

[原著] 前立腺癌の進行・転移における第8, 10,
16染色体の欠失

池田 良一

(1998年10月5日受付, 1999年1月18日受理)

要 旨

前立腺癌の進行や転移と第8, 10, 16染色体の欠失の相関について転移巣を含めた, 様々な臨床病期の前立腺癌検体を用いて検討した。各症例の正常および癌組織よりゲノムDNAを抽出し, PCR-LOH法を用いて各染色体につき2-4個のマイクロサテライト・マーカー部位について解析した。組織学的分化度は特に染色体欠失との相関を見なかったが, それぞれの染色体の欠失と臨床病期との間に有意な相関を認めた。染色体の欠失はその領域における癌抑制遺伝子の存在を意味しており, 前立腺癌の進行および転移に第8, 10, 16染色体上に存在が予想される癌抑制遺伝子は重要な役割を演じているものと考えられた。またこれらの染色体欠失は前立腺癌患者の予後や進展の可能性を把握するのに有効な指標となりうるものと考えられた。

Key words : prostate cancer, loss of heterozygosity, tumor suppressor gene, metastasis

略語一覧 : LOH : loss of heterozygosity
PCR : polymerase chain reaction
MSI : microsatellite instability

I. 緒 言

前立腺癌は欧米の男性の悪性新生物における発生率・死亡率ともに上位を占める癌であり [1], 近年我が国においても急増傾向が認められている。最近の分子生物学の目覚ましい進歩によって, Vogelsteinら [2] の提唱する大腸癌の多段階発生モデルに代表されるように, 癌の進行や転移の過程で複数の遺伝子変化の蓄積が認められることが明らかになってきた。また p53, RB1, CDKN4I (p16/MTS1)などの癌抑制遺伝子がクローニ

グされてきている [3-5]。しかしながら, 前立腺癌においては p53以外に高頻度に変異を認める癌抑制遺伝子が見つからないのが実情である。一方, 癌組織において多くの染色体の一部もしくは全体の欠失がみられるが, 癌の発生臓器特異的にある特定の染色体の欠失が高頻度に起きることが知られている。そしてこれらの高頻度に欠失する染色体上には, その癌の発生や進展に関与する癌抑制遺伝子の存在が示唆される。一部の癌抑制遺伝子はこの染色体欠失を手掛かりに positional cloning の手法を用いて遺伝子がクローニングさ

千葉大学医学部泌尿器科学講座

Ryoichi Ikeda : Chromosomal abnormalities of 8, 10 and 16 in the progression and metastasis of prostate cancer.

Department of Urology, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670. Tel. 043 (226) 2134. Received October 5, 1998, Accepted January 18, 1999.

れた。ところで前立腺癌においては第8, 10, 16染色体の欠失が高頻度に見られることが知られている [6-10]。そこでこれらの染色体の欠失と実際の前立腺癌の進行および転移の関係について、早期癌から転移病期にいたる前立腺癌検体を用いて検討したので報告する。

II. 実験方法

検体の採取：前立腺癌組織は、根治的前立腺全摘除術および前立腺癌にて死亡した患者の病理解剖にて採取した。前立腺全摘により採取した前立腺組織は5mmごとのセクションに切断し、各セクションごとにH-E染色標本を作成して顕微鏡下に癌巣と正常部分を区別して癌組織のみを切り出した。剖検例においては肉眼的に明らかな癌組織を切り出して、顕微鏡にて癌の存在を確認した。剖検例においては同時に肝臓・腎臓・リンパ節などへの転移巣についても同様の方法にて採取した。また前立腺全摘例では白血球より、剖検例では同時に採取した正常組織（腎臓もしくは肝臓）より対照としての正常DNAを抽出した [11]。

DNA抽出：各組織をホモゲナイザーにて細かく砕いた後にproteinase Kで一晩50度で消化した。さらにフェノール・クロロホルム抽出した後でエタノール沈澱を行い、DNAを水に溶解させてからspectrophotometerにて濃度を決定し、以下の実験に供与した。

マイクロサテライトマーカーを用いた染色体欠失の検出：図1に示した各マーカーについて2本

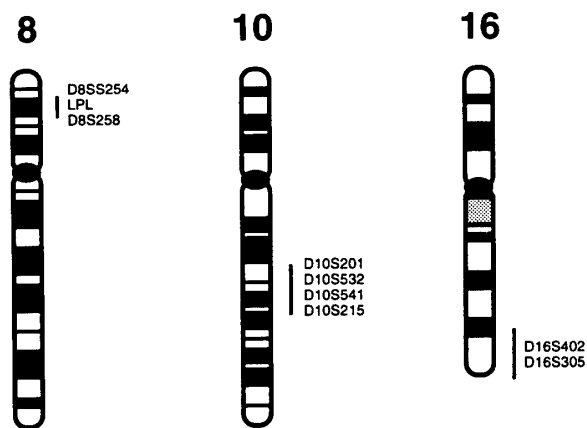


図1 第8, 10, 16染色体とマイクロサテライト・マーカーの位置

の常染色体のうちの1本の欠失 (Loss of Heterozygosity : LOH) を検索した。100ng の DNA を20ml のスケールの PCR Mix で増幅した [12, 13]。なおPCR Mixは10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200mM の各 deoxynucleotide triphosphate, 1mM の各プライマーと2.5units の Taq polymerase (Takara) が含まれる。またPCRに先だって、センス側のプライマーを [γ -³²P] ATP と T4 polynucleotide kinase を用いて end-labelling した。PCR の条件は基本として94度5分に続いて、94度60秒・55度60秒・72度90秒を27サイクル行い、さらに72度で7分間の final extension を行った。PCR 産物は加熱変性に続いて、7M の尿素を含むポリアクリルアミド変性ゲルで40W で2-4時間の電気泳動の後にオートラジオグラフィーを行いバンドの消失の有無を検討した。なお50%以上のバンドの消失をLOHと判定した。またバンドの移動もしくは新しいバンドの出現を Microsatellite instability (MSI) と判定した。

III. 結果

すべての染色体においてLOHが観察されたが、それらのうち代表的な例について図2に示した。また各染色体のLOHと病期との関係について表1にまとめた。各染色体の結果について以下に述べる。

第8染色体：Bovaら [6] および当教室での以前の報告 [7] により8 p 22-21.3の領域に共通欠

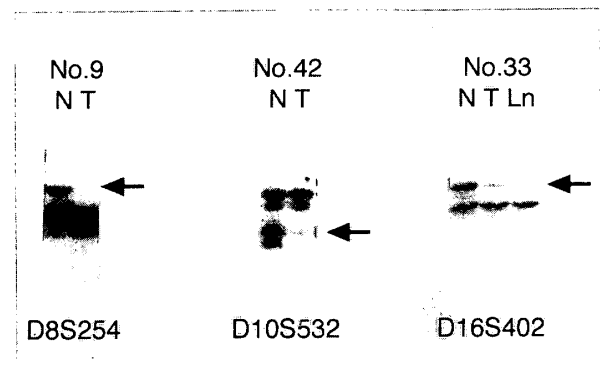


図2 LOHを示した代表的症例 N: 正常組織, T: 原発巣, Ln: リンパ節転移巣 下段に染色体マーカー番号を示す また矢印は染色体アレルの欠失を示す

表1 前立腺癌の病期と各染色体の欠失との関係

	病期 B	病期 C	病期 D	転移巣
第8染色体	5/20 (25%)	10/17 (59%)	22/32 (69%)	5/7 (71%)
第10染色体	0/16 (0%)	5/14 (36%)	8/16 (50%)	9/9 (100%)
第16染色体	5/20 (25%)	0/10 (0%)	9/18 (50%)	7/11 (64%)

失領域の存在することが明らかになっている。今回この領域に位置する3つのマイクロサテライトマーカーで検索した結果、病期B（前立腺限局）において25%の例でLOHがあったのに対して、病期の進行に従って病期C（前立腺被膜浸潤あり、転移なし）で59%、病期D（転移あり）で69%と有意にLOH頻度の上昇をみた。また転移巣では7例中5例にLOHを認め、うち2例については原発巣でLOHが見られなかったのに転移巣のみでLOHを認めた。これらより第8染色体の短腕の欠失つまり第8染色体の短腕上に存在するであろう癌抑制遺伝子は前立腺癌の進行に重要な役割を有しているものと推察された。

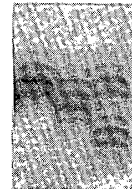
第10染色体：第10染色体については当教室での以前の報告により10q22-24の領域に共通欠失領域の存在することが明らかになっている。今回この領域に位置する4つのマイクロサテライトマーカーで検索した結果、病期Bにおいては16例全例でLOHを認めなかった。一方、病期の進行に伴って病期Cで36%、病期Dで50%と有意にLOH頻度の上昇をみた。さらに転移巣においては9例全例にLOHを見た。これらより第10染色体長腕に存在する癌抑制遺伝子は前立腺癌の進行の後期とくに転移に関与しているものと考えられた。

第16染色体：第16染色体については当教室での以前の報告により16q24.2-terの領域に共通欠失領域の存在することが明らかになっている。今回この領域に位置する2つのマイクロサテライトマーカーで検索した結果、病期Bにおいては25%の例でLOHを見たのに対して病期Cでは10例ともにLOHを認めなかった。しかし病期Dで50%さらに転移巣においては11例中7例（64%）にLOHを見た。従って、第16染色体長腕に存在する癌抑制遺伝子は前立腺癌の進行に関与することが示唆されるが、何故病期Cの例で1例も異常を見な

かったのかは不明である。

MSI：MSIは今回検索した69例のうち病期Dの2例で全てのマーカーで認められた（2.9%）。また5例では1つのマーカーのみにMSIを見た（図3）。

No. 52
N T Li



D16S402

図3 MSIを示した例 N：正常組織，T：原発巣，Li：肝転移巣 下段に染色体マーカー番号を示す

IV. 考 察

癌の遺伝子変化については臓器特異性があり、p53 [3] や *PTEN/MMAC1* 遺伝子などは多数の臓器で共通にその変異が見られる [13-15] もの、その他の癌遺伝子や癌抑制遺伝子については一部の臓器のみにその変異を認められている。前立腺癌においては既知の癌遺伝子や癌抑制遺伝子のうち、*ras*, p53, *PTEN/MMAC1*, アンドロゲン受容体の遺伝子変異が知られている [16-19]。しかしながら、大腸癌や肺癌などに比較して前立腺癌の遺伝子変化に関する知見は少ない。そこで未知の癌抑制遺伝子の前立腺癌の進展における役割を知る目的で第8, 10, 16染色体のLOHについて検索した。

検索した3染色体とも病期の進行に応じて有意にLOHの割合が上昇した。しかしながら第8および16染色体では病期BからLOHを見たのに対して、第10染色体では病期C以降にLOHが見られており、第10染色体上の癌抑制遺伝子は癌の進行のかなり後期よりその異常がおきるものと推察された。最近米国の2つのグループより新しい癌抑制遺伝子 *PTEN/MMAC1* が、今回検索した領域に含まれる10q23.3の領域より positional cloning されており [14, 15]、その後の研究によ

りこの遺伝子が転移病期などの進行性前立腺癌で変異していることが報告されている [16, 17]。従って、前立腺癌の進行に関与する第10染色体上の癌抑制遺伝子が *PTEN/MMAC1* だとすれば、本報告で示された結果は以前の報告と矛盾しないものと思われる。また *PTEN/MMAC1* はホルモン不応性癌の腫瘍移植片でメチル化されて失活していることも知られており [20]、今後さらなる検討を要するものと考えられる。

また第8染色体短腕8p22-21.3の領域から PDGF 受容体と homology を有する PRLTS 遺伝子がクローニングされた [21]。しかしながら当教室での以前の実験では前立腺癌において PRLTS 遺伝子の変異は稀であり [22]、特にその進展についての関与はないものと考えられた。まだ候補遺伝子のクローニングされていない第16染色体長腕と合わせて、今後これらの領域に存在する癌抑制遺伝子のクローニングが必要であろう。

MSI は DNA 修復遺伝子の破綻を意味しており、遺伝性の非ポリポージス大腸癌やある種の散発性癌に見受けられる [23, 24]。前立腺癌では一般に MSI の頻度は比較的低いものとされている。今回の検索症例のうち転移性病期で癌死された2例に検索したすべてのマーカー部位で MSI を見た。これらの例では当教室での以前の報告でアンドロゲン受容体遺伝子変異を認めており [18]、非常にゲノム不安定性が増しており、その一環として LOH が見られたものと推定された。

前立腺癌の腫瘍マーカーとして前立腺特異抗原は特異性・感受性ともに高く、既に臨床の現場において広く使用されているが [25]、症例の予後因子もしくは進展・転移の目安となりうる指標は見いだされていない。本研究から前立腺癌の進行および転移に第8, 10, 16染色体の欠失つまりこれらの染色体上に存在が予想される癌抑制遺伝子は重要な役割を演じているものと考えられた。またこれらの染色体欠失は前立腺癌患者の予後や進展の可能性を把握するのに有効な指標となりうるものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました恩師千葉大学医学部泌尿器科学講座伊藤晴夫教授に深甚なる感謝を申し上げます。また、直接御指導・御援助いただいた教室の赤倉功一郎講師、鈴木啓悦助手に感謝申し上げます。

SUMMARY

To evaluate the relationship between the progression and/or metastasis of human prostate cancer and allelic losses of chromosomes 8, 10, and 16, this study screened a unique set of prostate cancer tissues representing the specimens of clinical prostate cancer from organ confined to metastatic lethal disease. Genomic DNAs extracted from cancer tissues and corresponding normal tissues were analyzed by PCR-LOH method with each 2-4 microsatellite markers on chromosomes 8, 10, and 16. The significant association between each chromosomal loss and clinical stage of the specimens was observed, while no relationship was found between histological differentiation and chromosomal losses. Since frequent allelic losses at specific chromosomal loci in several types of human cancer have implied the presence of putative tumor suppressor genes in the regions where deletions were detected, this study suggests that putative tumor suppressor genes on the chromosomes examined here play an important role of the progression and/or metastasis of prostate cancer. Therefore, allelic losses on these chromosomes can be useful markers to predict and grasp clinical course of prostate cancer patients.

文 献

- 1) Rarker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. CA Cancer J Clin 1997; 47: 5-27.
- 2) Fearon ER, Vogelstein V. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-67.
- 3) Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. Nature 1991; 351: 453-6.
- 4) Spuck CH III, Gonzales-Zulueta M, Shibata A, Simoneau AR, Lin M-F, Gonzales F, Tsai YC, Jones PA. p16 gene in uncultured tumors. Nature 1994; 370: 183-4.
- 5) Marshall CJ. Tumor suppressor genes. Cell 1991; 64: 313-26.

- 6) Bova GS, Carter BS, Bussemakers MJG, Emi M, Fujiwara Y, Kyprianou N, Jacobs SC, Robinson JC, Epstein JI, Walsh PC, Isaacs WB. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3869-73.
- 7) Suzuki H, Emi M, Komiya A, Fujiwara Y, Yatani R, Nakamura Y, Shimazaki J. Localization of a tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2-Mb region of 8p22-21.3. *Genes Chromosome Cancer* 1995; 13: 168-74.
- 8) Komiya A, Suzuki H, Ueda T, Yatani R, Emi M, Ito H, Shimazaki J. Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes Chromosome Cancer* 1996; 17: 245-53.
- 9) Suzuki H, Komiya A, Emi M, Kuramochi H, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J. Three distinct commonly deleted regions of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancers. *Genes Chromosome Cancer* 1996; 17: 225-33.
- 10) Bergerheim US, Kunimi K, Collins VP, Ekman P. Deletion mapping of chromosomes 8, 10, and 16 in human prostatic carcinoma. *Genes Chromosome Cancer* 1991; 3: 215-20.
- 11) Suzuki H, Sato N, Watabe Y, Masai M, Seino S, Shimazaki J. Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 46: 759-65.
- 12) Ueda T, Komiya A, Emi M, Suzuki H, Shiraishi T, Yatani R, Masai M, Yasuda K, Ito H. Allelic losses on 18q21 are associated with progression and metastasis in human prostate cancer. *Genes Chromosome Cancer* 1997; 20: 140-7.
- 13) Suzuki H, Freije D, Nusskern DR, Okami K, Cairns P, Sidransky D, Isaacs WB, Bova GS. Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Res* 1998; 58: 204-9.
- 14) Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WKA, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DHF, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15: 356-62.
- 15) Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombi R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate. *Science* 1997; 275: 1943-7.
- 16) Cairns P, Okami K, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J, Isaacs WB, Bova GS, Sidransky D. Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 4997-5000.
- 17) Suzuki H, Komiya A, Aida S, Ito H, Yatani R, Shimazaki J. Detection of human papillomavirus DNA and p53 gene mutations in human prostate cancer. *Prostate* 1996; 28: 318-24.
- 18) Suzuki H, Akakura K, Komiya A, Aida S, Akimoto S, Shimazaki J. Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: Relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *Prostate* 1996; 29: 153-8.
- 19) Suzuki H, Aida S, Akimoto S, Igarashi T, Yatani R, Shimazaki J. State of adenomatous polyposis coli gene and ras oncogenes in Japanese prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85: 847-52.
- 20) Whang YE, Wu X, Suzuki H, Reiter RE, Tran C, Vessella RL, Said JW, Isaacs WB, Sawyres CL. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5246-50.
- 21) Fujiwara Y, Ohata H, Kuroki T, Koyama K, Tsuchiya E, Monden M, Nakamura Y. Isolation of a candidate tumor suppressor gene on chromosome 8p21.3-p22 that is homologous to an extracellular domain of the PDGF receptor beta gene. *Oncogene* 10: 891-895, 1995.
- 22) Komiya A, Suzuki H, Ueda T, Aida S, Ito N, Shiraishi T, Yatani R, Emi M, Yasuda K, Shimazaki J, Ito H. PRLTS gene alterations in human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 389-93.
- 23) Parsons R, Li G-M, Longley MJ, Fang W-H, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein V. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993; 75: 1227-36.
- 24) Suzuki H, Komiya A, Aida S, Akimoto S, Shiraishi T, Yatani R, Igarashi T, Shimazaki J. Microsatellite instability and other molecular abnormalities in human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 956-61.
- 25) Oesterling JE. Prostatic specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 1991; 145: 907-23.