

グリオーマ細胞株におけるがん抑制遺伝子変化の解析

新潟大学脳研究所分子神経病理

張 淑靖・熊西 敏郎

Analysis of Tumor Suppressor Gene Alterations in Human Glioma Cell Lines

Shu-Jing ZHANG and Toshiro KUMANISHI

*Department of Molecular Neuropathology,
Brain Research Institute, Niigata University*

Ten glioma cell lines were examined for alterations of the p 16, p 15 and p 53 genes, which were tumor suppressor genes with direct or indirect CDK inhibitory functions. All the cell lines showed abnormalities in at least 1 gene, often in 2 or 3 genes coincidentally, suggesting that dysfunction of these genes is closely related to glioma cell growth. On examination of the primary tumor tissues, the same alterations of the p 16/p 15 and p 53 genes as detected in the cell lines were demonstrated in all 6 cases examined, p 16/p 15 gene deletion in 1, p 16 gene mutation in 1 and p 53 gene mutations in 5 cases. This suggested that the p 16/p 15 and p 53 gene alterations and their combinations in at least some glioma cell lines reflected those in the primary glioma tissues.

Key words: Glioma, Brain tumor, Tumor suppressor gene, p 16 gene, p 15 gene, p 53 gene, p 21 gene
グリオーマ, 脳腫瘍, がん抑制遺伝子, p 16 遺伝子, p 15 遺伝子, p 53 遺伝子, p 21 遺伝子

はじめに

p 53 がん抑制遺伝子は染色体 17p13.1 に局在し, 11 exon からなり, p 53 蛋白を encode する¹⁾⁻⁴⁾. p 53 蛋白は p 21 (Waf1, CIP1, Sd1, MDA6, CA20) 遺伝子の転写を促進する⁵⁾ことによって細胞増殖を制御する. この p 21 遺伝子は染色体 6p21 に局在する CDK (cyclin-dependent kinase) 抑制遺伝子であるが, その遺伝子

産物, p 21 蛋白は種々の CDK と PCNA (proliferating cell nuclear antigen) に結合し, 不活化することによって細胞増殖を抑制する⁵⁾⁻⁷⁾. 種々のヒト腫瘍では p 53 遺伝子変異は系統発生的に高度に保存された domain 2-5 を含む exon 5-8 に主に検出される⁸⁾. 他方, より最近になって分離された p 16 (MTS1, INK4, INK4A, CDKN2) 遺伝子もがん抑制遺伝子の候補であるが, それは染色体 9p21 に局在し, 3 exon からなり, その遺

Reprint requests to: Toshiro KUMANISHI,
Department of Molecular Neuropathology,
Brain Research Institute, Niigata
University, Asahimachi-dori 1,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所分子神経病理
熊西 敏郎

伝子産物, p16 蛋白は G1 期に CDK4 および CDK6 の活性を阻害し細胞増殖を抑制する⁹⁾⁻¹³⁾. p16 遺伝子の変化も種々のヒト腫瘍に広く認められるが, その変化は通常欠失であり⁹⁾¹⁰⁾¹⁴⁾⁻²¹⁾, しばしばこの遺伝子の近くに局在し構造的および機能的類似性を持った p15 遺伝子の欠失を伴う⁹⁾¹²⁾¹³⁾²¹⁾⁻²³⁾. 他のがん関連遺伝子に比べると p53 と p16/p15 遺伝子変化はいろいろの腫瘍型で高頻度に認められ, これらの遺伝子の不活化が多くの腫瘍の発がんに重要な役割を果たすことが示唆される. しかし, 個々の腫瘍におけるこれらの遺伝子変化の相互関係はグリオーマを含めた多くの腫瘍でほとんど解析されていない.

本研究ではヒトグリオーマ細胞株10株を対象に p16, p15, p53, p21 遺伝子の変化についての検索を行った. いくつかの株では原腫瘍の p16, p15, p53 遺伝子の変化についても検索し細胞株の変化と比較した.

材料と方法

グリオーマ細胞株:

検索対象のグリオーマ株としては本研究所で樹立された9株 (case 1-6, 8-10)²⁴⁾⁻²⁶⁾ 及び U251MG²⁷⁾ を用いた (表 1).

DNA 抽出:

DNA の抽出は培養株と凍結組織の場合は Blin と Stafford の方法²⁸⁾ により, また paraffin 包埋組織の場合は Goelz らの方法²⁹⁾ により行った.

Southern blot 法:

p16 及び p15 遺伝子欠失の検索では EcoRI 消化 DNA 10 µg を電気泳動し, ニトロセルロースに転写後³⁰⁾, ³²P 標識 probe にて hybridization を行った³¹⁾. probe には PCR にて増幅した p16 遺伝子の exon 1, 2, 3 を用いた (表 2). p15 遺伝子欠失の検索は p15 遺伝

表 1 ヒトグリオーマ細胞株における遺伝子変化のまとめ

| Case No | Primary tumors | | | Genetic alterations in cell lines | | | |
|---------|------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|
| | Age /sex ^{a)} | Site of tumor ^{b)} | Pathological diagnosis | p16 ^{c)} | p15 ^{d)} | p53 ^{e)} | p21 ^{f)} |
| 4 | 63/M | lt.F | anaplastic glioma | del | del | 237 (Met-Ile) ^{g)} | - (C/C) |
| 5 | 27/M | rt.P | anaplastic glioma | del ^{g)} | del ^{g)} | 273 (Arg-Cys) ^{g)} | - (C/A) |
| 7 | 75/M | P | glioblastoma | del | del | 273 (Arg-His) | - (C/C) |
| 8 | 62/M | lt.T | anaplastic glioma | del | del | 273 (Arg-Cys) | - (C/C) |
| 9 | 51/M | rt.T | anaplastic glioma | del | del | - | - (C/A) |
| 10 | 58/M | lt.T | anaplastic glioma | del | del | - | - (C/C) |
| 2 | 64/M | lt.F | anaplastic glioma | del | - | Intron 9 (Splice) ^{g)} | - (A/A) |
| 1 | 38/F | lt.T | anaplastic glioma | 83 (His-Tyr) ^{g)} | - | del | - (C/A) |
| 3 | 64/F | rt.P | glioblastoma | - | - | 245 (Gly-Ser) ^{g)} | - (C/A) |
| 6 | 62/M | lt.P | anaplastic glioma | - | - | 273 (Arg-Cys) ^{g)} | - (A/A) |

a) Age, 年齢; M, 男; F, 女.

b) rt, 右; lt, 左; F, 前頭葉; P, 頭頂葉; T, 側頭葉.

c) del, homozygous 欠失; 83, missense 変異の見られた codon; -, homozygous 欠失, 変異なし.

d) del, homozygous 欠失; -, homozygous 欠失, 変異なし.

e) del, homozygous 欠失; 237, 245, 273, 変異の見られた codon; Intron 9 (Splice), Intron 9 の splice donor site の変異 (gt-tt); -, homozygous 欠失, 変異なし. 変異の見られた細胞株の全てに SSCP で LOH が示唆された. データの一部は報告済み⁴⁾.

f) -, homozygous 欠失, 変異なし; () に codon 31 の polymorphism を示す. C/C, homozygous AGC; A/A, homozygous AGA; C/A, heterozygous AGC/AGA.

g) 原腫瘍の検索で培養細胞と同じ遺伝子変化の見られたもの. ただし原腫瘍での対立遺伝子の状態は確定困難.

表 2 用いた primers

| Gene/Exon | | Primer sequence | Size/Product |
|-----------|-----------|---------------------------------|--------------|
| p 16 | | | |
| 1 | sense | 5'-GAAGAAAGAGGAGGGGCTG-3' | 340 bp |
| | antisense | 5'-GCGCTACCTGATTCCAATTC-3' | |
| 2 | sense | 5'-GGCTCTACACAAGCTTCCTT-3' | 429 bp |
| | antisense | 5'-TGAGCTTTGGAAGCTCTCAG-3' | |
| 2(5') | sense | 5'-GGCTCTACACAAGCTTCCTT-3' | 208 bp |
| | antisense | 5'-CCACCAGCGTGTCCAGGAA-3' | |
| 2(3') | sense | 5'-ACTCTACCCGACCCGTGCA-3' | 279 bp |
| | antisense | 5'-TGAGCTTTGGAAGCTCTCAG-3' | |
| 3 | sense | 5'-CCCGCTTTCGTAGTTTTCAT-3' | 355 bp |
| | antisense | 5'-TTATTTGAGCTTTGGTTCTG-3' | |
| p 15 | | | |
| 1 | sense | 5'-GTGGGAAAGAAGGAAGAG-3' | 313 bp |
| | antisense | 5'-TTCCAGCCCCGATCCGCCG-3' | |
| 2 | sense | 5'-TGAGTTTAACTGAAGGTGG-3' | 521 bp |
| | antisense | 5'-GGGTGGGAAATTGGGTAAG-3' | |
| p 21 | | | |
| 2 | sense | 5'-GGCGCCATGTCAGAACCGGC-3' | 447 bp |
| | antisense | 5'-CATGCTGGTCTGCCGCCGTTTTTCG-3' | |
| 2(5') | sense | 5'-GGCGCCATGTCAGAACCGGC-3' | 235 bp |
| | antisense | 5'-AGAGCTTGGGCAGGCCAAGG-3' | |
| 2(3') | sense | 5'-CTTCGCCTGGGAGCGTGTGC-3' | 256 bp |
| | antisense | 5'-CATGCTGGTCTGCCGCCGTTTTTCG-3' | |
| p 53 | | | |
| 4 | sense | 5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3' | 296 bp |
| | antisense | 5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3' | |
| 5 | sense | 5'-TGTTCACTTGTGCCCTGACT-3' | 310 bp |
| | antisense | 5'-AGCAATCAGTGAGGAATCAG-3' | |
| 6 | sense | 5'-GCCTCTGATTCCCTCACTGAT-3' | 181 bp |
| | antisense | 5'-TTAACCCTCCTCCAGAGA-3' | |
| 7 | sense | 5'-AGGCGCACTGGCCTCATCTT-3' | 177 bp |
| | antisense | 5'-TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC-3' | |
| 8 | sense | 5'-TTCCTTACTGCCTCTTGCTT-3' | 231 bp |
| | antisense | 5'-AGGCATAACTGCACCCTTGG-3' | |
| 8-9 | sense | 5'-TTGGGAGTAGATGGAGCCT-3' | 445 bp |
| | antisense | 5'-AGTGTTAGACTGGAAACTTT-3' | |

Southern blot の probe の作製および PCR-SSCP に用いたもの. p 16 exon 2 および p 21 exon 2 の PCR-SSCP は 5' half と 3' half に分けて検索した. (5'), 5' half; (3'), 3' half.

子の exon 2 と p16 遺伝子の exon 2 の homology が高いことから⁹⁾³²⁾ p16 exon 2 probe を用いて行った。対照 probe としては S100 β cDNA³³⁾ を用いた。

p16 遺伝子の 5' CpG island のメチル化の有無についての検索は Merlo らの方法³⁴⁾ にて行った。これには EcoR I とメチル化感受性酵素、Sma I または Sac II、にて重複消化した DNA の Southern blot を p16 exon 1 probe にて検索した。メチル化の有無はメチル化感受性酵素による小 DNA 断片 (EcoR I/Sma I 消化の場合は 0.45 kbp と 0.65 kbp, EcoR I/Sac II 消化の場合は 0.3 kbp と 3.3 kbp) の出現の有無で判定した。

p21 遺伝子の検索は EcoR I 消化 DNA の Southern blot に対して PCR にて増幅した p21 exon 2 を probe として行った³⁵⁾ (表 2)。

p53 遺伝子欠失の検索は 1 例 (case 1) で行ったが、これには BamH I または EcoR I 消化 DNA の blot に対して p53 exon 4-6 に対応する p53 cDNA を probe に用いて行った。

PCR 法:

PCR 法は高分子 DNA 100 ng または Paraffin 切片由来の DNA 1 μ g を template として増幅した。p16 遺伝子の検索では exon 1 と exon 3 は全長を、また exon 2 は 5' 前半部と 3' 後半部に分けて、増幅した。p15 遺伝子の exon 1 と exon 2, p21 遺伝子の exon 2, p53 遺伝子の exon 4-9 については、それぞれ全長を増幅した (表 2)。増幅した DNA はポリアクリルアミドゲルにて精製し下記 SSCP 及び塩基配列解析に用いた。

SSCP 法:

まず上記 PCR 産物を template として第 2 回 PCR を行った。第 2 回 PCR では反応液に [α -³²P]-dATP を加え、非標識 dATP 量を 1/5 として、標識しつつ増幅した³¹⁾。それぞれの遺伝子の exon の増幅は上記第 1 回 PCR と同様の primer を用いて行ったが、p21 exon 2 は 5' 前半部と 3' 後半部に分けて増幅した (表 2)。SSCP ではこれらの PCR 産物に 95 $^{\circ}$ C, 5 分の熱変性を加え、6% polyacrylamide gel にて 4 $^{\circ}$ C で電気泳動し、X線フィルムにてバンドの移動度を解析した³¹⁾。

塩基解析:

PCR 産物を pUC118 の Sma I site に挿入し、JM 109 にて増殖、精製し、得られた plasmid clone を deoxy 法にて塩基解析した。

Northern blot 法:

p16 mRNA の Northern blot 解析は total RNA 10

μ g を 1.3% agarose gel にて電気泳動し、転写後、³²P 標識 p16 exon 1 probe を用いて行った。

結 果

p16, p15 遺伝子の欠失の解析:

p16, p15 遺伝子欠失の検索は p16 exon 1, 2, 3 probe を用いて Southern blot 法にて行った。p16 遺伝子は対照の胎盤 DNA でみると p16 exon 1 probe では 4.3 kbp (図 1) の、また p16 exon 3 probe では 4.0 kbp のバンドとして検出された。また p16 exon 2 probe では p16 遺伝子は 4.0 kbp バンドとして、また p15 遺伝子は 5.6 kbp バンドとして検出された (図 1)。これに対してグリオーマ細胞株の検索では 7 株 (case 2, 4, 5, 7-10) で p16 遺伝子のバンドはいずれの probe でも認められず (図 1), p16 遺伝子の全ての exon を含む広範な領域に亘る homozygous な欠失と考えられた (表 1)。残りの 3 株 (case 1, 3, 6) ではいずれの probe でも p16 遺伝子のバンドが認められた。p16 遺伝子の homozygous な欠失の見られた 7 株のうち 6 株 (case 4, 5, 7-10) では p16 exon 2 probe での検索で p15 遺伝子の homozygous 欠失も認められた (表 1, 図 1)。即ち p15 遺伝子に対応する 5.6 kbp のバンドが他の 4 例で明白に (case 1, 3, 6) あるいは弱いながら (case 2) 認められるのに対して、これらの 6 例では認められなかった。したがって、これらのグリオーマ株では p16 と p15 遺伝子のいずれも homozygous 欠失により高頻度に失活しているものと思われた。表 1 にこれらの結果を他の検索結果と合せ記載した。

p16, p15 遺伝子の変異の解析:

p16, p15 遺伝子に homozygous 欠失の認められなかった 4 株 (case 1-3, 6) を対象に PCR-SSCP を行い、変異の検索をした。その結果、3 株 (case 2, 3, 6) では p16 exon 1-3, p15 exon 1, 2 のいずれにも異常は見られなかったが、1 株 (case 1) では p16 exon 2 の SSCP で異常バンドが認められ、変異が示唆された (図略)。また正常バンドが認められないことからこの例では LOH を伴うものと思われた。PCR クローンの塩基解析をしたところ実際に p16 遺伝子 exon 2 の codon 83 に missense 変異 (CAC-TAC, His-Tyr) が認められ、それは検索した 9 クローンの全てに検出された (表 1, 図略)。p16 遺伝子の codon 83 の変異では機能的失活を伴うことが既に知られている³⁶⁾。したがって、この例の結果を含めると p16 遺伝子の不活化が 8 株 (homozygous 欠失 7 株, 変異 1 株) に、また p

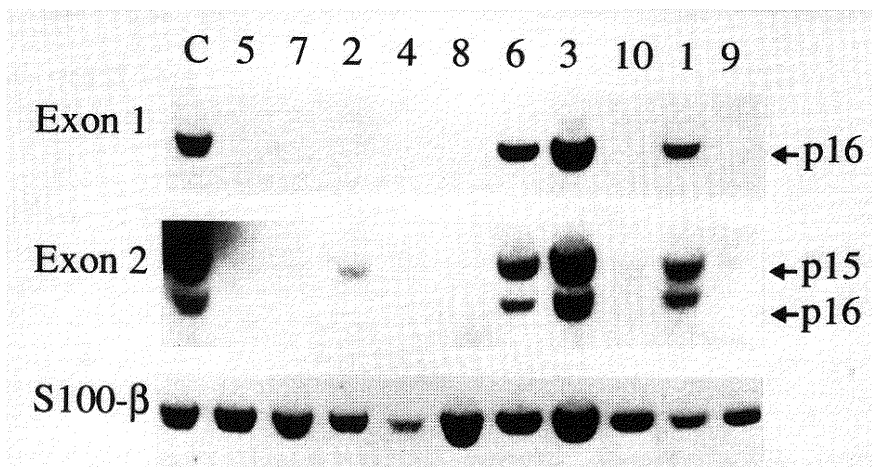


図1 グリオーマ細胞株における p16 及び p15 遺伝子の Southern blot 解析

EcoRI 消化 DNA の blot を p16 exon 1 probe または p16 exon 2 probe にて解析. いずれの probe でも p16 遺伝子のバンドは 3 株 (case 1, 3, 6) で見られるが, 残りの 7 株 (case 2, 4, 5, 7-10) では認められない. p16 exon 3 probe でも同様の結果であった (図略). p16 exon 2 probe を用いた検索では cross-hybridization によって p15 遺伝子も検出可能であり, 3 株 (case 1, 3, 6) では明白に, 1 株 (case 2) では弱く認められたが, 残りの 6 株 (case 4, 5, 7-10) では認められなかった. S100 β , internal control. C, control 胎盤 DNA.

15 遺伝子の不活化が 6 株 (homozygous 欠失) に検出されたことになる (表 1).

5' CpG island methylation の検索:

p16 遺伝子に homozygous 欠失が見られなかった 3 株ではメチル化感受性酵素を用いた Southern blot 解析を行い, 5' CpG island のメチル化の有無についての検索を行った. しかし, いずれの株でも 5' CpG island を含む EcoRI 断片はメチル化感受性酵素, SmaI または SacII, によって更に消化されることから 5' CpG island にはメチル化はないものと考えられた (図略). また, これらの株を p16 exon 1 probe を用いて Northern blot 解析を行ったところ, いずれにも p16 mRNA のバンドが認められ (図略), 上記 Southern blot 解析の結果に合致した.

p53 遺伝子の解析:

PCR-SSCP と塩基解析により 6 株 (case 3-8) に missense 変異, 1 株 (case 2) に splice 変異が認められた (表 1). その結果の一部は既に報告した⁴⁾. missense 変異は全て高度保存領域内の hot spot codon⁸⁾ に, またはそれに近接して, 認められ, p53 蛋白の機能的異常が示唆された. splice 変異の 1 株では実際に

mRNA 解析で異常 splicing が検出された⁴⁾. 更に, 他の 1 株 (case 1) では PCR にて exon 4-9 のいずれも増幅されず⁴⁾, また Southern blot 解析では exon 4-6 に対応する p53 cDNA probe でバンドが検出されなかった (図 2). したがって, この株では p53 遺伝子の広い範囲に亘る homozygous 欠失が強く示唆された. これらの結果から 10 株中 8 株が p53 遺伝子の機能的な不活化を伴うものと思われた (表 1).

p21 遺伝子の解析:

p21 exon 2 probe を用いた Southern blot 解析では EcoRI 消化で 9 kbp の単一バンドが全ての株で認められた (図略). また PCR-SSCP と塩基配列解析は 90% の coding 領域を含む exon 2 を対象に行ったが, p53 遺伝子変化の認められなかった 2 株を含めて, いずれの株にも異常は認められなかった (表 1). しかし, polymorphism³⁷⁾ が codon 31 に認められ, それは 4 株で homozygous AGC, 2 株で homozygous AGA, 4 株で heterozygous AGC/AGA であった (表 1).

原腫瘍の検索:

一部の例では原腫瘍の p16/p15 及び p53 遺伝子の検索も行った. p16/p15 の検索は細胞株で両遺伝子の

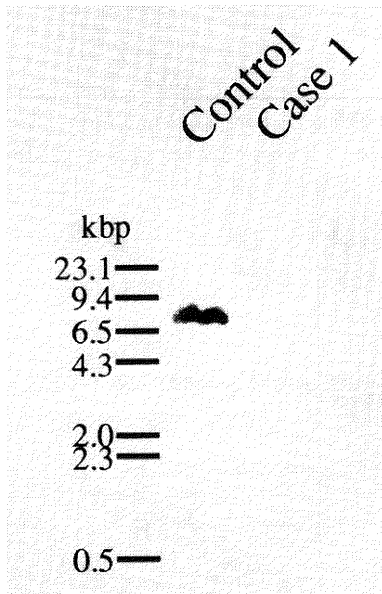


図2 p53遺伝子の Southern blot 解析

グリオーマ細胞株 (case 1) の BamHI 消化 DNA の blot を p53 cDNA probe にて解析。明白なバンドが認められず, homozygous 欠失が示唆された。EcoRI 消化 DNA の blot でも同じ結果であった (図略)。control, 胎盤 DNA。

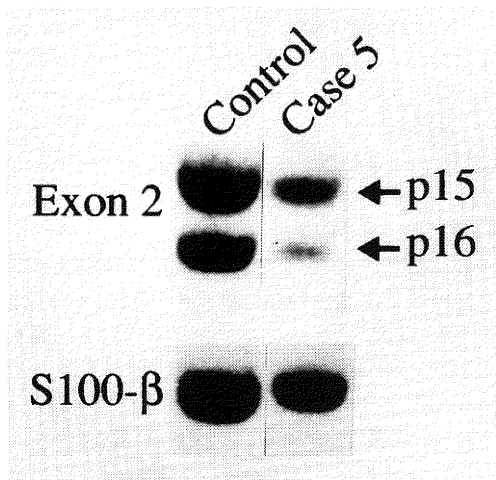


図3 グリオーマ原腫瘍組織 (case 1) の解析

EcoRI 消化 DNA の blot を p16 exon 2 probe で解析。control に比べてグリオーマ原腫瘍組織では p16, p15 遺伝子のバンドが減弱して見られた。S100 β, internal control。

homozygous 欠失を認めた1例 (case 5) 及び p16 遺伝子に missense 変異を認めた1例について行った。前者では Southern blot 解析を p16 exon 2 probe を用いて行ったが, p16 及び p15 のいずれのバンドも対照に比べて減弱して認められた (表1, 図3)。後者では paraffin 切片から PCR クローンを分離して塩基解析を行ったが, 培養株同様の codon 83 の missense 変異 (CAC-TAC, His-Tyr) が4クローン中2クローンに検出された (表1, 図略)。一方, 原腫瘍の p53 遺伝子の検索は5例 (case 2-6) で行ったが, 培養株と同様の missense 変異 (case 3-6) 又は splice 変異 (case 2) が全例で検出された⁴⁾ (表1)。これらの原腫瘍の検索では正常組織の混在が考えられ, 対立遺伝子の状態を明確にすることができなかったが, 検索した全ての原腫瘍に培養株と同一の遺伝子異常が検出されたことから, 培養株中の遺伝子変化は原腫瘍に由来することが強く示唆された。

考 察

本研究では grade 3 または4の悪性グリオーマ由来の培養細胞株10株を対象に p16, p15, p53, p21 遺伝子の検索を行った。p16, p15, p53 遺伝子の検索ではそれぞれの遺伝子でその変化が高頻度に認められ, 検索した全ての培養株で遺伝子異常が少なくとも1遺伝子に, しばしば2又は3遺伝子に併発して, 認められた (表1)。p16 と p15 遺伝子変化の併発は種々の細胞株や腫瘍で報告されているが⁹⁾¹²⁾¹³⁾²¹⁾²³⁾, これらの遺伝子変化と p53 遺伝子変化の併発は通常稀である¹⁵⁾³⁸⁾。したがって, これら3遺伝子の高頻度な変化あるいはそれらの高頻度な併発はグリオーマ細胞株の特徴と思われる。これらの遺伝子変化がグリオーマ細胞増殖に密接に関与することを示唆するものと思われた。Arap ら³²⁾ は p16 と p53 遺伝子をグリオーマ株で検索し, 同様の結果を得ている。本研究では p16, p15, p53 の3遺伝子の変化を示す株がもっとも高頻度であったが, 株によっては遺伝子変化が p16/p15 のみのもの, p53 のみのもの, p16/p53 のみのものも認められた (表1)。このことから, これらの遺伝子変化の時間的な出現順序は症例によって種々であることが示唆された。

p16 遺伝子の検索では homozygous 欠失が高頻度に認められ, それは既報のグリオーマ細胞株⁹⁾¹⁰⁾¹⁸⁾³²⁾, グリオーマ腫瘍組織¹⁷⁾²¹⁾³⁹⁾⁴⁰⁾, 異種移植グリオーマ腫瘍組織¹⁷⁾ でみられた結果に一致した。更に, われわれの株の中には missense 変異を示す例も認められた。p16

遺伝子の変異は一般に稀であり、グリオーマでは報告されていない。しかしある特定の腫瘍^{16)41)–43)}では種々の変異が認められ、いくつかに関しては CDK 抑制活性に及ぼす効果が *in vitro* assay 法で検索されている³⁶⁾⁴⁴⁾。Yang ら³⁶⁾はわれわれの培養株でみられた codon 83 の変異を含めた数種の変異を検索し、変異の効果は軽度のものから高度のものまで種々であること、その中で codon 83 の変異は高度な変異効果を示し、その CDK 抑制活性は正常遺伝子の 8% にまで減弱すること、などをみている。また、この変異では p16 蛋白の半減期が減少することも知られている⁴⁵⁾。われわれの培養株では対立遺伝子の欠失も認められた。これらのことを合わせ考えるとこの株の p16 遺伝子はこの変異により強く失活しているものと思われた。

本研究では p16 遺伝子の homozygous 欠失を示さなかった 3 株を対象にこの遺伝子の 5' CpG island のメチル化の有無についても検索した。5' CpG island のメチル化は p16 遺伝子の不活化の重要な機序の 1 つであることが最近の研究で示されている³⁴⁾。Merlo ら³⁴⁾はこの遺伝子の 5' CpG island がメチル化されている時には転写が阻止されていることを報告している。彼らは 5' CpG island のメチル化による p16 mRNA 発現の消失を種々のがん細胞株の 40~80% で見ている。より低頻度であるが 5' CpG island のメチル化はグリオーマ組織を含めた原腫瘍でも 20~30% の例で見られるものがあるという。しかし、われわれの 3 株では 5' CpG island のメチル化による p16 遺伝子の不活化は検出されなかった。

現在まで、p53 遺伝子変化は多くの腫瘍で報告されているが、そのほとんどは遺伝子内の変異である。われわれのグリオーマ株でも変異が高頻度に認められた。しかし、p53 遺伝子の homozygous 欠失を示す株も認められ、その欠失領域は広範囲に及ぶものと思われた。このような広範囲に及ぶ p53 遺伝子の homozygous 欠失は極めて稀であり⁴⁶⁾、グリオーマ株ではいまだ報告されていない。このような株では、変異 p53 遺伝子を導入すれば、その蛋白機能を heteromeric な p53 蛋白の形成なしに解析することが可能であり、実用的にも有用と思われた。

p53 遺伝子による細胞増殖調節は p21 遺伝子を介して行われるので⁵⁾、p21 遺伝子の変化は p53 変異と同じ効果を持つと考えられる。しかし、我々のグリオーマ株では p53 遺伝子変化を認めなかった 2 株を含めて

p21 遺伝子の変化は codon 31 の polymorphism 以外は認められなかった。同様の所見は他の種々の腫瘍でも報告されている³⁷⁾。

本研究ではグリオーマ培養株が由来する原腫瘍についても p16, p15, p53 遺伝子の検索を行った。p16/p15 遺伝子検索は 2 例の原腫瘍で行ったが、1 例の原腫瘍では細胞株と同様に p16/p15 遺伝子欠失が認められた。他の 1 例でも培養株で見られたと同様の missense 変異が認められた。一方、p53 遺伝子の検索は 5 例の原腫瘍で行ったが、培養株と同様の変異が全例で検出された⁴⁾。原腫瘍の検索では正常組織の混在の可能性があり、対立遺伝子の状態は不明白であったが、これらの結果から培養株で見られた p16, p15, p53 遺伝子の変化とその組合せは原腫瘍のそれを反映するものと思われた。したがって、これらの培養株を p16, p15, p53 遺伝子変化と他のがん関連遺伝子⁴⁷⁾の関心の詳細な解析に用いればグリオーマの多段階発がんや progression の実体を知る上で有用な情報が得られるものと思われた。

ま と め

ヒトグリオーマ株 10 株を対象にがん抑制遺伝子又はその候補である p16, p15, p53, p21 遺伝子の変化を検索した。遺伝子変化は p16, p15, p53 で高頻度に見られたが、p21 遺伝子では認められなかった。p16, p15, p53 遺伝子に関しては全ての培養株でその異常が少なくとも 1 遺伝子に、しばしば 2 または 3 遺伝子に同時に認められ、これらの遺伝子の異常がグリオーマ細胞の増殖に密接に関与することが示唆された。これらの 3 遺伝子の同時的变化がもっとも高頻度であったが、細胞株によっては変化が p16/p15 のみのもの、p53 のみのもの、p16/p53 のみのものも認められ、これらの遺伝子変化の順序は症例によって異なることが示唆された。検索した細胞株の中では p53 遺伝子の homozygous 欠失を伴った 1 株が今後の p53 遺伝子導入実験に有用と思われた。原腫瘍の検索では培養株に見られたと同様の p16/p15 及び p53 遺伝子の変化が検索した 6 例全例で認められた。このことから培養株で見られた p16/p15 及び p53 遺伝子変化とその組合せは原腫瘍のそれらを反映するものと思われた。

謝 辞

本研究は平成 5 年度新潟大学医学研究助成金（有壬基金）を受けておこなった。

参 考 文 献

- 1) **Batra, S.K., Rasheed, B.K.A., Bigner, S.H. and Bigner, D.D.**: Oncogenes and antioncogenes in human central nervous system tumors. *Lab. Invest.*, **71**: 621~637, 1994.
- 2) **Zhang, S.-J., Feng, X.-L., Koga, H., Ichikawa, T., Abe, S. and Kumanishi, T.**: p53 gene mutations in pontine gliomas of juvenile onset. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **196**: 851~857, 1993.
- 3) **Koga, H., Zhang, S.-J., Kumanishi, T., Washiyama, K., Ichikawa, T., Tanaka, R. and Mukawa, J.**: Analysis of p53 gene mutations in low- and high-grade astrocytomas by polymerase chain reaction-assisted single-strand conformation polymorphism and immunohistochemistry. *Acta Neuropathol.*, **87**: 225~232, 1994.
- 4) **Koga, H., Zhang, S.-J., Washiyama, K., Ichikawa, T., Onda, K. and Kumanishi, T.**: Analysis of p53 gene mutations in human glioma cell lines. *Brain Tumor Pathol.*, **13**: 1~10, 1996.
- 5) **El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.**: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**: 817~825, 1993.
- 6) **Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B.**: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, **369**: 574~578, 1994.
- 7) **Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D.**: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**: 701~704, 1993.
- 8) **Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C.**: p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**: 49~53, 1991.
- 9) **Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitgian, S.V., Stockert, E., Day, R.S. III., Johnson, B.E. and Skolnick, M.H.**: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, **264**: 436~440, 1994.
- 10) **Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K. and Carson, D.A.**: Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, **368**: 753~756, 1994.
- 11) **Serrano, M., Hannon, G.J. and Beach, D.**: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366**: 704~707, 1993.
- 12) **Hannon, G.J. and Beach, D.**: p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest. *Nature*, **371**: 257~261, 1994.
- 13) **Guan, K.-L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G. and Xiong, Y.**: Growth suppression by p18, a p16^{INK4/MTS1}- and p14^{INK4B/MTS2}-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.*, **8**: 2939~2952, 1994.
- 14) **Lo, K.-W., Huang, D.P. and Lau, K.-M.**: p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.*, **55**: 2039~2043, 1995.
- 15) **Okamoto, A., Demetrick, D.J., Spillare, E.A., Hagiwara, K., Hussain, S.P., Bennett, W.P., Forrester, K., Gerwin, B., Serrano, M., Beach, D.H. and Harris, C.C.**: Mutations and altered expression of p16^{INK4} in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 11045~11049, 1994.
- 16) **Caldas, C., Hahn, S.A., da Costa, L.T., Redston, M.S., Schutte, M., Seymour, A.B., Weinstein, C.L., Hruban, R.H., Yeo, C.J. and Kern, S.E.**: Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat. Genet.*, **8**: 27~32, 1994.
- 17) **Jen, J., Harper, J.W., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Papadopoulos, N., Markowitz, S., Willson, J.K.V., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B.**: Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res.*, **54**: 6353~6358, 1994.
- 18) **Gomi, A., Sakai, R., Ogawa, S., Shinoda, S., Hirai, H. and Masuzawa, T.**: Frequent loss of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in human gliomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**:

- 342~346, 1995.
- 19) **Giani, C. and Finocchiaro, G.**: Mutation rate of the CDKN2 gene in malignant gliomas. *Cancer Res.*, **54**: 6338~6339, 1994.
- 20) **Schmidt, E.E., Ichimura, K., Reifenberger, G. and Collins, V.P.**: CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.*, **54**: 6321~6324, 1994.
- 21) **Okuda, T., Shurtleff, S.A., Valentine, M.B., Raimondi, S.C., Head, D.R., Behm, F., Curcio-Brint, A.M., Liu, Q., Pui, C.-H., Sherr, C.J., Beach, D., Look, A.T. and Downing, J.R.**: Frequent deletion of p16^{INK4a/MTS1} and p15^{INK4b/MTS2} in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **85**: 2321~2330, 1995.
- 22) **Okamoto, A., Hussain, S.P., Hagiwara, K., Spillare, E.A., Rusin, M.R., Demetrick, D.J., Serrano, M., Hannon, G.J., Shiseki, M., Zariwala, M., Xiong, Y., Beach, D.H., Yokota, J. and Harris, C.C.**: Mutations in the p16^{INK4/MTS1/CDKN2}, p15^{INK4B/MTS2}, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Res.*, **55**: 1448~1451, 1995.
- 23) **Otsuki, T., Clark, H.M., Wellmann, A., Jaffe, E.S. and Raffeld, M.**: Involvement of CDKN2 (p16^{INK4A/MTS1}) and p15^{INK4B/MTS2} in human leukemias and lymphomas. *Cancer Res.*, **55**: 1436~1440, 1995.
- 24) **Onda, K., Tanaka, R., Washiyama, K., Takeda, N. and Kumanishi, T.**: Correlation of DNA ploidy and morphological features of human glioma cell cultures with the establishment of cell lines. *Acta Neuropathol.*, **76**: 433~440, 1988.
- 25) **Onda, K., Washiyama, K., Tanaka, R., Nishiyama, A., Usui, H. and Kumanishi, T.**: Establishment of human glioma cell lines with stable and unstable GFAP expression. *Biomed. Res.*, **13**: 327~334, 1992.
- 26) 山崎一徳: ヒト神経膠腫細胞株の樹立と Lasat 及び Nude マウスへの移植—膠腫細胞の分化度及び異型性との関連について—. *Neuropathology*, **3**: 29~38, 1982.
- 27) **Bigner, D.D., Bigner, S.H., Ponten, J., Westermark, B., Mahaley, M.S.Jr., Ruoslahti, E., Herschman, H., Eng, L.F. and Wikstrand, C.J.**: Heterogeneity of genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **40**: 201~229, 1981.
- 28) **Blin, N. and Stafford, D.W.**: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucl. Acids Res.*, **3**: 2303~2308, 1976.
- 29) **Goelz, S.E., Hamilton, S.R. and Vogelstein, B.**: Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**: 118~126, 1985.
- 30) **Southern, E.M.**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503~517, 1975.
- 31) **Kumanishi, T., Zhang, S.-J., Ichikawa, T., Endo, S. and Washiyama, K.**: Primary malignant lymphoma of the brain: Demonstration of frequent p16 and p15 gene deletions. *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**: 691~695, 1996.
- 32) **Arap, W., Nishikawa, R., Furnari, F.B., Cavenee, W.K. and Huang, H.-J.S.**: Replacement of the p16/CDKN2 gene suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res.*, **55**: 1351~1354, 1995.
- 33) **Morii, K., Tanaka, R., Takahashi, Y., Minoshima, S., Fukuyama, R., Shimizu, N. and Kuwano, R.**: Structure and chromosome assignment of human S100 α and β subunit genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**: 185~191, 1991.
- 34) **Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B. and Sidransky, D.**: 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.*, **1**: 686~692, 1995.
- 35) **Michieli, P., Chedid, M., Lin, D., Pierce, J.H., Mercer, W.E. and Givol, D.**: Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.*, **54**: 3391~3395, 1994.
- 36) **Yang, R., Gombart, A.F., Serrano, M. and**

- Koeffler, H.P.:** Mutational effects on the p16^{INK4a} tumor suppressor protein. *Cancer Res.*, **55**: 2503~2506, 1995.
- 37) **Shiohara, M., El-Deiry, W.S., Wada, M., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Yang, R., Chen, D.-L., Vogelstein, B. and Koeffler, H.P.:** Absence of WAF1 mutation in a variety of human malignancies. *Blood*, **84**: 3781~3784, 1994.
- 38) **Spruck, C.H.III., Gonzalez-Zulueta, M., Shibata, A., Simoneau, A.R., Lin, M.-F., Gonzales, F., Tsai, Y.C. and Jones, P.A.:** p16 gene in uncultured tumours. *Nature*, **370**: 183~184, 1994.
- 39) **Dreyling, M.H., Bohlander, S.K., Adeyanju, M.O. and Olopade, O.I.:** Detection of CDKN2 deletions in tumor cell lines and primary glioma by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.*, **55**: 984~988, 1995.
- 40) **Walker, D.G., Duan, W., Popovic, E.A., Kaye, A.H., Tomlinson, F.H. and Lavin, M.:** Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas. *Cancer Res.*, **55**: 20~23, 1995.
- 41) **Mori, T., Miura, K., Aoki, T., Nishihira, T., Mori, S. and Nakamura, Y.:** Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, **54**: 3396~3397, 1994.
- 42) **Zhang, S.-Y., Klein-Szanto, A.J.P., Sauter, E.R., Shafarenko, M., Mitsunaga, S., Nobori, T., Carson, D.A., Ridge, J.A. and Goodrow, T.L.:** High frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res.*, **54**: 5050~5053, 1994.
- 43) **Yoshida, S., Todoroki, T., Ichikawa, Y., Hanai, S., Suzuki, H., Hori, M., Fukao, K., Miwa, M. and Uchida, K.:** Mutations of p16^{INK4}/CDKN2 and p15^{INK4B}/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res.*, **55**: 2756~2760, 1995.
- 44) **Ranade, K., Hussussian, C.J., Sikorski, R.S., Varmus, H.E., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D. and Dracopoli, N.C.:** Mutations associated with familial melanoma impair p16^{INK4} function. *Nat. Genet.*, **10**: 114~116, 1995.
- 45) **Shapiro, G.I., Park, J.E., Edwards, C.D., Mao, L., Merlo, A., Sidransky, D., Ewen, M.E. and Rollins, B.J.:** Multiple mechanisms of p16^{INK4A} inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.*, **55**: 6200~6208, 1995.
- 46) **Masuda, H., Miller, C., Koeffler, H.P., Battifora, H. and Cline, M.J.:** Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 7716~7719, 1987.
- 47) **Hesketh, R.:** "The Oncogene Facts Book," (1995) Academic press, London.

(平成8年9月4日受付)