

①

散発性膵癌における17番染色体短腕の欠損領域の解析

伊藤忠一 

船渡治¹⁾²⁾、菅井有¹⁾、幅野渉¹⁾、中村真一¹⁾

岩手医大中央臨床検査部、臨床病理部門（主任：中村真一教授）¹⁾

中村真一 

岩手医科大学医学部第一外科講座（主任：斎藤和好教授）²⁾

Allelic losses on chromosome 17p13 in sporadic pancreatic cancer

Osamu Funato^{1,2)}, Tamotsu Sugai¹⁾, Wataru Habano¹⁾, Shin-ichi Nakamura¹⁾

Division of Pathology, Central Clinical Laboratory, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan (Prof. S. Nakamura)¹⁾

Department of Surgery I, School of Medicine, Iwate Medical University,

Morioka, Japan (Prof. K. Saito)²⁾

索引用語：Pancreatic cancer, Loss of heterozygosity,

Chromosome 17, 17p13.3, p53 gene

要旨：ヒト悪性腫瘍では、17番染色体短腕(17p)の p53 癌抑制遺伝子(17p13.1)、およびそのテロメア側(17p13.1-13.3)においてヘテロ接合性の消失(LOH)が高率に観察される。本研究では、膵癌における同領域の LOH を検討した。また、p53 遺伝子変異についても検討を加えた。手術的に切除された膵管状腺癌 36 例(高分化型 4 例、中分化型 26 例、低分化型 6 例)を対象とした。17p 上の 6 個のマーカを用い LOH 解析した。また、p53 遺伝子変異について解析し、同時に p53 蛋白発現についても検討した。p53 の LOH は、32 例中 13 例(40.6%)で、変異は 36 例中 6 例(16.7%)で認められた。17p13.3 領域の LOH の頻度は 29 例中 13 例(44.8%)であった。17p13.3 領域に LOH を認めた症例では、有意にリンパ節転移陽性例、TS3,4 症例、門脈浸潤例、膵後面組織への浸潤例、膵外神経叢浸潤例が多く認められた。以上より、p53 遺伝子のテロメア側 17p13.3 領域には膵癌の浸潤、転移に関わる新たな癌抑制遺伝子が存在することが示唆された。

はじめに

近年癌は癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の不活化により起こることが明らかになった¹⁾。特に癌抑制遺伝子の不活化は癌発生の中心的役割を担っており、大腸癌では APC, p53, DCC 遺伝子の異常が段階的に出現する多段階発癌モデルが提唱されている²⁾。従って癌の遺伝子異常を明らかにすることは癌発生の機序を理解する上でも重要である。

膵癌は消化器系癌の中でも早期発見の困難な癌で、その予後も極めて不良である³⁾。早期膵癌が未だ多く集積されていないため、大腸癌のような詳細な多段階発癌のモデルは明らかにされていない。しかしながら K-ras 遺伝子の点突然変異が高頻度に検出されたり、p53 遺伝子異常が認められるなど大腸癌との共通点もみられる。前者は最近の報告では過形成上皮にも認められることが示され⁴⁾、必ずしも癌固有の遺伝子異常ではないことが明かになりつつあるが、p53 の異常は膵癌の代表的遺伝子

異常の1つである⁵⁾。

p53は染色体17番短腕(17p13.1)に位置する癌抑制遺伝子で、多くの癌で片方のアレルの欠損(loss of heterozygosity 以下 LOH)と残った遺伝子の突然変異がみられる。近年 p53 遺伝子のテロメア側(17p13.1-13.3)に新しい癌抑制遺伝子がある可能性が指摘されている。実際に乳癌⁶⁾や卵巣癌⁷⁾などにおいて、p53 遺伝子の LOH と同様に、よりテロメア側でのアレルの欠損が報告されている。一方、膵癌においても p53 遺伝子の LOH が高頻度に検出されている⁸⁾。しかし膵癌ではテロメア側での LOH 解析は検討されておらず、この領域の LOH の膵癌における役割は不明である。

我々は膵癌における p53 遺伝子異常とそのテロメア側の共通欠損領域を多数のマイクロサテライト・マーカーを用いて、p53 遺伝子の異常とテロメア側に位置する新しい遺伝子共通欠損の膵癌における役割について解析した。また p53 蛋白の発現とその塩基配列の異常につ

いて、両者間の結果を比較し、蛋白発現と遺伝子異常の関連についても検討を加えた。

材料及び方法

材料

1990年から1998年までに岩手医科大学附属病院第一外科ならびに関連施設と岩手県立中央病院外科で外科的に切除された膵管癌36例を用いた。男性24例、女性12例で、年齢は、41歳～76歳（平均60.6歳）であった。腫瘍の占拠部位、組織型、進行度の分類は膵癌取り扱い規約⁹⁾に従った。腫瘍の主占拠部位は、膵頭部29例、体部5例、尾部2例で、組織型は高分化型管状腺癌4例、中分化型管状腺癌26例、低分化型管状腺癌6例であった。リンパ節転移の有無は、陽性例が27例、陰性例が9例で、進行度はstage Iが2例、stage IIIが3例、stage IVが31例であった。

膵癌切除標本の腫瘍および正常部の新鮮組織から材料を採取し、 -80°C で凍結保存した。凍結組織を細切後、プロテイナーゼKで消化し、フェノール/クロロホルム法に従ってDNAを回収した¹⁰⁾。腫瘍組織については、材料

採取部分の病理標本を作成し、HE染色により腫瘍細胞と非腫瘍細胞の割合(腫瘍細胞が60%以上)を確認した。

方法

1. p53 及び p53 のテロメア領域における LOH の解析

5種のマイクロサテライトマーカー (TP53、D17S379、D17S796、D17S849、D17S578: いずれも片側プライマーを蛍光標識)を用いて17番染色体短腕 (17p13.1-13.3)の LOHを評価した。反応液はサンプル DNA 100ng、2.5 μ PCR緩衝液、5nmol dNTP、各 25 pmolプライマーおよび1.5ユニット Taqポリメラーゼ (Boehringer, Mannheim, Germany)を含む25 μ lの系で調製した。PCRは Thermal Cycler MP (Takara, Kyoto, Japan)にて、25-30サイクル (94 $^{\circ}$ C :30秒、55-60 $^{\circ}$ C :30秒、72 $^{\circ}$ C :30秒)の条件で行った。PCR産物を変性条件下、373Aオートシーケンサーで電気泳動を行った。GENE SCANTM 672ソフトウェア (Version 1.2.2-1, Perkin-Elmer Cetus, USA)を用い解析

した。正常DNAサンプルの示すピークが1つである場合はホモ接合性 (homozygous)、ピークを2つ認めるものはヘテロ接合性 (heterozygous) であり、後者をinformativeとし、LOHの判定を行った。正常部と腫瘍部のヘテロ接合性はそれぞれ移動度の異なる2つのピークとして認められる。各症例のピーク面積の評価は正常部と腫瘍部でそれぞれの2つのピーク面積の比を求め、以下に示す計算式で決定した。 $T1:T2 / N1:N2$ ($T1$ と $N1$ はそれぞれ腫瘍部と正常部の移動度の大きい方のアレルのピーク面積、 $T2$ と $N2$ はそれぞれの小さい方のアレルのピーク面積)。この数式でアレル比が1.00を超える場合は逆数を計算し、アレル比 (q値) が0.00-1.00の範囲となるように変換した¹⁰⁾。陰性コントロールとしてD10S197マーカーを用いた。LOHの判定は、q値0.6以下を陽性症例とした(図1)。

2. 17p13.3領域におけるサザンブロット解析

正常および腫瘍部のDNA 5 μ gを制限酵素Taq Iにて消化し、1%アガロースゲル電気泳動後、

ナイロン膜に転写した。YNZ 22クローン(国立感染症研究所、遺伝子資源室より供与)をランダムプライマーを用い ^{32}P 標識し、プローブDNAとした。ハイブリダイゼーション後、X線フィルムに感光した。

3. p53 遺伝子変異の解析

非放射性的 polymerase chain reaction- single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)法¹¹⁾により、エクソン5-8領域内での変異を検索した。PCRプライマーは、

exon5 (sense: 5'-TTCCTCTTCCTGCAGTACTCC-3'、anti sense: 5'-AGCTGCTCACCATCGCTATC-3')、

exon6 (sense: 5'-GATTGCTCTTAGGTCTGGCC-3'、anti sense: 5'-AGTTGCAAACCAGACCTCA-3')、

exon7 (sense: 5'-TCCTAGGTTGGCTCTGAC-3'、anti sense: 5'-GCTCCTGACCTGGAGTCTTC-3')、

exon8 (sense: 5'-TCCTGAGTAGTGGTAATCTA-3'、anti sense: 5'-CCTGCTTGCTTACCTCGCT-3')を用いた。PCRはLOH

解析と同様の組成で、Thermal Cycler MP (Takara, Kyoto, Japan)にて、35サイクル(94°C :30秒、55 or 60

℃ :30秒、72℃ :30秒)のプログラムで実施した。各PCR産物をホルムアミドで希釈後、90℃で2分間熱変性し、SSCP解析に用いた。電気泳動は緩衝液(45mMトリス塩基、45mMほう酸、1mM EDTA、pH8.0)を含む7.5%ポリアクリルアミドゲル(0.15%ビスアクリルアミド)、2.5%グリセロールにて行い、銀染色後に肉眼でバンドを確認した。正常部と腫瘍部とでバンドの移動度が異なる症例については、373Aオートシーケンサー(Perkin-Elmer Cetus, NJ, USA)を用い、直接シーケンス法により塩基配列を決定した。

4. 抗 p53 抗体による免疫組織化学

パラフィン包埋切片をキシレンにより脱パラフィン後、3% H₂O₂メタノールにて内因性ペルオキシダーゼブロックを行った。マイクロウェーブを5分×4回照射後(出力500W, H2500 microwave processor, BIO RAD, U.S.A)酵素抗体Avidin-biotin complex (ABC)法を施行した。すなわち、2%正常ヤギ血清(ニチレイ、東京)で処理

し、一次抗体として、抗 p53 抗体 (100倍希釈、Do-7 Novocastra, Newcastle, UK) を用い、一晩 4°C で反応させた。二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウス IgG +ウサギ IgG 抗体 (ニチレイ) を 30 分室温で反応させ、三次抗体にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ) を用いた。発色には diamino-benzidine を用い、Carrazi のヘマトキシリンで核染色を行った。評価の方法は腫瘍細胞全体の陽性率を 4 段階に分類した。すなわち、陽性率が 5% 未満を -、5~25% 未満を 1+、25~50% 未満を 2+、50% 以上を 3+ とした。

5. 統計学的解析

統計学的解析は Fisher's exact test で行い、 $P < 0.05$ を有意差有りと判定した。

結果

1. 17番染色体短腕における LOH

LOH解析では全36例において6種のマーカー (D17S849, D17S30/YNZ22, D17S379, D17S578, D17S796, TP53) のうち少なくとも1種以上のマーカーで informativeであった。17p領域における各マーカーごとのLOHの頻度を表1に示す。19例(53%)が少なくとも1カ所以上でLOHを認めた。一方、17例(47%)ではLOHが認められなかった。

TP53におけるLOHの頻度は32例中13例(40.6%)であった。17p13.3に位置するD17S849またはD17S30/YNZ22のいずれか一方にLOHを認めたものは29例中13例(44.8%)であった。36例中9例(25.0%)はTP53(17p13.1)とD17S849またはYNZ22(17p13.3)の両者でLOHを認めた。上記の結果からp53遺伝子領域であるp53領域(TP53)とさらにテロメア側に位置する17p13.3領域(D17S849とYNZ22)に共通欠損領域が存在することが示唆された(図2)。

2. 臨床病理学的検討

p53 遺伝子領域である TP53 と 17p13.3 の共通欠損領域 (D17S849 または YNZ22) で LOH を示した群とそうでない群についてそれぞれの臨床病理学的事項 (リンパ節転移の有無:n、腫瘍径:TS、膵前方被膜への浸潤:s、膵後面組織への浸潤:rp、門脈系静脈壁への浸潤:pv、動脈壁への浸潤:a、膵外神経叢浸潤:pl) との関係を検討した。TP53 に LOH を認めた症例では、有意に膵前方被膜への浸潤例、膵後面組織浸潤例が多く認められが、その他の因子では有意な関係は得られなかった。一方、17p13.3 領域に LOH を認めた症例では、有意にリンパ節転移陽性例、TS 3,4 症例、膵後面組織浸潤例、門脈系静脈浸潤例、膵外神経叢浸潤例が多く認められた。複数の因子で有意な関係が得られた (表 2)。

3. p53 遺伝子の変異

SSCP 解析による検索の結果、膵癌 36 例中 6 例

(16.7%)において泳動パターン之差が認められた (Exon 5が4例、Exon 7,8がそれぞれ1例)。直接シーケンスの結果、5例は点突然変異であった。その内訳は Codon 174の AGG (Arg) から TGG (Trp) への置換が1例、Codon 175の CGC (Arg) から CAC (His) への置換が2例、Codon 163の TAC (Tyr) から TGC への置換が1例、Codon 248の CGC (Arg) から TGG (Trp) への置換が1例であった。1例は塩基配列を決定できなかった (表3)。

4. p53 蛋白過剰発現

p53 遺伝子変異と p53 蛋白発現の関係を評価するため、6例の p53 遺伝子変異を含む36例のパラフィン切片の p53 免疫染色を施行した。36例中15例 (41.7%) に p53 蛋白の過剰発現を認めた。SSCP解析で変異を認めた6例中5例は免疫染色陽性で蛋白過剰発現を認めた。

考察

癌は実質と間質から構成されている。間質の著しい増加は全体の腫瘍細胞率を低下させることから正確な遺伝子解析を行うには不利とされている。膵癌は病理組織学的に間質の増加が目立つ癌で、遺伝子解析を行う際には注意することが必要である。膵癌の遺伝子解析の報告の多くは培養細胞を用いたものであるが、培養細胞は培養中に生体内にはない遺伝子変化を付加させる可能性が指摘されている。本研究では生体内での膵癌の遺伝子変化を明らかにするために、腫瘍細胞が全体の60%以上ある新鮮手術組織片のみを解析の対象とした。一般にPCRを用いたLOH解析では混入する正常細胞が影響するため、結果の解釈に注意が必要となる。すなわち、腫瘍において片側アレルの欠損が不完全な状態 (allelic imbalance) で観察されるため、遺伝子増幅との区別が困難となる。本研究では、同時に YNZ22 プローブを用いたサザンブロット解析を行っ

たことで、17p領域内において、両アレルのバランス変化が正しくLOHを意味することが証明された。

p53を含む17番染色体短腕全体の広範囲な欠損は4例に認められた(症例20, 25, 8, 7)。17番染色体短腕全体が欠損することによる大きなDNA量の減少は癌のDNA ploidyを変化させる可能性がある。17番染色体短腕には2つの異なった共通欠損領域が存在することが明らかになった。一方はp53癌抑制遺伝子の存在する17p13.1 (TP53)で、もう一方はさらにテロメア側に位置する17p13.3 (D17S849, YNZ22)である。両者の頻度は前者が13/29例(44.8%),後者が13/32例(40.6%)であった。過去の散発性乳癌の同領域の解析の報告でもTP53よりも17p13.3の欠損の頻度が高く、我々の結果と一致する¹²⁾。さらに、p53遺伝子の変異と17p13.3領域のLOHは相関を認めず、独立した関係であり、これらの結果からも17p13.3に高率に認めるLOHは膀胱癌の新たな癌抑制遺伝子の存在を示唆する。p53遺伝子とテロメア側の

17p13.3領域が同時に欠損したものは6例に認められた(症例 37,14, 34, 31, 36, 10)。17番染色体短腕にはp53以外にもいくつかの癌抑制遺伝子の候補遺伝子がすでに存在しており^{6, 13)}、これらが同時に欠損することにより癌の増殖能が相乗的に亢進する可能性がある。このことは癌の多段階発癌理論とも一致する。複数の癌遺伝子及び癌抑制遺伝子の異常が蓄積することにより、癌の進展・転移にも有意に働くものと思われる。

過去の膀胱癌における染色体欠失の報告では17pのLOHは5例中4例に検出され、陽性例中1例はp53遺伝子領域よりもテロメア側の欠損であったとしている¹⁴⁾。また、Hahnらによる同様の実験では17pの欠失が18例中全例に認められたと報告している⁸⁾。どちらも我々の結果と比較してかなり高率であるが、前者は症例数が少なく、後者はxenograftを使用しているためLOHの頻度の単純な比較はできない。

p53遺伝子領域のLOHは膀胱前後方向への浸潤

例に有意に多くみられた。p53 遺伝子の LOH がこれらの症例に多くみられる理由は不明である。しかしこの因子は臨床的には重要であり、p53 の LOH が腭前後組織への浸潤の 1 つの指標となるかもしれない。一方で p53 の LOH の率と遺伝子変異の率に大きな差がみられた。これは Knudson らの two-hit theory¹⁵⁾ の観点からは矛盾する所見であるが、LOH の生物学的意義については今後更に検討する必要がある。

17p13.3 領域の LOH は多数の臨床病理学的因子と有意な関係を示し、浸潤・転移の程度が著しい症例に多くみられた。これらのマーカーの LOH 解析は腭周囲臓器への浸潤やリンパ節転移の指標として臨床応用可能であると思われる。また今回の検討では生存率の検討は行っていないが、17p13.3 領域の LOH が予後と相関し、その指標となる可能性が示唆された。乳癌においても 17p13.3 (YNZ22) に LOH を認めた症例は有意にリンパ節転移が多く、生存期間が短いという報告がある¹²⁾。今後、腭生検や腭液中の細

胞を利用して17p13.3領域のLOHを検出することができれば、臨床的に予後や癌の浸潤・転移を予測し得る有用な情報となるかもしれない。また上記のことは17p13.3領域の候補遺伝子が膵癌の浸潤・転移に関与していることを間接的に示唆する所見でもある。今後はこの領域のマーカーを増やして詳細な染色体地図を完成させる必要がある。

今回のLOH解析では、microsatellite instability (MSI) が一例も検出されなかった。MSIは膵癌の癌化・進展には積極的には関与していないのかもしれない。しかしながら膵癌におけるMSIの頻度は様々である。Hanらは9例中6例にMSIを認めたとしているが¹⁶⁾、Seymourらはその後27例検討し、一例もみられなかったと報告している¹⁴⁾。未だ膵癌のMSIの役割については一定の見解が得られておらず、今後のさらなる検討が必要である。

膵癌の多段階発癌モデルは現在まで十分なものは報告されていない。本研究では多くの

症例が進行癌であったため、膵癌の早期の遺伝子異常については明らかにできなかった。しかし従来の報告では p53 は比較的後期の癌の遺伝子異常である¹⁷⁾とされている。17p13.3 領域の LOH は膵癌の癌化、進展において p53 よりもさらに後期の遺伝子異常である可能性が考えられる。

我々の検討では免疫組織化学的に p53 遺伝子産物の過剰発現がみられた例は 15 例であった。その内、exon 5-8 の領域に変異が証明されたのは 5 例であった。残りの症例は過剰発現はみられるが変異は証明されなかった。この理由として、(1) exon 5-8 以外に変異がある可能性¹⁸⁾、(2) 過剰の間質の混入や腫瘍細胞の細胞内多様性により、少数の変異細胞を検出できない可能性¹⁸⁾、(3) ある分子が p53 蛋白に結合してその機能を不活化、安定させる可能性¹⁸⁾、などが考えられる。(1) に関しては実際の各種癌における解析で、exon 5-8 以外に変異のある率は 5% 以下とされていることから¹⁸⁾、これのみでは説明は

困難であろう。(2)は膀胱癌の場合、間質の混入が比較的多いので、遺伝子解析の際に留意すべき課題であるが、本研究では p53 の LOH が 40%以上認められたことから間質の過剰な混入は否定的である。(3)は mdm-2¹⁹⁾ や SV-40 の T 抗原²⁰⁾などが有名であるが、実際の癌腫においてこれらが関わっていたとする報告はほとんどない。未知の物質を想定しているが、今後更に検討する必要があるだろう。

最後に本研究の結果、17p13.3 領域には新たな癌抑制遺伝子が存在する可能性があることを、またこの領域の LOH が癌の進展・転移に関わる可能性についても推測できた。

稿を終えるにあたり、岩手医科大学第一外
科学講座ならびに中央臨床検査部臨床病理部
の皆様に御礼申し上げます。

文献

- 1) Bishop J M : Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235-248, 1991.
- 2) Vogelstein B, Fearon E R, Hamilton S R, et al. : Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525-532, 1988
- 3) 日本膵臓学会登録委員会 : 全国膵癌登録調査報告, 1981~1993年度症例. 1982~1994
- 4) Yanagisawa A, Kato Y, Ohtake K, et al. : c-Ki-ras point mutations in ductectatic-type mucinous cyst neoplasms of the pancreas. *Jpn. J. Cancer Res.* 82 : 1057-1060, 1991
- 5) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, et al. : Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 57 : 1731-1734, 1997
- 6) Stack M, Jones D, White G, et al. : Detailed mapping and loss of heterozygosity analysis suggests a suppressor locus involved in sporadic breast cancer within a distal region of chromosome band 17p13.3. *Hum. Mol. Genet.* 11 : 2047-2055, 1995
- 7) Wertheim I, Tangir J, Muto M G, et al. : Loss of heterozygosity of chromosome 17 in human borderline and

- invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene* 12 : 2147-2153, 1996
- 8) Hahn S A, Seymour A B, Shamsul Hoque A T M, et al. : Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res.* 55 : 4670-4675, 1995
 - 9) 日本膵臓学会編 : 膵癌取扱い規約 (第4版). 金原出版, 東京, 1993
 - 10) Habano W, Sugai T, Nakamura S, et al. : A novel method for gene analysis of colorectal carcinomas using a crypt isolation technique. *Lab. Invest.* 74 : 933-940, 1996
 - 11) Sugano K, Kyogoku A, Fukayama N, et al. : Rapid and simple detection of c-Ki-ras2 gene codon 12 mutations by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Lab. Invest.* 68 : 361-366, 1993.
 - 12) Thompson A M, Crichton D N, Clay M F, et al. : Allelic imbalance at chromosome 17p13.3 (YNZ22) in breast cancer is independent of p53 mutation or p53 overexpression and is associated with poor prognosis at medium-term follow up. *Br. J. Cancer* 77 : 797-800, 1998
 - 13) Steichen-Gersdorf E, Baumgartner M, Kreczy A, et al. :

- Deletion mapping on chromosome 17p in medulloblastoma.
Br. J. Cancer 76 : 1284-1287, 1997
- 14) Seymour A B, Hruban R H, Redston M, et al. : Alleotype of pancreatic adenocarcinoma. Cancer Res. 54 : 2761-2764, 1994
 - 15) Knudson A G : Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 : 820-823, 1971
 - 16) Han H J, Yanagisawa A, Kato Y, et al. : Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. Cancer Res. 53 : 5087-5089, 1993
 - 17) Ruggeri B A, Huang L, Berger D, et al. : Molecular pathology of primary and metastatic ductal pancreatic lesions. Cancer 79 : 700-716, 1997
 - 18) Dix B, Robbins P, Carrello S, et al. : Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. Br. J. Cancer 70 : 585-590, 1994
 - 19) Marks D I, Krurz B W, Link M P, et al. : Altered expression of p53 and mdm-2 proteins at diagnosis is associated with early treatment failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. J. Clin. Oncol. 15 : 1158-1162, 1997
 - 20) O'Neill F J, Hu Y, Chen T, et al. : Identification of p53

unbound to T-antigen in human cells transformed by simian
virus 40 T-antigen. *Oncogene*. 14 : 955-965, 1997

ALLELIC LOSSES ON CHROMOSOME 17p13 IN SPORADIC PANCREATIC CANCER

O. Funato^{1,2)}, T. Sugai¹⁾, W. Habano¹⁾, S. Nakamura¹⁾.

Division of Pathology, Central Clinical Laboratory ¹⁾, Department of Surgery I ²⁾, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

Summary

Loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 17p13.3, telomeric to p53 gene locus, have been frequently found in various human neoplasms. We studied frequency of LOH on 17p13 to clarify relationship between LOH on this lesion and abnormalities of p53 gene in sporadic pancreatic carcinomas. Thirty six pancreatic adenocarcinomas were analyzed. LOH analyses on 17p were performed for six loci. Furthermore, we analyzed p53 mutation and overexpression. p53 LOH was observed in 13 of 32 (40.6%) and mutation was detected in 6 of 36 cases (16.7%). 17p13.3 (D17S849 and/or YNZ22) LOH were observed in 13 of 29 (44.8%). A significant correlation between 17p13.3 LOH with lymph node metastasis ($p=0.018$), tumor size ($p=0.048$), portal vein invasion ($p=0.022$), retroperitoneal tissue invasion ($p=0.008$), and extrapancreatic nerve plexuses

invasion ($p=0.008$). Our data suggest that candidate gene may harbored on chromosome 17p13.3, which may play an important role in the progression and metastasis of pancreatic cancer.

Table 1 : LOH on Chromosome 17p13.1-13.3.

Locus	Chromosomal locus	Allelic losses / informative cases (%)
<i>D17S849</i>	17p13.3	11/24 (45.8)
<i>YNZ22</i>	17p13.3	8/18 (44.4)
<i>D17S379</i>	17p13.3	4/23 (17.4)
<i>D17S578</i>	17p13	7/22 (31.8)
<i>D17S796</i>	17p13.1	6/18 (33.3)
<i>TP53</i>	17p13.1	13/32 (40.6)
<i>D10S197</i>	10p12	0/33 (0)

Table 2 : Correlation of p53 (*TP53*) LOH and 17p13.3 (*D17S849* and / or *YNZ-22*) LOH with clinicopathologic findings.

Clinicopathologic findings	<i>TP53</i>			<i>D17S849</i> and/or <i>YNZ-22</i>		
	LOH (+)	LOH (-)	<i>P</i> value*	LOH (+)	LOH (-)	<i>P</i> value*
n (+)	10	14		12	8	
n (-)	3	5	0.587	1	8	0.018 **
TS 3, 4	7	6		9	5	
TS 1, 2	6	13	0.186	4	11	0.048 **
s 2, 3	4	6		5	6	
s 0, 1	9	13	0.036 **	8	10	0.628
rp 2, 3	7	3		8	2	
rp 0, 1	6	16	0.029 **	5	14	0.008 **
pv 2, 3	7	7		9	4	
pv 0, 1	8	12	0.410	4	12	0.022 **
a 2, 3	0	1		0	2	
a 0, 1	13	18	0.594	13	14	0.296
pl (+)	5	4		8	2	
pl (-)	8	15	0.248	5	14	0.008 **

n : Lymph node metastasis (+ : Positive, - : Negative) ; TS : Tumor size (TS 3, 4 : Tumors whose greatest dimension is more than 4.0 cm. TS 1, 2 : Tumors whose greatest dimension is 4.0 cm or less.) ; s : Anterior pancreatic capsule, rp : Retroperitoneal tissue, pv : Portal venous system, a : Arterial system (s 0, rp 0, pv 0, a 0 : No evidence of invasion. s 1, rp 1, pv 1, a 1 : Invasion suspected. s 2, rp 2, pv 2, a 2 : Definite invasion. s 3, rp 3, pv 3, a 3 : Invasion of adjacent organs.) ; pl : Extrapancreatic nerve system (+ : Invasion present. - : No evidence of invasion.) ; Fisher's exact test * ; Statistically significant ($P < 0.05$) **

Table 3 : Sequence analysis of p53 mutation.

Case	Exon	Codon	Base change (Amino acid)	IHC *
36	5	174	AGG (Arg) → TGG (Trp)	-
2	5	175	CGC (Arg) → CAC (His)	1+
12	5	175	CGC (Arg) → CAC (His)	2+
8	5	163	TAC (Tyr) → TGC (Cys)	1+
32	7	248	CGG (Arg) → TGG (Trp)	3+
25	8	ND**	ND	3+

IHC * : Immunohistochemical stain ND ** : Not determined

Fig. 1 Markers analysis

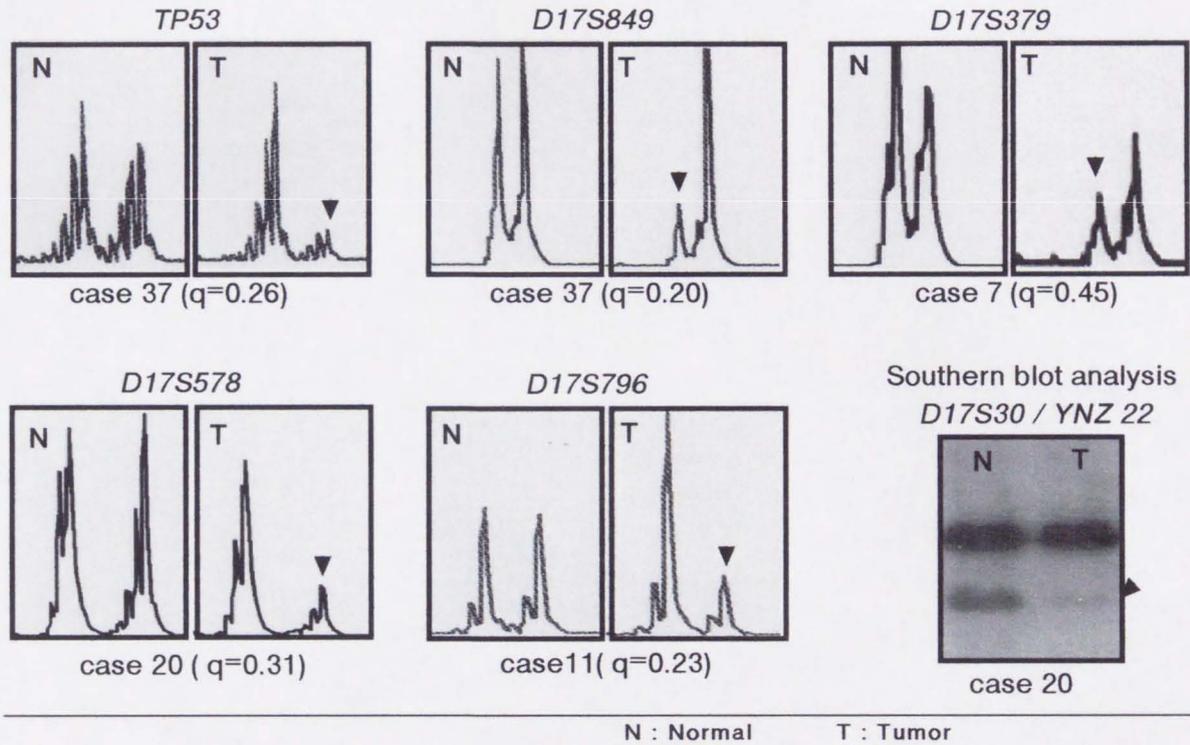
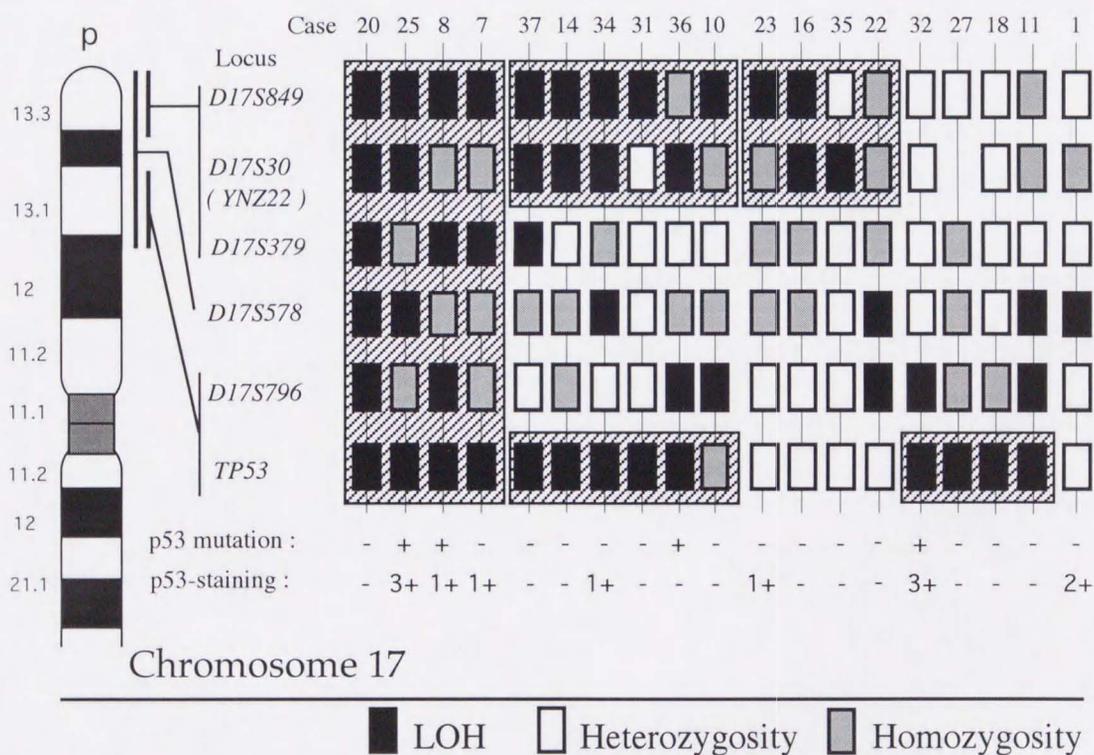


Fig. 2 : Result of LOH analysis of the pancreatic adenocarcinomas at 17p with 6 markers.



【Figure legend】

Figure 1 → Representative example of LOH analysis. LOH was analysed by comparing normal DNA (N) with tumor DNA (T). LOH are seen with markers D17S849, D17S379, TP53, D17S796 and D17S30/YNZ22. Arrow heads indicate the lost allele.

Figure 2 → LOH analysis of 36 pancreatic adenocarcinomas using 6 markers on chromosome 17p13. Cases that showed allelic deletion at least one marker are listed. p53 mutation (+, -) and p53 overexpression (3+, 2+, 1+, -) are also shown.

【論文の構成】

本文（タイトル、索引用語、要旨、はじめに、材料と方法、結果、考察）

→22枚

参考文献→4枚

英語タイトル、summary→2枚

Figure legend→1枚

Figure→2枚

Table→3枚

Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

