

〔パネルディスカッション：Non-RI法を用いた遺伝子解析〕

SSCP法による癌関連遺伝子の解析

前川 真人*・菅野 康吉**

SUMMARY

Single-strand DNA conformation polymorphism (SSCP) analysis has been used to detect alterations in relatively short DNA fragments such as genetic polymorphisms, mutations, deletions, and so on. Here we introduce other applications of SSCP analysis, using its capacity of separating alleles. A sensitive method, designated as blunt-end SSCP analysis was developed for detecting loss of heterozygosity (LOH) in cancer tissues and urine samples. The method is fluorescence-based SSCP analysis, using blunt-end DNA fragments and applied for detecting an LOH of the *p53* gene. The combination of reverse transcribed-PCR and fluorescence-based SSCP analysis is proposed for the quantitative determination of ratio of mRNA molecules with homologous sequences. The procedure is applicable to a determination of expression levels of genes such as lactate dehydrogenase subunits and cyclooxygenases 1 and 2. The combination of bisulfite treatment and PCR-SSCP analysis is proposed for quantitative methylation assay. This analytic procedure can be applied to the rapid identification of methylation status in multiple samples, quantification of methylated vs. unmethylated sequences and detection of methylation heterogeneity in the amplified DNA fragments. PCR-SSCP analysis is advantageous in simple procedure with relatively high sensitivity and is applicable to any other fields.

Key words: PCR-SSCP, RT-PCR, loss of heterozygosity, methylation.

はじめに

PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) は、PCR産物を用いて遺伝子変異を検出する方法として、本邦においてOritaらにより開発された¹⁾。爾来、点突然変異のみならず、遺伝子の欠落・挿入、多型解析、染色体の欠失 (loss of heterozygosity; LOH) 等の検出にも応用されている。手技は簡便で、PCR法によって増幅した1本鎖DNA断片を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって分離し、放射性同位元素、蛍光色素、銀染色などによって検出する²⁾。PCR-SSCP法の開発当初には遺伝子変異の検出が主な使用目的であったが、今回はその後さらに広がってきた応用例、すなわち、センス鎖とアンチセンス鎖、塩基配列の異なるアリルを分離することができる特徴を利用した応用例につい

て述べる。

Blunt end-SSCP法による定量性の向上

蛍光シーケンサーを使用したSSCP解析ではしばしばショルダーを形成したり、複数のバンドとして検出されることに気づく (Fig. 1)。これは、PCRの際に使用したTaqポリメラーゼが3'側末端にアデニンを一塩基余分に付加する性質を有するためであり、本来の鎖長の塩基配列に加え、2種類の配列をもったDNAが増幅されていることになる。これを3'-5'エクソヌクレアーゼ活性のあるKlenow fragmentで余分のアデニンを除くことにより全てのDNA断片を平滑末端化してから、SSCP解析を行うことにより、パターンが均一になり、各ピークの定量化が正確に行えるようになった³⁾。

PCR-SSCP analysis of cancer related genes.

* Masato Maekawa; 浜松医科大学臨床検査医学

** Kokichi Sugano; 栃木県立がんセンター研究所がん遺伝子研究室, がん予防研究室

Correspondence address: Masato Maekawa, Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu 431-3192, Japan.

第50回日本電気泳動学会春季大会・パネルディスカッション

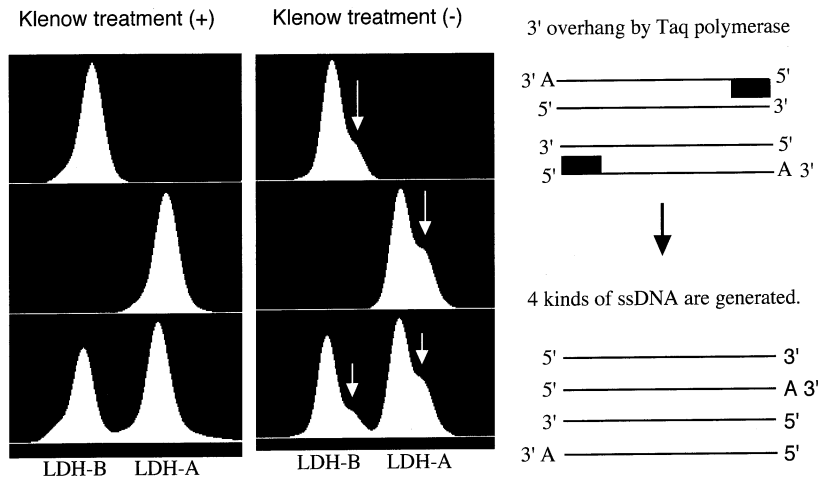


Fig. 1. SSCP patterns of amplified DNA fragments with or without Klenow treatment.

DNA fragments amplified by Taq DNA polymerase were treated with Klenow fragment to generate blunt-ends. The treated and untreated DNA samples were analysed by SSCP analysis using fluorescent DNA sequencer. When the amplified DNAs are not treated with Klenow fragment, the shoulder peaks indicated by arrows appeared, which indicate the presence of the 3' overhang by terminal deoxynucleotidyl transferase activity originated from Taq DNA polymerase.

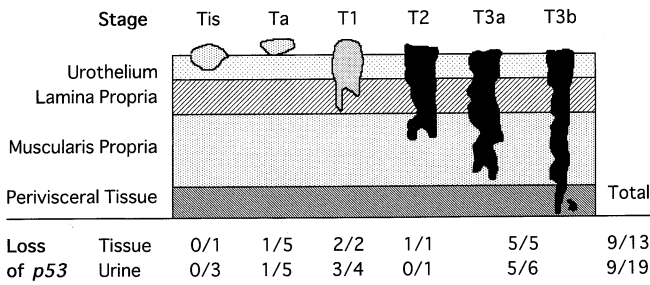


Fig. 2. Allelic loss of the *p53* gene in bladder cancer progression.

Scheme of bladder cancer progression and numbers of LOH cases/examined bladder cancer patient numbers are shown in this figure. To detect allelic loss of the *p53* gene, blunt-end single-strand conformation polymorphism (SSCP) was applied. LOH was detected in all samples of T1 and higher-stage tumors, while no LOHs were detected in the urine samples and tumor tissues from patients with Tis and/or Ta stage.

遺伝子の欠失 (loss of heterozygosity; LOH, 両親に由来する対立遺伝子の片方の欠失を意味する)

癌細胞では特定の染色体の欠失が高頻度に認められ、そのような場合に双方の両親に由来する遺伝子のうち、父方あるいは母方由来の遺伝子のどちらかが欠失する変化 (LOH) が生じている。遺伝子欠失をとらえる方法としては、マイクロサテライト多型、1塩基多型などの遺伝子多型が用いられる。最近では PCR と組み合わせて用いられるのが普通である。ただし、臨床検体を用いた癌の LOH 解析では、混在する正常細胞の影響を強く受けることにより、従来の方法では十分な感度が得られてはいなかった。

一方、遺伝子内の多型 (1塩基多型) を blunt end-SSCP 法によって分離・定量することによって、腫瘍細胞の割合が少ない場合でも感度よく検出することができるようになった³⁾。膀胱癌の多くは表在性の腫瘍であり、内視鏡的局所切除術などで対処可能であるが、一部は再発を繰り返し浸潤性膀胱癌に移行することが知られている。本法を膀胱癌および尿検体における *p53* 遺伝子の欠失の解析に応用した結果、*p53* 遺伝子の LOH は膀胱摘出が必要な浸潤性膀胱癌の 100% に認められたため (Fig. 2)、悪性度の高い浸潤性膀胱癌の診断に応用可能と考えられた⁴⁾。

相同性を有する遺伝子の発現レベルの定量

遺伝子の相対的な発現量をみるために考案した応用例である。複数の遺伝子の塩基配列の相同性の高い領域にプライマーを設定し、RT-PCR 法施行後に蛍光シーケンサーを用いた blunt end-SSCP 法によって分別定量を行う。相同性のある遺伝子、すなわちアイソザイムや遺伝子ファミリーを形成する遺伝子群が格好の標的となる。したがって本法は、遺伝子レベルにおけるアイソザイム分析もしくはアイソフォーム分析に相当するものと考えられる。我々は、LDH の H (B), M (A) の 2 つのサブユニットで方法論の正しさを証明し⁵⁾、さらに、シクロオキシゲナーゼ (COX) のアイソザイム 1,2 を本法によって分離・定量を行った⁶⁾。

COX-1 はほとんど全ての細胞に恒常的に発現しているが、COX-2 は種々のサイトカインなどの刺激により誘導される。したがって、定常状態の COX-1 を基準として、

COX-2の増加率を測定した。COX-1,2の遺伝子はお互いに約60%の相同性を有しており、相同性の高い領域にプライマーを設定し、両方を同時に増幅することができた。COX-2の発現量は、大腸癌組織では正常粘膜に比較し増加している症例が多いことが判明した。また、腺腫性ポリープでは同様の傾向がみられたが、過形成性ではCOX-2発現量の増加傾向はみられなかったため、COX-2発現量の増加は、大腸癌の発生や進展の早期から関与しているものと考えられた⁶⁾。

遺伝子プロモーター領域のメチル化の検出

癌抑制遺伝子・ミスマッチ修復遺伝子のプロモーターのメチル化が生じると、それらの遺伝子の発現が抑制され、

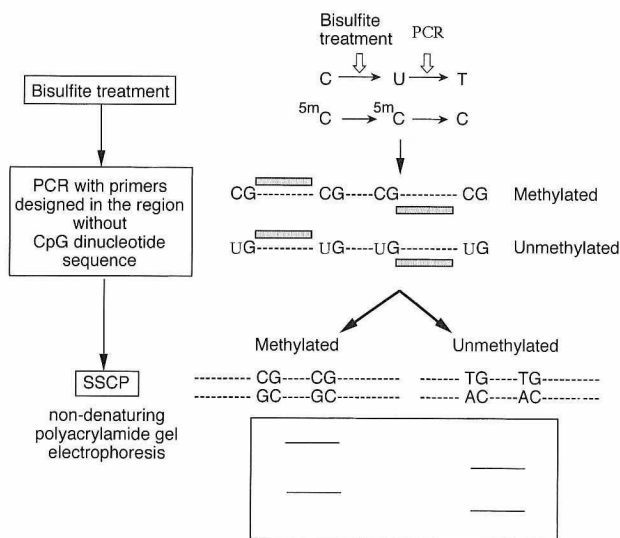


Fig. 3. Strategy of the BiPS analysis.

BiPS consists of a sodium bisulfite treatment, PCR and SSCP analysis. Briefly, the bisulfite treatment converts the unmethylated cytosine residues into uracil, while the methylated cytosine remains as cytosine. SSCP can discriminate this base difference semi-quantitatively and can reveal the heterogeneity in methylation status of the sample.

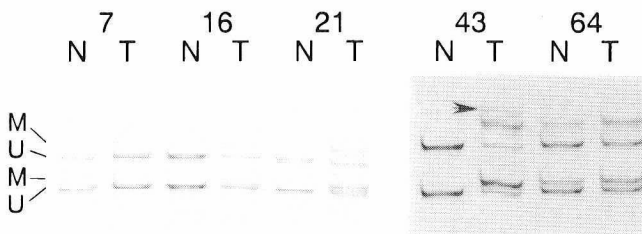


Fig. 4. BiPS analysis of the *hMLH1* gene promoter region in colorectal cancer.

Cancer tissues (T) and the corresponding normal mucosa (N) were examined in each colorectal cancer patients. In normal mucosa only the unmethylated bands (U) were observed, while, methylated bands (M) were also revealed in a part of cancer tissues. The arrow means partially methylated band which is observed only 1 out of 25 tumors examined.

癌化に対する抑制がとれて発癌するというメカニズムが注目されている。Knudsonのtwo-hit theoryにおける遺伝子不活化の原因として、変異・欠失と並んでメチル化が重要であることが判明してきた⁷⁾。DNAをbisulfite処理すると、非メチル化CはUに変換されるが、メチル化Cはそのままであることにより、メチル化の有無の違いは塩基配列の違いとして置き換えることができる。そこで、bisulfite処理したDNAを鋳型としてPCR-SSCPで分離することにより、メチル化の多様性の解析、およびメチル化アレルの定量的解析などに応用できる (Fig. 3)。我々はこの方法をbisulfite-PCR-SSCP (BiPS)と名付けた⁸⁾。この方法により、*hMLH1*, *p16*, *HC1*などの遺伝子のメチル化を簡便かつ定量的に判定することができた。大腸癌25例の*MLH1*遺伝子プロモーター領域のメチル化を本法により検索した結果、8例にほぼ100%のメチル化を認めた。代表的なBiPS像をFig. 4に示した。同時に検出したマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability; MSI)は10例に認められ、8例のメチル化症例は全てMSI陽性であったことから、*MLH1*遺伝子のメチル化とMSIは強い相関性があると考えられた⁸⁾。メチル化は癌細胞の存在診断、予後推定も含めた悪性度診断などに応用できる可能性があり、今後の研究成果が期待される。

おわりに

SSCP法は塩基配列の異なるDNA鎖の分離検出に適した簡便で応用性の広い解析法であり、多くのアプリケーションが考えられる。今後もさらに多方面に応用されていくことが期待される。

文献

- 1) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
- 2) 前川真人. 遺伝子診断法/SSCP, 塩基配列決定法. 最新電気泳動実験法, 日本電気泳動学会編, 医歯薬出版, 東京, 1999: 332-339.
- 3) Sugano K, Nakashima Y, Yamaguchi K, Fukayama N, Maekawa M, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Sensitive detection of loss of heterozygosity in the p53 gene in pancreatic adenocarcinoma by fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis using blunt end DNA fragments. *Genes Chromosom Cancer* 1996; 15: 157-64.
- 4) Sugano K, Tsutsumi M, Nakashima Y, Yamaguchi K, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Diagnosis of bladder cancer by analysis of the allelic loss of the p53 gene in urine samples using blunt-end single-strand conformation polymorphism. *Int J Cancer* 1997; 74: 403-6.
- 5) Maekawa M, Sugano K, Ushima M, Masuda T,

- Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Relative ratios of mRNA molecules encoded by genes with homologous sequences using fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 223: 520-5.
- 6) Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushiana M, Fujita S, Gotoda T, Yokota T, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Increased expression of cyclooxygenase-2 to -1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28: 421-6.
- 7) Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet* 1999; 21: 163-7.
- 8) Maekawa M, Sugano K, Kashiwabara H, Ushiana M, Fujita S, Yoshimori M, Kakizoe T. DNA methylation analysis using bisulfite treatment and PCR-single-strand conformation polymorphism in colorectal cancer showing microsatellite instability. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 671-6.