de novo' 型大腸癌の症例を選択し、BGP fociの癌遺伝子ならびに癌抑制遺伝子変化をK-ras、p53遺伝子にAPC遺伝子を加えてその一連のシーケンスを詳細に検討した。前回と同様に、' de novo' 型大腸癌病巣とBGP fociにはK-ras遺伝子の変異は同定されなかった。ACS過程における遺伝子変化はK-ras遺伝子の変異が生じ、腺腫の発達・増殖に寄与すると考えられており、またK-ras遺伝子の変異の約80%以上はcodon 12におきていると報告されている(Vogelstein et al., 1988)。しかし、' de novo' 型大腸癌発癌過程ではK-ras遺伝子の変異は非常に稀とされており、本研究結果もこれに見合うものであった。腺腫の発生に関与するAPC遺伝子の変異は翻訳領域の約10%に満たないcodon 1286から1514のMCRに約80%が集中しているといわれている(Be'roud et al., 1996; Miyoshi et al., 1992)。' de novo' 型大腸癌病巣におけるAPC遺伝子の変異は、諸家の報告によると35 - 42% (Aoki, et al., 1994; Olschwang, et al., 1998; Umetani, et al., 2000)とされているが、本研究結果はやや少ないながらも32.1%とこれに見合うものであった。一

方、BGP foci における APC 遺伝子の変異は、3.6%と殆ど変異を検出できなかった。これに対して、p53 遺伝子の MCR における変異は、BGP foci において約 40%と、'de novo' 型大腸癌病巣における変異 50%と較べて見劣りしない高頻度なものであった。

#### 4) BGP foci からみた'de novo' 型大腸癌発生のメカニズム

前癌病変を指摘することが困難な'de novo' 型大腸癌において、その初期変化とみなすことのできる特徴的な限局性粘膜(BGP foci)を初めて指摘し、BGP の発現をマーカーとして、1999 年に大腸癌発生に関するわれわれの考えを図 8 のように示した (Shimada, et al. 1999)。「de novo」型大腸癌の発癌機構について、衆目の集まる問題は、「de novo」型大腸癌においては p53 遺伝子の高頻度の変異以外に、APC 遺伝子の変異を 35 - 42 %にもおこしているにもかかわらず、腺腫形成をおこさないことである。そこで、われわれは、この仮説のなかで、BGP foci には高頻度の p53 遺伝子の変異をおこしていることから、「de novo」型大腸癌の発癌機構は先ず p53 遺伝子の変異をおこしたのちに、APC 遺伝子の変異をおこすので腺腫形成をしないのではないかと予想した。

今回の APC 遺伝子の変異を含めた一連の'de novo' 型大腸癌と BGP foci の詳細な解析で、表 3 に示すように、BGP foci には高頻度の p53 遺伝子の変異にもかかわらず APC 遺伝子の変異は殆どなく、一方、「de novo」型大腸癌においては双方の変異は高頻度であることより、予想したように、「'de novo' 型大腸癌における APC 遺伝子の変異は p53 遺伝子の変異に続発した晩期の遺伝子変化である」、とわれわれの検討から結論された。さらに、APC 遺伝子の変異が関与しない p53 遺伝子の変異による経路も存在することが明らかとなった (図 9)。

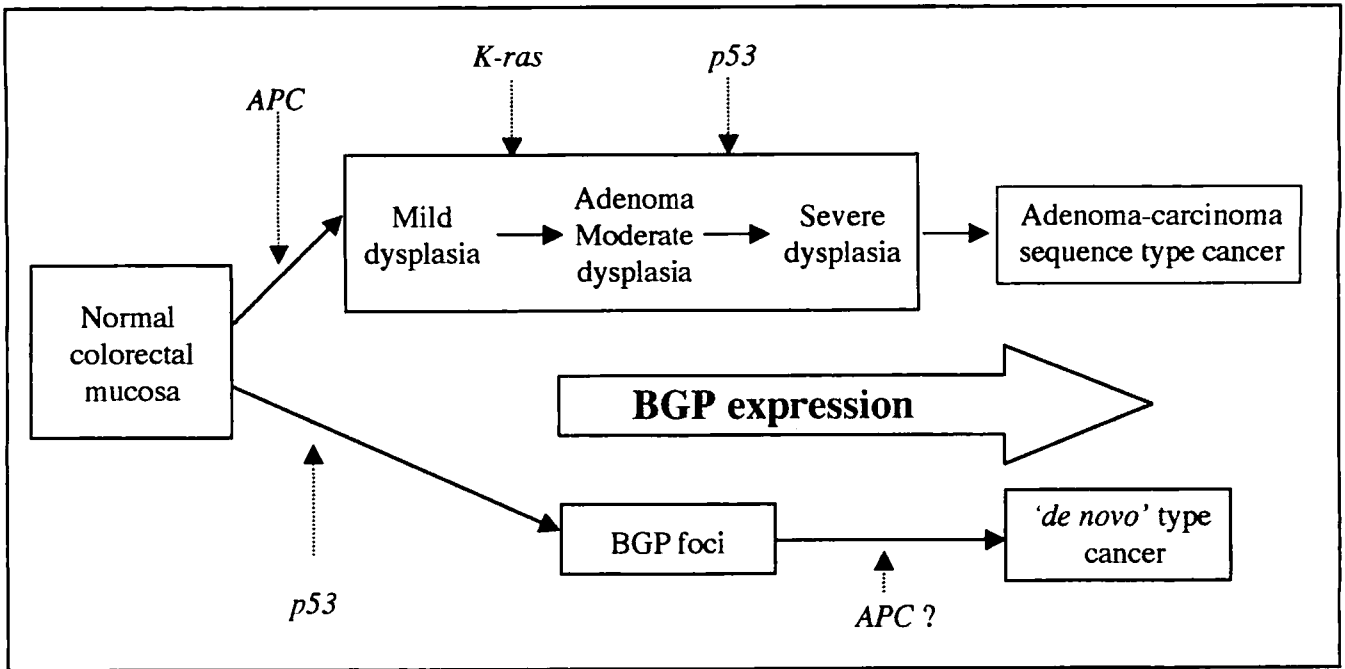


図8 ACSと‘de novo’型発癌 (Shimada et al. 1999)

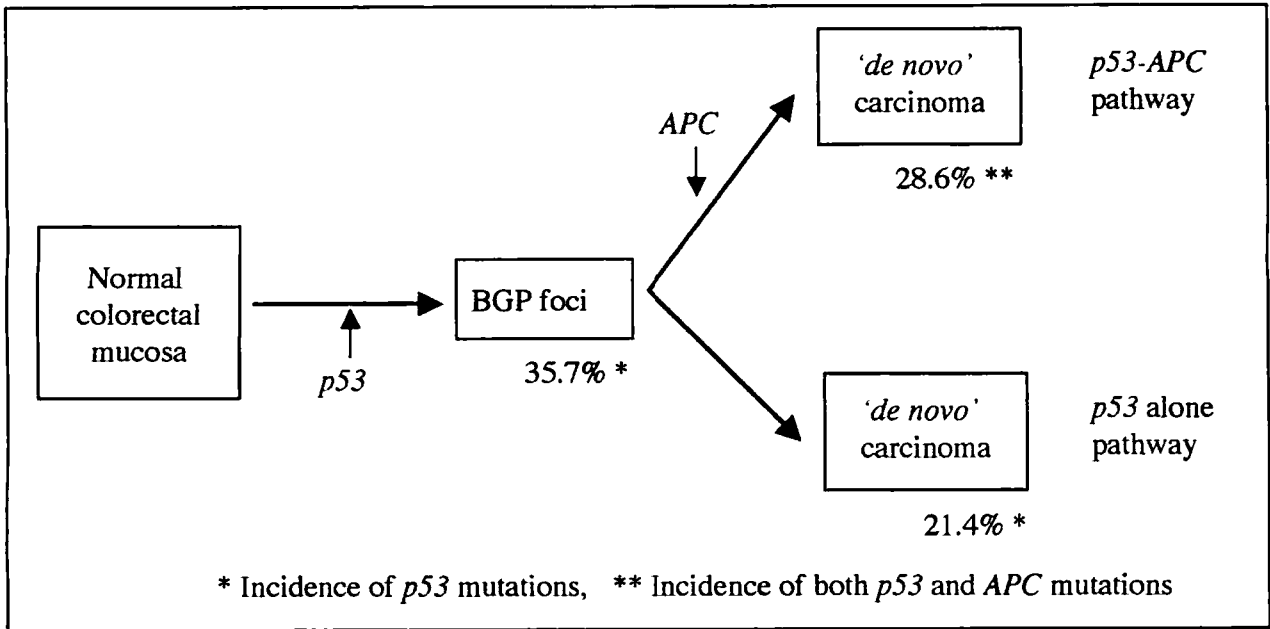


図9 BGP fociと‘de novo’型大腸癌のp53遺伝子と APC遺伝子変異の関係

## 第5章

### 結 論

癌発生のメカニズムを解明する上で、癌の初期病変（前癌病変）を把握することは必要不可欠である。本研究では、前癌状態が明かにされていない'*de novo*'型大腸癌において、その初期変化と見做すことのできる特徴的な限局性粘膜（BGP foci）を指摘した。さらに'*de novo*'型発癌のメカニズムには、1) *p53* 遺伝子の変異に *APC* 遺伝子の変異が続発して癌化する *p53-APC* 経路、2) *p53* 遺伝子の変異で癌化する *p53* 単独経路、の2つの主経路があることを示した。そして *APC* 遺伝子の変異は late event であり、そのことが腺腫を生じない理由であると結論した。



## 参考文献

Aoki T, Takeda S, Yanagisawa A, Kato Y, Ajioka Y, Watanabe H, Kudo S, Nakamura Y. *APC* and *p53* mutations in de novo colorectal adenocarcinomas. *Human Mutation* 1994;3:342-6.

Be'roud C, Soussi T. *APC* gene database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1996;24:121-4.

Burke J, Hwang PK, Gorin F, Lebo RV, Fletterick RJ. Intron/exon structure of the human gene for the muscle isozyme of glycogen phosphorylase. *Protein Structur Functio Genet* 1987;2:177

Cori CF, Cori GT. Mechanism and formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new phosphate ester. *Proc Soc Exp Biol Med* 1936;34:702-12.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67

Fearon ER, Jones PA. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J* 1992;6:2783-90.

Filipe MI, Cooke KB. Changes in composition of mucin in the mucosa adjacent to carcinoma of the colon as compared with the normal: a biochemical investigation. *J Clin Pathol* 1974;27: 315-8.

Fujimori T, Satonaka K, Yamamura-Idei Y, Nagasako K, Maeda S. Non-involvement of ras mutations in flat colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1994;57:51-5.

Gelinas RP, Froman BE, McElroy F, Tait RC, Gorin FA. Human brain glycogen phosphorylase: characterization of fetal cDNA and genomic sequence. *Mol Brain Res* 1989;6:177-85.

Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomas by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965;121:439.

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H. Identification and characterization of familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329: 1318-27.

Hasegawa H, Ueda M, Furukawa K, Watanabe M, Terumoto T, Mukai M, Kitajima M. *p53* gene mutations in early colorectal carcinoma, de novo vs. adenoma-carcinoma sequence. *Int J Cancer* 1995; 64:47-51.

Hashimoto K, Tamura K, Otani H, Tanaka O. Histochemical and

immunohistochemical studies related to the role of glycogen in human developing digestive organs.

Anat Embryol 1995;192:497-505.

Ignacio PC, Baldwin BA, Vijayan VK, Tait RC, Gorin FA. Brain isozyme of glycogen phosphorylase: immunohistochemical localization within the central nervous system.

Brain Res 1990;529:42-9.

Kastan MB, Onyekwerw O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of the p53 protein in the cellular response to DNA damage.

Cancer Res 1991;51:6304-11

Krebs EG, Fisher EH. The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle.

Biochim Biophys Acta 1956;20:150.

Kroes R, Williams GM, Weisburger JH. Early appearance of serum alpha-fetoprotein as a function of dosage of various hepatocarcinogens.

Cancer Res 1973;33:613-7.

Lane DP. P53: guardian of the genome.

Nature 1992;358:15-6.

Levine AJ. The p53 tumor-suppressor gene.

N Engl J Med 1992;326:1350-2

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J Biol Chem 1951;193:265-75.

Maeno M, Takagi K, Akagi M. Histochemical observations of polyglucose synthesized by enzyme activities in human gastric carcinoma.

Gastroenterol Jpn 1980;15:311-23.

Matsuda M, Misumi A, Shimada S, Nelson RL, Akagi M. Quantitative electron microscopic study on grades of atypia in adenomas of the human large bowel.

Dis Col & Rect 1989;32:57-63.

Matsuzaki H, Shimada S, Uno K, Tsuruta J, Ogawa M. Novel subtyping of intestinal metaplasia in the human stomach: brain-type glycogen phosphorylase expression in the proliferative zone and its relationship with carcinogenesis.

Am J Clin Pathol 1998;109:181-9.

Minamoto T, Sawaguchi K, Mai M, Yamashita N, Sugimura T, Esumi H. Infrequent *K-ras* activation in superficial-type (flat) colorectal adenomas and adenocarcinomas.

Cancer Res 1994;54:2841-4.

Ming SC, Goldman H, Freiman, DG. Intestinal metaplasia and histogenesis of carcinoma in human stomach.

Cancer 1967;20: 1418-29.

Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M, Maeda Y, Iwama T, Mishima Y, Mori T, Koike M. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors.

Cancer Res 1994;54:3011-20.

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene.

Hum Mol Genet 1992;1:229-33.

Morson BC. The polyp-cancer sequence in the large bowel.

Proc R Soc Med 1974;67:451-7.

Mueller J, Mueller E, Hoepner I, Jutting J, Betheke B, Stolte M, Hofler H. Expression of bcl-2 and p53 in de novo and ex-adenoma colon carcinoma: a comparative immunohistochemical study.

J Pathol 1996;180:259-65.

Nakano K, Hwang P, Fletterick RJ. Complete cDNA sequence for rabbit muscle glycogen phosphorylase.

FEBS Lett 1986;204:283-7.

Nagayo T. Microscopical cancer of the stomach; a study on histogenesis of gastric carcinoma.

Int J Cancer 1975;16: 52-60.

Newgard CB, Nakano K, Hwang PK, Fletterick RJ. Sequence analysis of the cDNA encoding human liver glycogen phosphorylase reveals tissue-specific codon usage.

Proc Natl Acad Sci 1986;83:8132-6.

Newgard CB, Littman DR, Genderen CV, Smith M, Fletterick RJ. Human

brain glycogen phosphorylase.

J Biol Chem 1988;263:3850-7.

Newgard CB, Hwang PK, Fletterick RJ. The family of glycogen phosphorylase: structure and function.

Crit Rev Biochem Mol Biol 1989;24:69-99.

Olschwang S, Slezak P, Roze M, Jaramillo E, Nakano H, Koizumi K, Rubio CA, Laurent-Puig P, Thomas G. Somaticly acquired genetic alterations in flat colorectal neoplasias.

Int J Cancer 1998;77:366-9.

Oohara T, Tohma H, Takezoe K, Ukawa S, Johjima Y, Asakura R, Ano G, Kurosawa H. Minute gastric cancers less than 5 mm in diameter. Cancer 1982;50: 801-10.

Polakis P, The adenomatous coli (APC) tumor suppresser.

Biochim Biophys Acta 1997;1332:127-47

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis.

Nature 1992;17: 235-37,.

Roa JC, Roa I, Melo A, Araya JC, Villaseca MA, Flores M, Schneider B. p53 gene mutation in cancer of the colon and rectum.

Rev Med Chil 2000;128:996-04.

Saito K, Arai K, Mori M. p53 overexpression and K-ras codon 12 mutations in

submucosal invasive depressed-type colorectal cancer.

Oncol Rep 2000;4:741-44.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. In a laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1992.

Sato K, Morris HP, Weinhouse S. Phosphorylase: a new isozyme in rat hepatic tumors and fetal liver.

Science 1972;178:879-81.

Sato K, Satoh K, Sato T, Imai F, Morris HP. Isozyme patterns of glycogen phosphorylase in rat tissues and transplantable hepatomas.

Cancer Res 1976;36:487-95.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.

J Histochem Cytochem 1991;39:741-8.

Shimada S, Maeno M, Misumi A, Akagi M. Histochemical study of phosphorylase in proliferating cells of intestinal metaplasia and carcinoma of the human stomach.

Scand J Gastroenterol 1984;19:965-70.

Shimada S, Maeno M, Akagi M, Hatayama I, Sato T, Sato K.

Immunohistochemical detection of glycogen phosphorylase isoenzymes in rat and human tissues.

Histochem J 1986;18:334-8.

Shimada S, Maeno M, Misumi A, Takano S, Akagi M. Antigen reversion of

glycogen phosphorylase isoenzyme in carcinoma and proliferative zone of intestinal metaplasia of the human stomach.

Gastroenterology 1987;93:35-40.

Shimada S, Honmyo U, Yagi Y, Ikeda T, Yokota T, Ogawa M. Expression of glycogen phosphorylase activity in minute gastric carcinoma.

Am J Gastroenterol 1992;87:1230-1.

Shimada S, Tashima S, Yamaguchi K, Matsuzaki H, and Ogawa M. Carcinogenesis of intestinal-type gastric cancer and colorectal cancer is commonly accompanied by expression of brain (fetal)-type glycogen phosphorylase.

J Exp Clin Cancer Res 1999;18:111-18.

Shimada S, Matsuzaki H, Marutsuka T, Shiomori K, Ogawa M. Gastric and intestinal phenotypes of gastric carcinoma with reference to expression of brain(fetal)-type glycogen phosphorylase.

J Gastroenterol 2001;36:457-464.

Shimada S, Shiomori K, Tashima S, Tsuruta J, Ogawa M. Frequent p53 mutation in brain(fetal)-type glycogen phosphorylase positive foci adjacent to human 'de novo' colorectal carcinomas.

Br J Cancer 2001;84:1497-04.

Shimada S, Shiomori K, Honmyo U, Maeno M, Yagi Y, Ogawa M. BGP expression in gastric biopsies may predict the development of new lesions after local treatment for early gastric cancer.

Gastric Cancer 2002;5:130-136.



Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer* 1989;64:1138-46.

Takashi M, Koshikawa T, Kurobe N, Kato K. Elevated concentrations of brain type glycogen phosphorylase in renal cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:975-80.

Takeuchi T, Kuriaki H. Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues. *J Histochem Cytochem* 1955; 3:153-60.

Tashima S, Shimada S, Matsuzaki H, Yamaguchi K, Tsuruta J, Ogawa M. Expression of brain-type glycogen phosphorylase is a potentially novel early biomarker in the carcinogenesis of human colorectal carcinomas. *Am J Gastroenterol*, 2000;95:255-63.

Umetani N, Sasaki S, Watanabe T, Matsuda K, Muto T. Involvement of APC and K-ras mutation in non-polypoid colorectal tumorigenesis. *Br J Cancer* 2000;82:9-15.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Eng J Med* 1988;319:525-32.

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* 1994;85:147-51.