

ヒト骨・軟部腫瘍における 優性および劣性癌遺伝子の変異に関する研究

岡山大学医学部附属癌研究施設生化学研究部門（指導：小田琢三教授）

岡山大学医学部整形外科教室（指導：田辺剛造教授）

尾 崎 敏 文

（平成元年3月27日受稿）

Key words：骨・軟部腫瘍，優性癌遺伝子，劣性癌遺伝子，
Rb 遺伝子，Southern hybridization

緒 言

癌遺伝子は、ウイルスによる発癌機構の研究過程でレトロウイルスのもつ発癌に関与する遺伝子として発見された¹⁾。近年の分子生物学の進歩により、ウイルスのもつ癌遺伝子(v-onc と略す)はもともと宿主細胞中に存在する遺伝子(c-onc と略す)に由来することがわかった¹⁾²⁾。また v-onc に対応する c-onc が必ず存在するほか、最近の DNA トランスフェクション技術を用いた癌遺伝子の検出法の開発により³⁾⁴⁾、v-onc には対応するものがない c-onc も発見され、現在までに30種類以上もの癌遺伝子が同定されている²⁾⁵⁾。正常細胞中ではこれらの遺伝子の発現は正しく調節されており、細胞の増殖や分化等に重要な働きをしていると考えられている²⁾。しかし、まだその明確な機能はわかっていない。またこれらの遺伝子は、相同染色体上の2つの対立遺伝子の1つに活性化が起きても発癌作用を発揮するとされており、優性癌遺伝子とも呼ばれている^{6)~8)}。優性癌遺伝子の変化としては *myc* 系遺伝子や *erb* 系遺伝子における遺伝子増幅や *ras* 系遺伝子における点突然変異、また *myc* や *abl* でみられる染色体の転座にともなった転写調節の変化等がある⁹⁾。これらの優性癌遺伝子の変化とヒト悪性腫瘍との関係については臨床例で検討されているが、特殊なものを除いて重大な因果関係はまだ証明されていない。

一方、劣性癌遺伝子はその2つの対立遺伝子

が両方とも失活した場合にのみ細胞が癌化し、正常では細胞の癌化を抑制していると考えられているため癌抑制遺伝子とも呼ばれている⁶⁾⁸⁾。このもっとも代表的な遺伝子が網膜芽細胞腫遺伝子(Rb 遺伝子と略す)である。網膜芽細胞腫は小児の網膜に発生する悪性腫瘍で、遺伝子のもとの散発性のものがある⁹⁾¹⁰⁾。前者は発症が早期で両眼に発生しやすく外科的処置や放射線治療によって治癒しても、成人後放射線照射野に再び骨肉腫などの悪性腫瘍が発生し易い^{11)~13)}。1971年、Knudson らは統計学的解析により、遺伝性網膜芽細胞腫は全ての体細胞において生殖細胞の時から存在する Rb 遺伝子の突然変異を持っていて、これに第2の突然変異が加わって腫瘍が発生するという2段階突然変異説を提唱した¹⁴⁾。一方、散発性の場合には Rb 遺伝子の2つの独立した突然変異の連続により腫瘍が発生するとした¹⁰⁾¹⁴⁾。1980年代に入り網膜芽細胞腫細胞の染色体分析から、その約2%~3%の症例で13番染色体、特に13q14の部位の欠損を有していることが発見された⁹⁾。また網膜芽細胞腫と骨肉腫の間に病因論的相関があることが指摘された^{11)15)~17)}。最近3つのグループが chromosome walking 法で Rb locus の遺伝子をクローニングし、さらに4.7kbのcDNAのクローニングに成功した¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁸⁾。このcDNAを用いて Rb 遺伝子領域(Rb locus と略す)における遺伝子地図の作成が行われ、また網膜芽細胞腫における Rb 遺伝子の構造異常や mRNA の消失等が証明され

た¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁹⁾、さらに Rb 遺伝子産物の正常細胞中での機能に関する研究も進展している¹⁸⁾²⁰⁾²¹⁾。しかし、現在までに網膜芽細胞腫における Rb 遺伝子の構造解析は行われてきているが、ヒトの骨肉腫など骨・軟部腫瘍における解析はほとんどなされていない。

本研究では、ヒト骨・軟部腫瘍における癌遺伝子研究の一環として²²⁾²³⁾、ヒト骨・軟部腫瘍組織24例、培養細胞株2例について、8種類の優性癌遺伝子と劣性癌遺伝子である Rb 遺伝子の構造異常を Southern hybridization 法で解析した。さらにこれらの症例における癌遺伝子の構造変化と臨床学的知見を比較し、癌遺伝子の発癌およびその進展への関与を検討した。

材 料 と 方 法

1. 腫瘍組織

DNA 抽出に用いた腫瘍組織は、手術により摘出後すみやかに -80°C で凍結保存し使用した。骨腫瘍12例、軟部腫瘍12例、当施設で樹立したヒト骨肉腫培養細胞株²⁴⁾1例、ヒト悪性線維性組織球腫 (MFH と略す) 培養細胞株1例を使用した (表1)。対照として正常胎盤組織及び患者の非癌部である末梢血白血球を使用した。

2. 細胞高分子 DNA の抽出

-80°C で冷凍保存しておいた腫瘍組織を、ドライアイス上で安全カミソリを用いて細削した後 lysis buffer (10mM Tris-HCl, pH7.5, 10 mM EDTA) に懸濁し²⁷⁾、proteinase K (Merck 社) と sarcosyl を最終濃度がそれぞれ $100\mu\text{g}/\text{ml}$ と0.5%となるように加えて 37°C で一昼夜加温した。フェノールで1回、フェノール・クロロホルム (1:1) の混合液で1回、クロロホルムで2回高分子 DNA を抽出した後 RNase 処理を行った。エタノールで精製 DNA を沈澱させた後、10mM Tris-HCl (pH7.5) と 1 mM EDTA を含む溶液に溶解した。培養細胞からの DNA の抽出は、細胞をリン酸緩衝食塩水で洗浄した後、上記方法と同様に行った。末梢血白血球からの高分子 DNA の抽出は、Jeanpierre らの方法²⁸⁾に従った。ヘパリン採血した10mlの血液を、10 mM NaCl と 10mM EDTA を含む溶液で洗浄し、14mlの 6mM 塩酸グアニジンと 1mlの 7.5mM

酢酸アンモニウムを混和し、さらに 1mlの20% sarcosyl と $150\mu\text{l}$ の $100\text{mg}/\text{ml}$ proteinase K を加え 60°C で1時間加熱した後、上記方法と同様に抽出を行った。

3. プローブ DNA とプローブの標識

優性癌遺伝子のプローブは Amersham 社より購入した、*c-myc*, *N-myc*, *c-sis*, *c-raf-1*, *K-ras* 2, *c-fms*, *c-fos*, *c-erbB* をそれぞれ含むプラスミドから制限酵素 (東洋紡績株式会社および宝酒造株式会社から購入) で癌遺伝子を含む DNA 断片をそれぞれ切り出し、アガロースゲルで精製してプローブとした。劣性癌遺伝子として Rb 遺伝子, p0.9R と p3.8R (Dryja 博士と関谷剛男博士より恵与) を用いた¹⁵⁾²⁰⁾。プローブ DNA の標識は Feinberg と Vogelstein の oligo labeling 法²⁹⁾に従い, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dctp ($3000\text{Ci}/\text{mmol}$, ICN 社) を基質として、マルチプライム DNA 標識システム (RPN. 1601Y, Amersham 社) を用いて行った。

4. Southern hybridization

優性癌遺伝子 (*c-myc*, *c-raf-1*, *K-ras* 2, *c-fos*, *c-fms*, *c-sis*, *c-erbB*, *N-myc*) をプローブとして使用するときは高分子 DNA $2\mu\text{g}$ を *EcoR* I で完全消化し、ミニサイズ (泳動距離6.5 cm) の0.7%アガロースゲル (Bio-Rad 社) で、p0.9R と p3.8R をプローブとして使用する場合には高分子 DNA $5\mu\text{g}$ を *Hind* III で完全消化後、標準サイズ (泳動距離13cm) の0.7%アガロースゲルで電気泳動し分離した。エチジウムブロマ이드で DNA を染色し写真撮影した後、Southern の方法³⁰⁾に従ってゲル内の DNA をナイロンメンブラン (Hybond-N, Amersham 社) 上に移し、350nm の紫外線照射装置で5分間照射することにより DNA を固定した。 ^{32}P で標識したプローブ DNA との hybridization および洗浄を、表2に示した条件で行った後オートラジオグラフィーを施行した。

結 果

1. ヒト骨・軟部腫瘍における優性癌遺伝子の解析

手術により摘出した骨・軟部腫瘍および骨・軟部腫瘍培養細胞中の優性癌遺伝子の構造異常

表1 使用した骨・軟部腫瘍症例および骨肉腫・MFH 培養細胞株

骨腫瘍および骨肉腫培養細胞株										軟部腫瘍およびMFH 培養細胞株									
case	sex	age	site	stage	surgery	chemo-therapy	recurrence (months)	metastasis (month/site)	survival months	case	sex	age	site	stage	surgery	chemo-therapy	recurrence (months)	metastasis (month/site)	survival months
Os-1	M	16	tibia	II B	AK amputation	ADR VCR HDMTX	—	9, humerus	9	Ex-Ew	M	20	thigh	II B	hip dis- articulation	ADR VCR CP	—	—	3
Os-2	F	13	femur	II B	hip dis- articulation	HDMTX ADR	—	2, lung 5, pelvis	6†	MFH-2	F	47	thigh	II B	wide local resection	CP ADR Act-D	10	23, lung	25†
Os-3	M	13	tibia	II B	AK amputation	HDMTX ADR VCR	—	8, lung	103	MFH-3	F	36	knee	II A	wide local resection	CP ADR VCR	—	—	5
Os-4	M	12	femur	II B	hip dis- articulation	HDMTX VCR	—	18, lung	110	MS-1	F	33	but- tock	II B	hemipelvectomy	—	2	—	4†
Os-5	M	52	femur	II B	AK amputation	ADR VCR	—	—	7	MS-2	F	76	thigh	III	hip dis- articulation	—	—	1, lung	16†
Os-6	M	16	tibia	II B	AK amputation	HDMTX VCR	—	—	14	MS-3	M	41	thigh	II A	wide local resection	ADR VCR CP	—	—	20
Ew-1	F	13	femur	II B	—	VCR ADR Act-D	—	8, lung pelvis/skull	12†	LS-1	F	38	thigh	II B	wide local resection	—	—	1, mesenterium	24†
Ew-2	F	21	clavi- cle	II B	total resection of clavicle	ADR VCR Act-D	—	13, humerus, spine, skull	15†	LS-2	F	24	back	II B	wide local resection	—	3, 4, 6	17, lung	22†
MFH-1	M	57	femur	II B	AK amputation	ADR VCR CP	—	5, lung	13†	SS-1	M	42	thigh	II B	hip dis- articulation	—	6	12, lung	18†
GCT-1	F	48	femur	I B	hip dis- articulation	—	—	—	20	SS-2	F	16	fore- arm	II B	wide local resection	—	—	—	84
GCT-2	F	34	tibia	I B	wide local resection	—	—	—	96	MaLy	M	56	axilla	II B	wide local resection	ADR VCR CP	—	—	12†
Ob	F	37	C7 body	3	extirpation	—	—	—	20	schwan	F	57	but- tock	I	extirpation	—	—	—	5
HuO ₂	F	13	femur	II B	AK amputation	HDMTX VCR ADR	—	11, spine	17†	HuMFH ₁	F	47	thigh	II B	hip dis- articulation	ADR VCR CP Act-D	10	23, lung	25†

stage : surgical stage^{UICC}, survival months : 初診時から生存月数. Os : 骨肉腫, Ew : Ewing 肉腫, MFH : 悪性繊維性組織腫, GCT : 骨巨細胞腫, Ob : 骨芽細胞腫, HuO₂ : 骨肉腫培養細胞株, Ex-Ew : 骨外性 Ewing 肉腫, Ms : 悪性 Schwann 腫, Lg : 脂肪肉腫, SS : 滑膜肉腫, MaLy : 悪性リンパ腫, schwan : 神経鞘腫, HuMFH₁ : MFH 培養細胞株, ADR : adriamycin, VCR : vincristine, HDMTX : high dose methotrexate, Act-D : actinomycinD, CP : cyclophosphamide, † : 死亡

の有無を検討するため、各組織・細胞全26検体より抽出した高分子DNAを制限酵素で完全消化した後、8種類のヒト細胞性癌遺伝子DNAをプローブとしてSouthern hybridizationを行った。正常コントロールとして、可能なものは患者の非癌部である末梢血白血球より抽出した高分子DNAを、不可能な場合はヒト胎盤より抽出

した高分子DNAを使用した。得られた高分子DNA 2 μ gを制限酵素EcoRIで消化し、c-myc遺伝子をプローブとしてSouthern hybridizationを行った結果を図1-aに示す。同フィルターを0.4M NaOH溶液中、45°Cで30分間加熱した後0.1 $\times$ SSCと0.1%(W/V)SDS, 0.2M Tris-HCl (pH7.5)を含む溶液中で45°C, 30分処理してブ

表2 ハイブリダイゼーション及びフィルター洗浄の条件

ハイブリダイゼーション ^{a)}		洗 浄 ^{b)} (液温65°C)	
優性癌遺伝子	65°C 24時間	2 $\times$ SSC 0.1%SDS 中で30分 2回	1 $\times$ SSC 0.1%SDS 中で30分 2回
劣性癌遺伝子	65°C 48時間	2 $\times$ SSC 0.1%SDS 中で30分 2回	0.2 $\times$ SSC 0.1%SDS 中で30分 2回

a) ハイブリダイゼーション溶液の組成は6 $\times$ SSC (20 $\times$ SSCは3 M NaClと0.3M クエン酸ナトリウムを含む)、5 $\times$ Denhardt 溶液(100 $\times$ Denhardt 溶液は2%牛血清アルブミン、2% Ficoll400, 2%ポリビニルピロリドンを含む)、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム、10%デキストラン硫酸、および0.01M EDTAよりなる。

b) あらかじめ2 $\times$ SSC 中でスポンジたわしで軽く擦った後洗浄した。

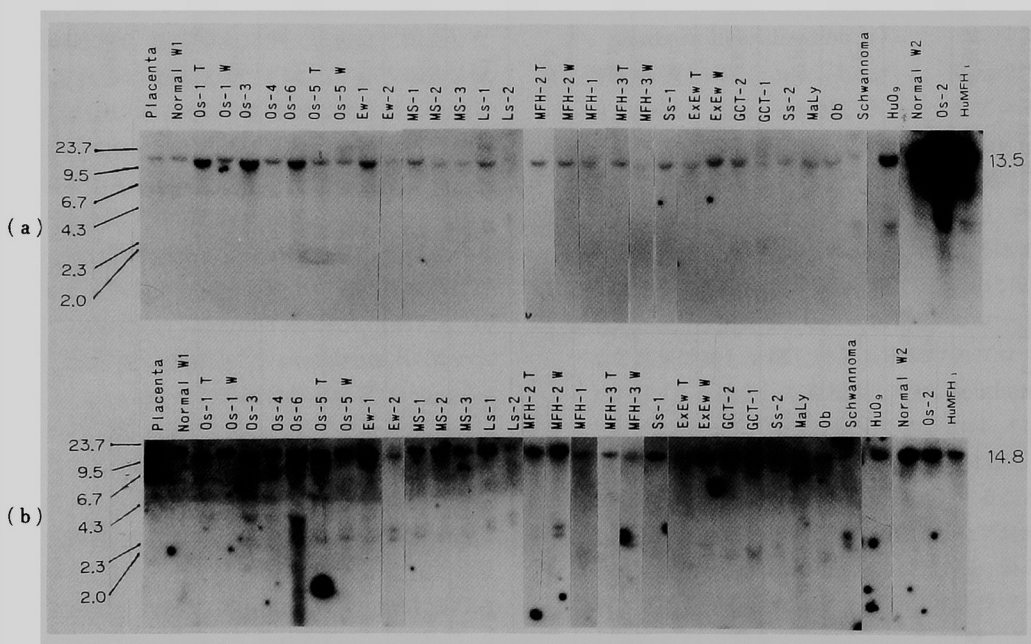


図1 優性癌遺伝子をプローブとした Southern hybridization の結果
各検体(表1)より抽出した高分子DNA 2 μ gをEcoRIで完全に消化した後、c-myc 遺伝子をプローブとして表2に示す条件下でハイブリダイゼーションを行なった(a)。同じフィルターを、c-sis 遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。3.0Kb 付近の薄いバンドは前回のハイブリダイゼーション時のプローブが少し残っているためである(b)。左端の数字は分子量サイズマーカーの位置(λ フェージ DNA をHind IIIで切断したもの、単位はK:kilo base)、右端の数字は出現したバンドの大きさをそれぞれ示した。

ローブを洗い落とした。このフィルターを用いて *c-sis* をプローブとして再度 Southern hybridization を行った結果を図 1-b に示す。すべてのレーンで 13.5kb の *c-myc* のバンド (図 1-a) と 14.8kb の *c-sis* のバンド (図 1-b) が確認できた。そのうち Os-1, Os-3, Os-6, Ew-1, HuO₉, Os-2 において、*c-myc* のバンドが対照よりも濃かった。同じフィルターを使用した図 1-b の *c-sis* のバンドと比較して材料 DNA 量の補正をすると Os-1, HuO₉, Os-2 において *c-myc* が増幅していることがわかった。Os-2 の結果はすでに住居ら²²⁾により報告されている。次に増幅のみられた DNA を他の制限酵素、すなわち Os-1 の場合は *Hind* III と *Pst* I, HuO₉ の場合は *Pst* I で完全消化して Southern hybridization を行った。Os-1 も HuO₉ においても *c-myc* のバンドは対照 DNA の場合より濃染しているが、明らかな再配列は認められなかった。増幅の程度を調べるために試験 DNA の濃度を覚えて対照 DNA と比較した。Os-1 は 2 ~ 4 倍、Os-2 は 16 ~ 32 倍²²⁾, HuO₉ は 2 ~ 4 倍程度 *c-myc* が増幅していることがわかった (図 2)。

次に *c-raf-1*, *c-erbB*, *N-myc* 遺伝子をそれぞれプローブとして、Southern hybridization を

行ったが、すべての症例で 2.9kb の *c-raf-1* のバンドと 7.0kb の *c-erbB* のバンド、2.0kb の *N-myc* のバンドが検出された。Os-2 においてはすでに住居ら²²⁾によって報告されているように *c-raf-1* の増幅がみられたが、ほかの症例では異常は検出されなかった。

c-fms, *K-ras* 2, *c-fos* においても同様に Southern hybridization を行ったが、対照の DNA と各プローブで検出されたバンドの濃さや大きさを比較して大きな異常はなかった。優性癌遺伝子解析の結果を表 3 にまとめた。

2. ヒト骨・軟部腫瘍における劣性癌遺伝子の解析

健康人 3 人の末梢血白血球とヒト胎盤より高分子 DNA を抽出し、制限酵素 *Hind* III で完全消化後、Rb 遺伝子 p0.9R と p3.8R をプローブとして Southern hybridization を行った (図 3)。これらのバンドを Dryja らの作成した遺伝子マップ¹⁹⁾と比較して p3.8R をプローブとしたときのバンドを特色として、4.5kb の *Hind* III 断片が出現しにくいことがわかる。一方 p0.9R をプローブとすると、Rb locus の 5' 末端に G-C rich 領域が存在することによりバンドのスメア化が出現すること、Dryja らの作成した遺伝子マッ

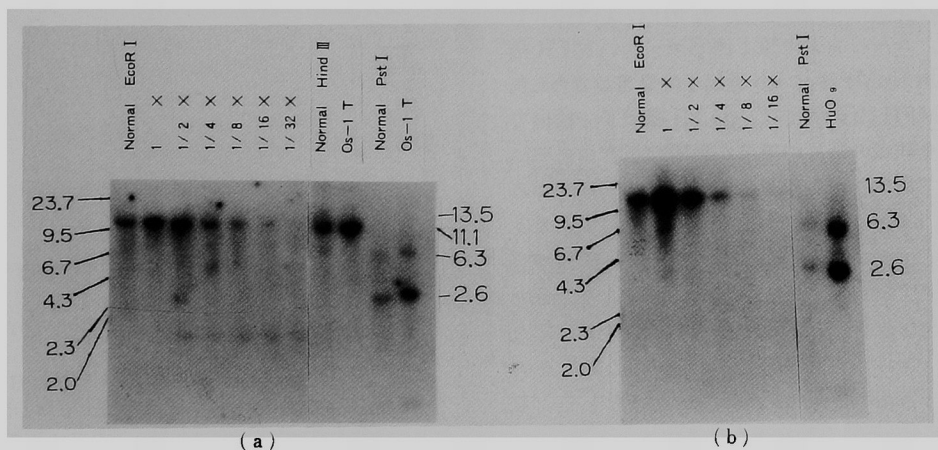


図 2 *c-myc* 遺伝子の増幅の程度と遺伝子再構成

c-myc 遺伝子の増幅のみられた Os-1 (a) および HuO₉ (b) における遺伝子増幅の程度 (それぞれ左側) および遺伝子再構成の有無 (それぞれ右側) を調べた。各 DNA を *Eco*RI で完全消化後、DNA の濃度を 2μg から半分ずつ希釈してハイブリダイゼーションを行った時のバンドの濃さを対照と比較した。また DNA を *Hind* III と *Pst* I で完全消化後ハイブリダイゼーションを行った時に出現するバンドの大きさを、対照で出現するバンドの大きさと比較した。

ブ²⁰⁾に14.0kb 付近のバンドを加えなくてはならない³¹⁾³²⁾ことがわかった。

Rb 遺伝子の構造異常がヒト骨・軟部腫瘍組織に存在するかどうかを調べるために p0.9R と p3.8R をプローブとして Southern hybridization をおこなった。患者の正常細胞 DNA (特に末梢白血球から) が利用できる場合はそれを対照として用いた。しかし、患者がすでに死亡するなどしている場合は、胎盤または正常人の末梢白血球を用いた。その結果、骨肉腫 6 症例中 3 症例、骨肉腫培養細胞の HuO₉、およびその他の骨・軟部腫瘍 2 症例と MFH 培養細胞 HuMFH₁ に Rb 遺伝子の構造異常が認められた (図 4-a, 図 4-b)。骨肉腫症例において異常の認められた 3 症例中、homozygous deletion (相同染色体両者の欠損が認められるもの) は存在しなかった。Os-1 においては 5.8kb 付近への対照では存在しないバンドが出現しており、再配列が起きていると考えられた。Os-2, Os-5 では 7.4kb Hind III 断片の濃度が明らかに低く、この部分が heterozygous deletion を起こしていると思われた。また、ヒト骨肉腫培養細胞 HuO₉ においては 7.4kb Hind III 断片が完全に欠失しており、明らかに homozygous deletion を起こしている。その他の骨・軟部腫瘍においても MFH 1 例 (MFH-2)、ユーイング肉腫 1 例 (Ew-2)、MFH 培養細胞 HuMFH₁ に Rb 遺伝子の異常が認められた。MFH-2 の例では、p3.8R 遺伝子で検出できる全領域の断片の濃度が患者の正常白血球において検出される断片の濃度より低下しているため、heterozygous deletion を起こしているといえる。また HuMFH₁ においても p3.8R 領域全体の濃度が低下しており heterozygous deletion が存在した。一方、Ew-2 においても p3.8R 全領域において濃度の低下が存在するため、その領域の heterozygous deletion をきたしている (図 5)。それらの結果を表 3 にまとめた。

3. 骨肉腫症例の臨床経過について

アルカリフォスファターゼ (ALP と略す) 値は骨芽細胞の活性を反映すると考えられている。症例の中で *c-myc* に増幅のあるものとなかったものについて、ALP を指標として骨肉腫の臨床経過を図 4-a, 4-b に示した。Os-1 は術前化

学療法、大腿切断、術後化学療法にもかかわらず 9 ヶ月で上腕骨に骨転移が起こった。Os-2 は化学療法に股関節離断術をおこなったが 2 ヶ月で肺に、5 ヶ月で骨盤に転移して 6 ヶ月で死亡した。HuO₉ の症例は化学療法に大腿切断を加えたが、11 ヶ月で脊椎に転移した。これらはいずれも Rb 遺伝子の異常も存在していた (図 6-a)。

Os-3, Os-4 は Rb 遺伝子、*c-myc* とともに異常はなく化学療法と切離断術後それぞれ 8 ヶ月と 18 ヶ月で肺転移が起こったが、両者とも初診術 100 ヶ月以上経過した現在も生存している。Os-5 は 7.4kb Hind III 断片の heterozygous deletion が存在したが、*c-myc* の異常はなく現在転移の兆候はない。Os-6 は両遺伝子の異常が存在

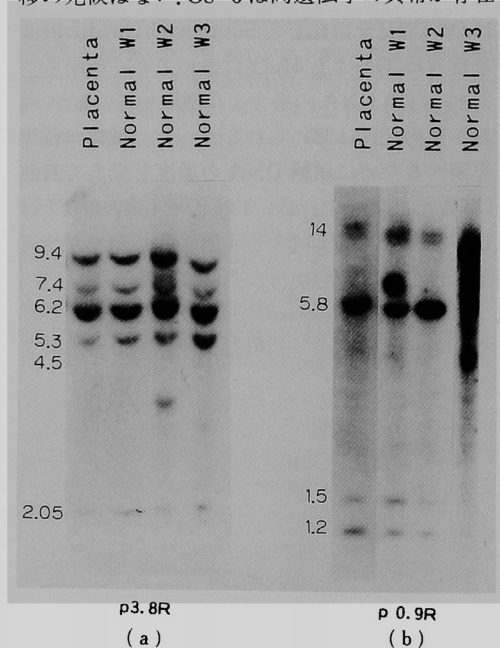


図 3 Rb 遺伝子をプローブとした Southern hybridization の結果

胎盤 (Placenta) 及び正常人末梢白血球 (Normal W1~W3) より抽出した DNA 5 μ g を Hind III 完全消化後、アガロースゲル電気泳動により分離してナイロンメンブレンに移しとり、Rb 遺伝子 (p3.8R) をプローブとしてハイブリダイゼーションをおこなった (a)。同様に、フィルターを作成して Rb 遺伝子 (p0.9R) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。p0.9R の Normal W1 の 7.0 kb 付近のバンドは今回の実験とは無関係である (b)。

せず、現在生存中である (図 6-b)。

考 察

本研究ではヒト骨・軟部腫瘍における癌遺伝子の関与を調べるために、優性及び劣性癌遺伝子のプローブを用いて種々のヒト骨・軟部腫瘍組織中の癌遺伝子の構造変化を Southern hybridization 法を用いて調べ、その結果を臨床経過と比較検討した。

優性癌遺伝子に関しては、臨床症例24例中骨肉腫2例と培養細胞 HuO₉に *c-myc* 遺伝子の増幅がみられた。*myc* 蛋白質は核内で働き、DNA

結合能をもち細胞 DNA の合成を誘導すると考えられており、その発現は増殖の盛んな細胞で増加する³³⁾。*c-myc* の増幅は、様々な悪性腫瘍、特に大腸癌、胃癌、肺癌、白血病、Burkitt リンパ腫などで報告されている⁵⁾³⁴⁾³⁵⁾が、特定の癌との結びつきは薄いものとされ Yokota ら³⁵⁾が肉腫において22%に *c-myc* の増幅を報告していることと比較すると、本研究では骨肉腫で3/7と前述の報告よりかなり頻度が高い。臨床経過(表1)と合わせて考えると、*c-myc* が増幅した3例に骨転移が起こっており、*c-myc* の増幅と骨転移の間にはなんらかの関係があるものと考えられる。

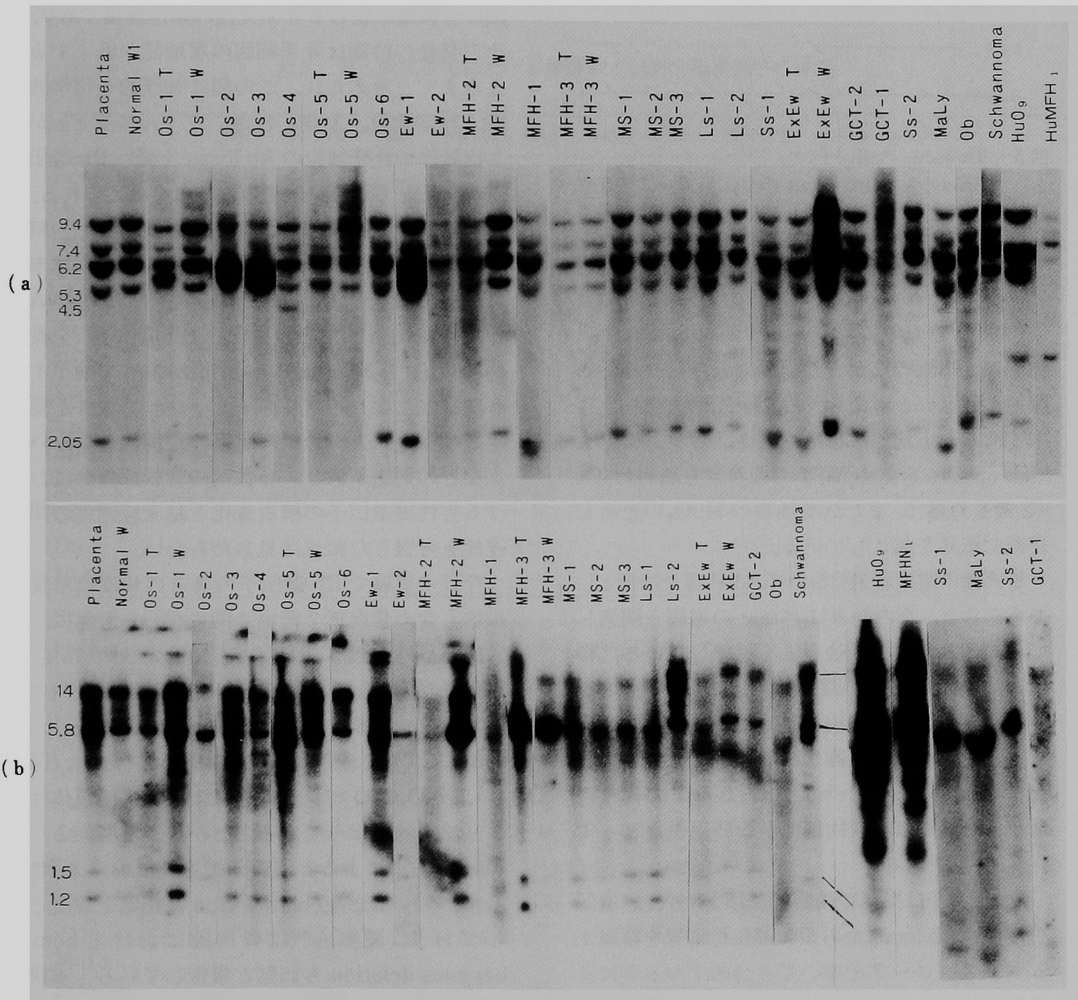


図4 各検体(表1)より抽出した高分子DNA 5 μ gを *Hind* IIIで完全消化後上記と同様に p3.8Rをプローブとして使用して表2に示す条件下でハイブリダイゼーションを行った(a)。同様にしてフィルターを作成して p0.9Rをプローブとして使用してハイブリダイゼーションを行った (b)。

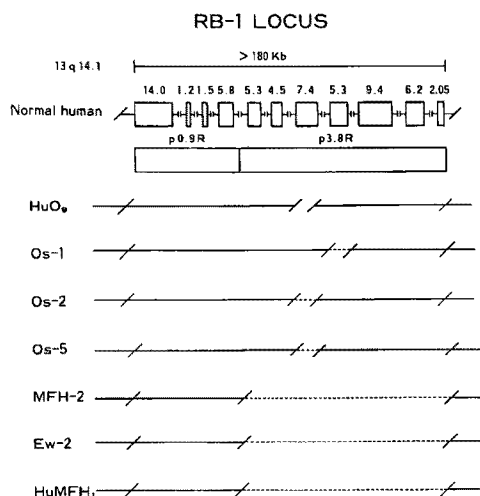


図5 Rb locus の遺伝子マップ

Friend らの Rb locus の遺伝子マップ¹⁹⁾を参考にしマップを作成して、今回の研究で得られた結果を示した。線の消失は homozygous deletion を、破線は heterozygous deletion を示す。

肺転移は増幅のなかった症例にもみられるため関連性は低いと考えられる。Os-1 例は現在生存中であるが上腕部に疼痛を訴え、骨シンチでも high uptake を認め MRI でも異常を認めた。Os-2 例は骨盤に、また培養細胞の HuO₂ の患者も脊椎に転移を起こしている。

骨肉腫の臨床経過において ALP 値を指標として考えると、その動きは c-myc の増幅と関連して各症例の病態と子後をよく反映している。特に c-myc の増幅のあった症例では ALP 活性の上昇は、手術、化学療法などによりある程度は低下するが、再度急上昇し肺転移や骨転移を生じ死亡の転帰をとっている。一方 c-myc の異常のなかった症例は比較的穏やかな経過をたどっている (表1, 図6)。

Rb 遺伝子は網膜芽細胞腫における劣性癌遺伝子として Rb locus から少し離れた位置を認識する H3-8 プローブを用いて3つのグループにより発見されたか⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾、またその欠失は骨肉腫の発症にも関与していることが知られている⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾。Rb 遺伝子は928個のアミノ酸よりなる分子量約

11万の蛋白質 (pp110) をコードしており、それは細胞核中に存在する DNA 結合能を持つリン酸化蛋白であるとされている⁽⁶⁾⁽¹⁸⁾。pp110は細胞中で優性癌遺伝子の作用を抑制したり、細胞の分化・増殖の調節因子として働く。そして、Rb 遺伝子の構造変化や発現調節機構の不活化により pp110蛋白の消失がおき、増殖の歯止めがとれて細胞は無秩序な増殖をし、癌化へと進むものと考えられる。Rb 遺伝子は Knudson の2段階突然変異説⁽⁴⁾によると、homozygous deletion となって初めて網膜芽細胞腫や骨肉腫が発症すると言われている⁽⁷⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾。骨肉腫は主として思春期に骨幹端に生じる骨原発性の悪性腫瘍であり、その発症の時期は骨芽細胞の増殖能が低下するころまでと考えられ、この間に物理的・化学的 hit (化学物質、X 線、外傷、ウイルスなど) が2回続けて骨芽細胞の Rb locus を襲い Rb 遺伝子が失活して腫瘍発生をきたすとも考えられる。しかし、なぜ網膜芽細胞や、骨芽細胞などの細胞が Rb 遺伝子の異常に対して敏感であるかは未だ不明である⁽²¹⁾。Rb 遺伝子のプローブは cDNA のため intron 領域を多く含む Rb 遺伝子 (全長約200kb) を Southern hybridization で検出するには厳密なハイブリダイゼーション条件が要求される。一方、骨軟部腫瘍の症例数が少ない点などの問題があり、多数例の骨軟部腫瘍における劣性癌遺伝子の構造変化と臨床経過との関連性を考察した報告は見あたらない。

今回の実験で Rb 遺伝子の異常の頻度は培養細胞も含め骨肉腫7例中4例すなわち57%に、骨肉腫以外の腫瘍においても19例中3例(16%)見られた (表3)。またそれらの Rb 遺伝子内の異常部位を図5に示した。homozygous deletion を起こしている症例は HuO₂ 1例のみであった (図4)。HuO₂ の Q バンド染色により13番染色体はトリソミーとなっていることがわかっている。Friend ら⁽¹⁹⁾によると網膜芽細胞腫における Rb locus の homozygous deletion は15%と程度としており、荒木ら⁽³⁰⁾は骨肉腫における homozygous deletion も15%と報告している。本研究で用いた骨肉腫における homozygous deletion の頻度はこれまでの報告と大差がない。しかし、heterozygous deletion は57%の症例でみ

られた。Friend ら¹⁸⁾は網膜芽細胞腫及び関連腫瘍材料のうち30%に何等かの変化がみられるとしているので、本研究の結果の方が少し多い。一方、Friend ら¹⁹⁾は Rb 遺伝子が間葉系腫瘍においても標的となっている可能性があることを報告しており、網膜芽細胞腫の2次腫瘍としての骨肉腫は23%に homozygous deletion、軟部腫瘍での15%の homozygous deletion を認めている。本研究の骨肉腫以外の腫瘍では、3例(16%)に heterozygous deletion が認められた。Rb locus 中の異常の存在している部位は7.4kb

Hind III断片付近であり、ここが hot spot である可能性が大と考えられる(図3)。しかし、Rb 遺伝子のみの異常と臨床経過の関連性の有無については、明確ではない(表1と3、図5)。

骨肉腫の発症パターンは homozygous deletion であるとされているが⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾、本研究の症例では heterozygous deletion が多く見られ、骨肉腫発症の原因は Rb 遺伝子の異常ばかりでなく、他の遺伝子が大きく関与している可能性がある。一方、戸口田ら³⁷⁾は p53遺伝子³⁸⁾が存在する17番染色体の異常が骨肉腫に頻繁に出現すると報告

表3 骨・軟部腫瘍における優性および劣性癌遺伝子の変異

	<i>myc</i>	N- <i>myc</i>	<i>sis</i>	<i>raf-1</i>	<i>fms</i>	<i>erbB</i>	<i>fos</i>	K- <i>ras2</i>	Rb gene
Bone Tumor									
Os-1	+	-	-	-	-	-	-	-	rearrangement
Os-2	+	-	-	+	-	-	-	-	heterozygous deletion
Os-3	-	-	-	-	-	-	-	-	
Os-4	-	-	-	-	-	-	-	-	
Os-5	-	-	-	-	-	-	-	-	heterozygous deletion
Os-6	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ew-1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ew-2	-	-	-	-	-	-	-	-	heterozygous deletion
MFH-1	-	-	-	-	-	-	-	-	
GCT-1	-	-	-	-	-	-	-	-	
GCT-2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ob	-	-	-	-	-	-	-	-	
HuO ₉	+	-	-	-	-	-	-	-	homozygous deletion
Soft Part Tumor									
Ex-Ew	-	-	-	-	-	-	-	-	
MFH-2	-	-	-	-	-	-	-	-	heterozygous deletion
MFH-3	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS-1	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS-2	-	-	-	-	-	-	-	-	
MS-3	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ls-1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ls-2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ss-1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ss-2	-	-	-	-	-	-	-	-	
MaLy	-	-	-	-	-	-	-	-	
Schwan	-	-	-	-	-	-	-	-	
HuMFH ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	heterozygous deletion

優性癌遺伝子において増幅のみられたものは+、みられなかったものは-で示した。劣性癌遺伝子の場合はその欠失の様式を示した。

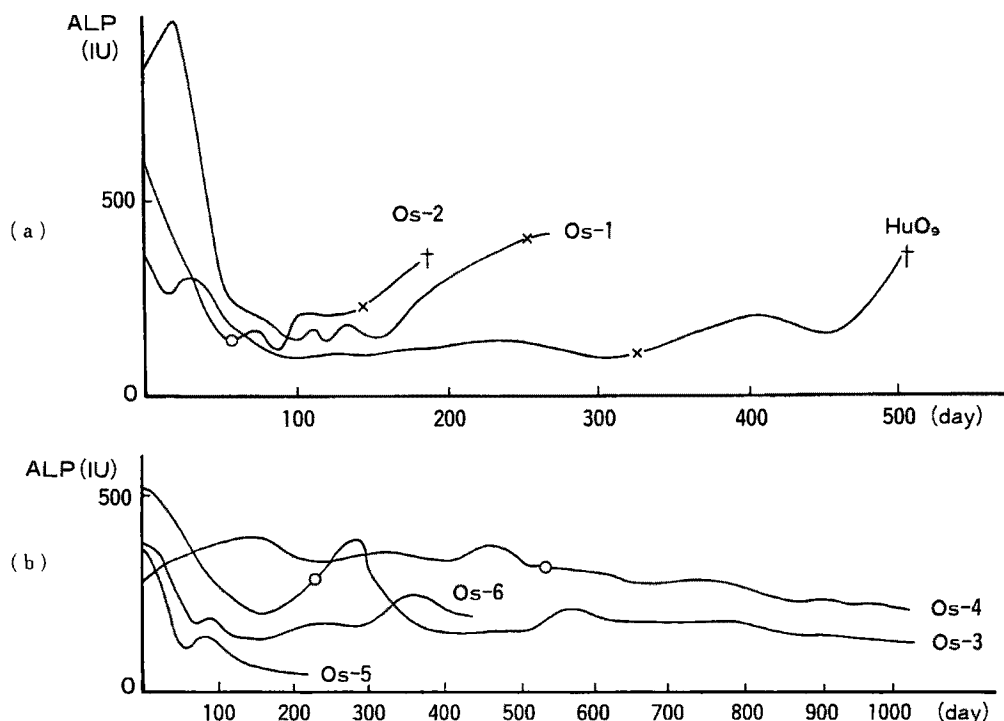


図6 ALP活性と骨肉腫の臨床経過
c-myc 遺伝子の異常のあったものの臨床経過 (a) と、異常の無かったものの臨床経過 (b) を示す。○は肺転移, ×は骨転移, †は死亡。

している。

さらに今回の研究結果から、優性癌遺伝子と劣性癌遺伝子の関係について検討した。調査した全症例中、双方の遺伝子に異常の見つかったものは、Os-1, Os-2, HuO₉の3例であった(表3)。特に、*c-myc*の異常がみられた骨肉腫3例にはいずれも Rb 遺伝子の異常が存在していた。これまでの報告では、肺小細胞癌において第3や第13染色体上の劣性癌遺伝子の失活に加えて *myc* 系の遺伝子増幅が高い頻度で見つかっている³⁹⁾ことや、大腸癌において5番染色体上の劣性癌遺伝子の失活と *K-ras* 遺伝子の点突然変異による活性化があることが報告されている。従って、ヒト骨・軟部腫瘍でも優性と劣性両タイプの癌遺伝子のどちらもが複数ずつ関与している可能性が考えられる。特に骨肉腫においては Rb 遺伝子の異常と *c-myc* の異常が深く関与していることが推測された。

現在、Rb 遺伝子以外の劣性癌遺伝子が同定さ

れつつあり、発癌機構の解明に大きな発展がもたらされつつあるが、骨・軟部腫瘍においては今後さらに症例数を増やし、Rb 遺伝子の異常について検討を加えることにより、また Rb 遺伝子の転写レベルやタンパク質レベルにおける解析を進めることができれば、この分野の腫瘍発生における分子機構の関与が解明されるものと考えられる。

結 論

ヒト骨・軟部腫瘍における優性及び劣性癌遺伝子の関与を調べるために、ヒト骨腫瘍12例、軟部腫瘍12例、骨肉腫培養細胞1例、および MFH 培養細胞について *c-myc*, *N-myc*, *c-erbB*, *K-ras2*, *c-fos*, *c-raf-1*, *c-sis*, *c-fms* と網膜芽細胞腫遺伝子 (p0.9R, p4.8R) をプローブとして Southern hybridization により解析し、以下の結果を得た。

1) *c-myc* 遺伝子の増幅を骨肉腫2例と骨肉腫

培養細胞 HuO₉において検出した, *c-myc* の増幅があった骨肉腫 3 例にのみ骨転移が認められたが, 他のものには認められなかった。

2) Rb 遺伝子の異常が骨肉腫 6 例中 3 例と骨肉腫培養細胞 1 例に, また, 骨肉腫以外の骨・軟部腫瘍 2 例と MFH 培養細胞に認められた。Rb 遺伝子の異常は 7.4kb *Hind* III 断片付近に多くみられ, この付近がいわゆる hot spot と考えられた。Rb 遺伝子の異常と臨床経過の関連性は明確には認められなかった。

3) 全症例中, 特に骨肉腫 3 例に優性癌遺伝子の異常と Rb 遺伝子の異常が認められた。骨肉腫発症において両タイプの癌遺伝子の関与が示唆

された。

本稿を終えるにあたり, 終始, ご指導とご校閲を賜りました岡山大学医学部附属癌源研究施設生化学研究部門小田琢三教授と池田正五助手, 同整形外科教室田辺剛造教授, 井上一助教授に深く感謝の意を捧げる。さらに実験遂行にあたり, 終始快くご協力下さいました岡山大学医学部附属癌源研究施設生化学部間の諸氏, 骨肉腫培養株 HuO₉ と悪性線維性組織球腫培養細胞株 HuMFH₁ の使用にあたっては同整形外科教室の川井章先生の協力を得たことを感謝する。

文 献

- 1) Bishop JM and Varmus H : Functions and origins of retroviral transforming genes : in RNA tumor viruses. Weiss R, Teich N, Varmus H and Coffin Jeds, Cold Spring Harvour Laboratory, Cold Spring Harvour, NY (1982) pp. 999—1108.
- 2) Varmus H : Retroviruses. Science (1988) **240**, 1427—1435.
- 3) Cooper GM : Cellular transforming genes. Science (1982) **217**, 801—806.
- 4) Weinberg RA : The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. Science (1985) **230**, 770—776.
- 5) Channing JD : Cellular Oncogenes and Human Carcinogenesis. Clin Chem (1987) **33**, 641—646.
- 6) 田矢洋一 : 劣性癌遺伝子. BIO medica (1988) **3**, 30—34.
- 7) 野田 亮 : 癌抑制遺伝子の構造と機能. 組織培養 (1987) **13**, 425—431.
- 8) Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphee AL, Strong LC and White RL : Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. Nature (1983) **305**, 779—784.
- 9) 高橋 玲 : 網膜芽細胞腫の癌抑制遺伝子及びそのほかの癌発生との関連. 実験医学 (1988) **6**, 429—435.
- 10) 菊池秀明 : 高発癌性遺伝病と癌遺伝子. 実験医学 (1986) **4**, 325—332.
- 11) Hansen MF, Koufos A, Gallie BL, Phillips RA, Fodstad O, Brogger A, Gedde-Dahl T and Cavenee WK : Osteosarcoma and retinoblastoma : A shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. Proc Natl Acad Sci USA (1985) **82**, 6216—6220.
- 12) Draper GJ, Sanders BM and Kingstone JE : Second primary neoplasma in patients with retinoblastoma. Br J Cancer (1986) **53**, 661—671.
- 13) Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD, Tung G : Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Ophthalmology (1984) **91**, 1351—1355.
- 14) Knudson AG : Mutation and Cancer : Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci USA (1971) **68**, 820—823.
- 15) Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM and Dryja TP : A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature (1986) **323**, 643—646.

- 16) Fung Y-KT, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF : Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* (1987) **236**, 1657—1661.
- 17) Dryja TP, Rapaport JM, Epstein J, Goorin AM, Weichselbaum, Koufos A and Cavenee WK : Chromosome 13 Homozygosity in osteosarcoma without retinoblastoma. *Am J Hum Genet* (1986) **38**, 59—66.
- 18) Lee W-H, Bookstein R, Hong F, Young L-J, Shew J-Y, Lee EY-HP : Human retinoblastoma susceptibility gene : cloning, identification, and sequence. *Science* (1987) **235**, 1394—1399.
- 19) Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang X-F, Bogenmann E, Li FP and Weinberg RA : Deletion of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors : Organization of the sequence and its encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**, 9059—9063.
- 20) Lee W-H, Shew J-Y, Hong FD, Sery TW, Donoso LA, Young L-J, Bookstein R and Lee EY-HP : The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* (1987) **329**, 642—645.
- 21) Friend SH, Dryja TP and Weinberg RA : Oncogenes and tumorsuppressing genes. *N Engl J Med* (1988) **318**, 618—622.
- 22) 住居広士, 伊藤士郎, 川井 章, 井上 一, 武智秀夫, 田辺剛造, 池田正五, 小田琢三 : ヒト骨軟部腫瘍における癌遺伝子の増幅, 日整会誌 (1988) **62**, 357.
- 23) Ikeda S, Sumii H, Akiyama K, Watanabe S, Ito S, Inoue H, Takechi H, Tanabe G and Oda T : Amplification of both *c-myc* and *c-raf-1* Oncogenes in a human osteosarcoma. *Jpn J Cancer Res* (1989) **80**, 6—9.
- 24) 川井 章, 伊藤士郎, 住居広士, 尾崎敏文, 井上 一, 田辺剛造, 佐藤二郎, 中林秀和 : ヒト骨肉腫由来培養細胞株 (HuO₉) の樹立と骨芽細胞様性格の解析. 日整会誌 (1988) **62**, 613.
- 25) Enneking WF, Spanier SS and Goodman MA : A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop* (1980) **153**, 106—120.
- 26) Enneking WF : A system of staging musculoskeletal neoplasms. *Clin Orthop* (1986) **204**, 9—24.
- 27) 清水憲二 : DNA トランスフェクションとセレクション : 癌遺伝子研究の展望. 現代化学 増刊 2, 豊島久真男, 西村進編 (1985) pp. 246—249.
- 28) Jeanpierre M : A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res* (1987) **15**, 9611.
- 29) Feinberg AP and Vogelstein B : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* (1983) **132**, 6—13.
- 30) Southern EM : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* (1975) **98**, 503—517.
- 31) Harbour JW, Lai S-L, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ : Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* (1988) **241**, 353—357.
- 32) Goddard AD, Balakier H, Canton M, Dunn J, Squire J, Reyes E, Becker A, Phillips RA and Gallie BL : Infrequent genomic rearrangement and normal expression of the putative Rb1 gene in retinoblastoma tumors. *Mol Cell Biol* (1988) **8**, 2082—2088.
- 33) 関谷剛男 : *myc* 遺伝子の発現調節と細胞周期 : がん遺伝子研究 — 最近の進歩, 渋谷正史, 山本雅編, 中外医学社, 東京 (1988) pp. 1—7.
- 34) 浅野 奨 : ヒト骨肉腫ヌードマウス移植株における細胞性癌遺伝子 (*c-onc*) の解析. 日整会誌 (1988) **62**, 231—242.
- 35) Yokota J, Tsunetugu-Yokota Y, Battifora H, Fevre CL, Cline MJ : Alterations of *myc*, *myb*, and

- ras*^{Hs} proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation. *Science* (1986) **231**, 261—265.
- 36) 荒木信人, 内田淳正, 三木哲朗, 木村友厚, 上田孝文, 吉川秀樹, 小野啓朗: 骨軟部悪性腫瘍における Rb 遺伝子の関与について. *日整会誌* (1988) **62**, 480.
- 37) 戸口田淳也, 石崎寛治, 佐々木正夫, 池永満生, 杉本正幸, 琴浦良彦, 山室隆夫: 骨肉腫における劣性癌遺伝子の関与: RB 遺伝子と17番染色体の変化の関連性について. *日整会誌* (1988) **62**, 479.
- 38) Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Batifora H and Cline MJ: Rearrangement of the p53gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**, 7716—7719.
- 39) Yokota J, Wada M, Shimosato M, Terada M and Sugimura T: Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, and 17 in small cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**, 9252—9256.

**Abnormality of dominant oncogenes and recessive oncogenes
in human bone and soft tissue tumors**

Toshifumi OZAKI

Department of Biochemistry, Cancer Institute,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Oda)

Department of Orthopaedic Surgery,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. G. Tanabe)

Osteosarcoma is a malignant bone tumor which usually occurs in the metaphysis of long bones in adolescents or young adults, but the mechanism of disease occurrence is unknown. To examine alterations in the dominant oncogenes in the osteosarcoma and other bone and soft tissue tumors, DNA extracted from 12 bone tumors, 12 soft part tumors and 2 cells lines was hybridized with c-oncogene (*c-myc*, *c-sis*, *c-raf-1*, *c-fos*, *K-ras2*, *c-erbB*, *c-fms*, *c-fos*). DNA extracted from the same samples was examined with Rb cDNA (p0.9R, p3.8R) probes, the retinoblastoma gene (Rb gene) localized at 13q14, to analyze whether a recessive mutation is a target in osteosarcoma, and other bone and soft tissue tumors. Amplification of *c-myc* was observed in 3 cases from 7 osteosarcomas and abnormalities in structure of the Rb gene were found in 4 from 7 osteosarcomas, 2 from 4 MFH, and 1 from 2 Ewing's sarcomas. Both amplification of the *c-myc* and abnormalities of the Rb gene were observed in 3 osteosarcoma cases. The results indicated that both the Rb gene and *c-myc* oncogene may be involved in the initiation of osteosarcoma.