

c-Ki-ras 癌遺伝子の点突然変異からみた同時性多発胃癌の研究

福岡大学医学部第2外科学教室

城戸 和明 神代龍之介 左野 千秋
山崎 繁通 田中 幸一 犬塚 貞光

同一症例の胃粘膜から発生する同時性多発胃癌（以下、多発胃癌と略記）の特性について検討するために多発胃癌20症例42病巣の c-Ki-ras 遺伝子（以下、*ras* と略記）を検索した。対照として単発胃癌、胃腺腫も検索した。

ras の点突然変異（以下、変異と略記）は多発胃癌20症例中7症例（35.0%）に認められ、単発胃癌の変異が56症例中6症例（10.7%）に認められたのに比べ推計学上有意に高率であった（ $p < 0.05$ ）。多発胃癌20症例42病巣中の変異率は、副病巣（9.1%）よりも主病巣（35.0%）に有意に高率に認められた（ $p < 0.05$ ）。単発胃癌よりも多発胃癌、早期癌よりも進行癌、副病巣よりも主病巣と、より malignant potential が高い病巣により高率に変異が認められ、変異は malignant potential を現していると考えられた。また多発胃癌の副病巣で変異が認められた症例においては、主病巣と違った変異形式が認められ、多発胃癌における各病巣間での転移浸潤判定の一助になる可能性が示唆された。

Key words: c-Ki-ras oncogene, multiple gastric carcinoma, gastric carcinoma, gastric adenoma

はじめに

同時性多発胃癌（以下、多発胃癌と略記）は胃癌全体の5~9%を占め^{1)~3)}、その病巣や背景粘膜に関する臨床病理学的検討は従来数多くなされている^{1)~10)}。しかし病巣の遺伝子レベルでの検討は、検索しえたかぎりにおいてはいまだなされていないようである。

一方、大腸においては家族性大腸ポリポージス¹¹⁾をはじめ腺腫や大腸癌の遺伝子検索が多くなされ、*ras* 癌遺伝子^{12)~16)}や癌抑制遺伝子¹⁷⁾について解析されている。とくに c-Ki-ras 遺伝子（以下、*ras* と略記）は、遺伝子配列の中のたった1つの塩基配列が変化した点突然変異（以下、変異と略記）によって細胞の異常増殖を起こすとされている。また *ras* 変異は大腸癌病巣のみならず、癌に隣接した非腫瘍部粘膜においても変異が認められている¹⁶⁾。大腸腫瘍において *ras* 変異は多段階発癌モデルの初期段階で起こっており、*ras* は消化器癌の発生に関与していることが知られている¹²⁾。また胃癌・胃腺腫そして前癌病変とみなされている腸上皮化生においても *ras* 変異が報告されている^{18)~20)}。

そこで多発胃癌における *ras* 遺伝子を検索し、多発胃癌の発生や発育・進展に *ras* 変異がどのように関与しているかを検討した。

対 象

1985年1月から1992年1月までの7年1か月間に福岡大学医学部第2外科教室で治療を行った胃癌症例は477症例であった。このうち肉眼的に2個以上の病巣が認められ、同部が病理組織学的に悪性と診断された多発胃癌は25症例（5.2%）であった。この25症例中ホルマリン固定パラフィン包埋切片よりDNAの抽出が可能であった多発胃癌20症例（2重癌18症例、3重癌2症例）42病巣（以下、多発群と略記）を検索した（Table 1）。

また同時期に新鮮凍結標本として十分量の癌細胞が採取可能であり、同部が病理組織学的に変性壊死でないことが確認された単発胃癌56症例56病巣（以下、単発群と略記）でも *ras* 変異を検索した（Table 1）。

福岡大学医学部第1病理学教室で病理検索された長径10mm以下の中程度異型細胞を有する胃腺腫36症例（以下、腺腫群と略記）および単発群の非腫瘍部胃粘膜8症例24部位（以下、非腫瘍群と略記）も検索に加えた（Table 1）。腺腫群は胃癌や他臓器癌を併発していない症例であり、生検で腺腫病変しか認められない例でも肉眼形態などより悪性像が否定できない症例は除

Table 1 Materials used in this study

Histology	Case	Lesion
Multiple gastric adenocarcinoma	20(4.2%)	42
Diff. carcinoma(pap, tub1, tub2) ^{a)}		37
Undiff. carcinoma(por, muc, sig) ^{b)}		5
Single gastric adenocarcinoma	56	56
Diff. carcinoma(pap, tub1, tub2) ^{a)}		28
Undiff. carcinoma(por, muc, sig) ^{b)}		28
Gastric tubular adenoma	36	36
Non-tumor gastric mucosa	8	24

a) Diff. : Differentiated

b) Undiff. : Undifferentiated

(2nd. Department of Surgery, Fukuoka Univ. 1985—1992, 1)

外した。

なお、多発胃癌は同時に2個以上の癌病巣が認められ、Moertelの診断基準²¹⁾を満たすものとした。すなわち1) いずれの病巣も病理学的に悪性であること、2) 病巣間は病理学的に正常の胃壁により隔てられていること、および3) 一方が他の浸潤や転移ではないことである。また、諸家の報告に準じ^{3)~10)}主病巣とは壁深達度がより進行しているもの、あるいは深達度が同一のものは病巣がより大きいものを指すこととした。

腫瘍要因の各因子の記載あるいは分類は胃癌取扱い規約²²⁾に従った。ただし、組織型は中村の分類²³⁾に準じ、分化型(乳頭状腺癌および高・中分化型管状腺癌)と、未分化型(低分化腺癌や膠様腺癌および印環細胞癌)の2つに分けた。また腫瘍肉眼型も胃癌取扱い規約²²⁾に準じ限局型(Borrmann 1型, 2型)と浸潤型(Borrmann 3型, 4型)に分けた。早期癌に関しては諸家の報告に準じて⁶⁾⁸⁾¹⁰⁾I型またはIIa型を主体とする隆起型とIIc型またはIIc+III型を主体とする陥凹型に分けた。

多発群と単発群の間における臨床病理学的所見では、多発群は同時期の単発群や胃癌全体に比べて男性に多く、平均年齢も高く、早期癌や分化型癌が高率であった(**Table 2**)。

方 法

DNA抽出は小病巣が多く新鮮凍結標本採取が困難であった多発群および腺腫群では、ホルマリン固定・パラフィン包埋標本より行った。各ブロックから10 μ m切片3枚を薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(以下、HEと略記)染色標本をガイドに病変部のみを切り出し、脱パラフィン処理を行ったのちDNAを抽出し

Table 2 Clinicopathological findings in 76 patients with gastric carcinoma

	Multiple gastric ca. 20 cases, 42 lesions	Single gastric ca. 56 cases, 56 lesions
♂ : ♀	15 : 5	28 : 28
Age(mean)	66.6	64.0
Region C : M : A	11 : 15 : 16	15 : 18 : 23
Borr. 0 : 1 : 2 : 3 : 4	29 : 1 : 2 : 5 : 5	14 : 4 : 10 : 9 : 19
I-IIb : IIc ^{a)}	8 : 21	7 : 7
Size(mean, cm)	2.8	6.4
D : U.D. ^{b)}	37 : 5	28 : 28
Early : Advance	29 : 13	15 : 41
INF ^{c)} α : β : γ	20 : 18 : 4	14 : 21 : 21
ly - : +	24 : 18	7 : 49
v - : +	32 : 10	17 : 39

a) I-IIb : I, IIa, IIb ; IIc : IIc, III

b) D : Differentiated carcinoma (pap, tub1, tub2)

U.D. : Undifferentiated carcinoma (por, muc, sig)

c) INF : Infiltration

た。

単発群は外科的に切除された標本の腫瘍部および肉眼的に正常と思われ、のちの組織学的検索で非腫瘍部胃粘膜と判定可能であった部位を可及的速やかに約3mm角の大ききで切り出し、液体窒素にて新鮮凍結標本として保存、DNA抽出のサンプルとした。またHE染色で各病巣を検索し、その組織型など病理学的検索を行った。同時に新鮮凍結標本においても十分量の癌細胞が採取されていることを確認した。

各標本の蛋白成分をproteinase Kで十分消化し、常法であるPhenol/Ethanol法にてDNAを抽出した。この中から0.1 μ gのDNAを鋳型DNAとしてPCRを施行した²⁴⁾。PCRは*ras*変異のほとんどがcodon 12, codon 61に生じていることから^{12)~15)19)}、各遺伝子配列をそれぞれはさむforwardとreverseの*ras* oncogene primer (Takara, Japan, Kyoto)を用い、プログラムインキュベーターはDNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer Cetus)を用いた。PCR cycleは94 $^{\circ}$ Cで1分間(denaturation)、55 $^{\circ}$ C (codon 12)および58 $^{\circ}$ C (codon 61)で各2分間(annealing)、72 $^{\circ}$ C 1分間(extension)で40回繰り返した。*ras*変異の有無は、正常および変異の塩基配列を有した*ras* oncogene probe (Takara, Japan)に末端標識キットMEGALABELTM (Takara, Japan)を用いてRIをラベルし、PCRによって増幅されたDNAと反応させる

Dot blot hybridization で解析を行った²⁵⁾. なお *ras* 変異が認められた症例で複数の DNA サンプル採取可能な例に関しては heterogeneity を考慮して、各サンプルでの *ras* 変異を検討したが、今回の検索では heterogeneity は認められなかった。

各症例の有意差検定には χ^2 検定を用い、危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

結 果

1) *ras* 変異：

ras 変異は全胃癌98病巣中15病巣(15.3%)に認められた (Fig. 1~3). 多発群においては20症例中7例

(35.0%)に *ras* 変異を認め、単発群での変異が56症例中6例(10.7%)に認められたのに比べて有意に高率であった ($p < 0.05$) (Table 3). しかし病巣数では多発群は42病巣中9病巣(21.4%)に変異を認め、単発群との間に有意差は認められなかった (Table 4, 5, Fig. 1, 2). また腺腫群の変異率は36症例中8症例(22.2%)であり、多発群や単発群に比べて有意差は認めなかった (Table 6, Fig. 3).

多発群の主病巣と副病巣との比較では、主病巣の変異率(35.0%)が副病巣の変異率(9.1%)より有意に高率であった ($p < 0.05$) (Table 3). 副病巣に変異が

Fig. 1 Point mutation in multiple gastric carcinoma. A DNA sequence encompassing codon 12 was amplified by PCR, applied to nylon filters and hybridized with the probes using 42 samples from 20 patients with multiple gastric carcinomas (samples 1-1~20-2).

a: Autoradiogram after hybridization to wild-type probe detecting GGT at codon 12. b~g: Autoradiogram after hybridization with mutant probes. In b, c, d, f and g, some cases show a positive reaction, respectively.

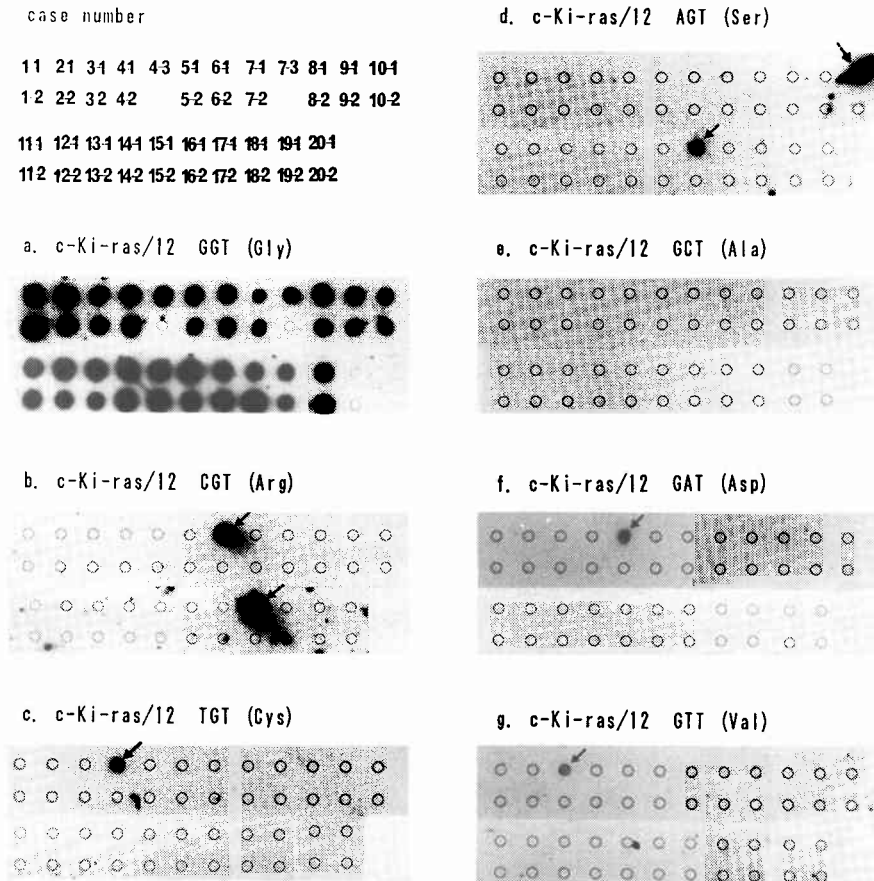


Fig. 2 Point mutation in single gastric carcinoma. A DNA sequence encompassing codon 12 using 56 samples from 56 patients with single gastric carcinoma (samples 1~56) and three samples from gastric carcinoma cell lines (samples: cell line 1~3).

a: Autoradiogram after hybridization to wild-type probe detecting GGT at codon 12. b~g: Autoradiogram after hybridization with mutant probes. In f and in g, some cases show a positive reaction.

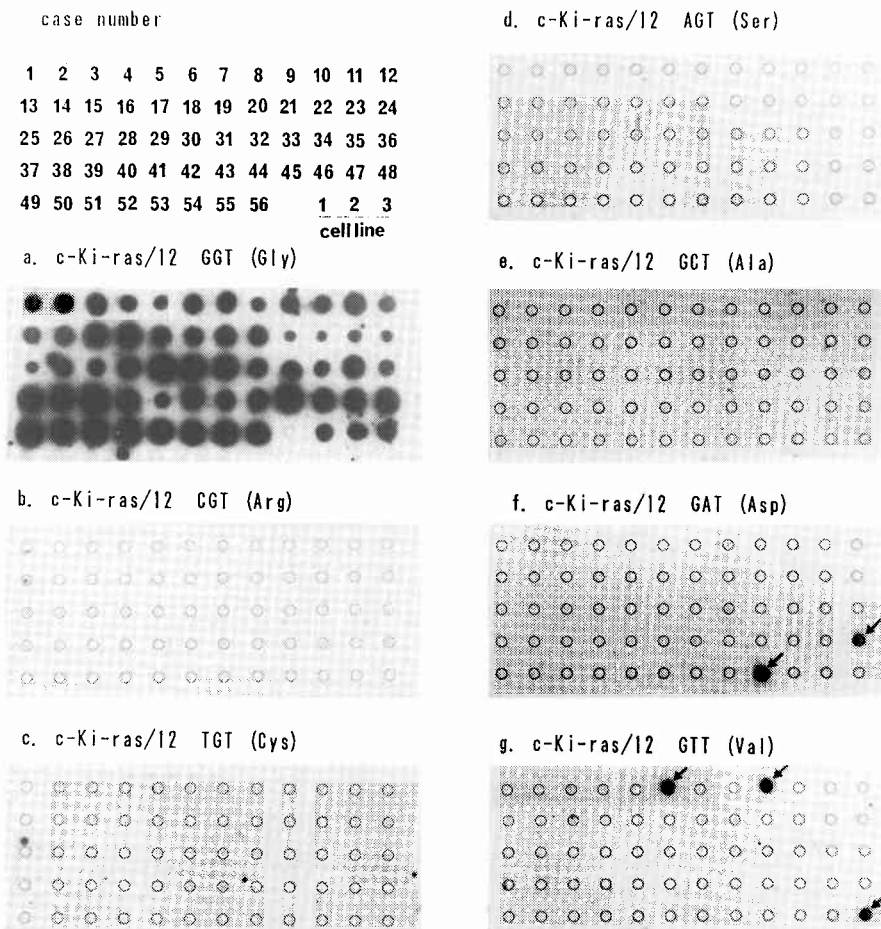


Table 3 Incidence of the point mutation of the c-Ki-ras oncogene in the multiple or single gastric carcinoma

Type of occurrence	Mutation site		Total
	Codon 12	Codon 61	
Multiple gastric carcinoma (n=20)			
Main lesion tested n=20	6	1	7(35.0%)
Sublesion tested n=22	1	1	2(9.1%)
Single gastric carcinoma (n=56)			
Lesion tested n=56	4	2	6(10.7%)

* : p<0.05

Fig. 3 Point mutation in gastric adenoma. A DNA sequence encompassing codon 12 using 36 samples from 36 patients with gastric adenoma (samples 1~36).

a: Autoradiogram after hybridization to wild-type probe detecting GGT at codon 12. b~g: Autoradiogram after hybridization with mutant probes. In b, c and d, some cases show a positive reaction.

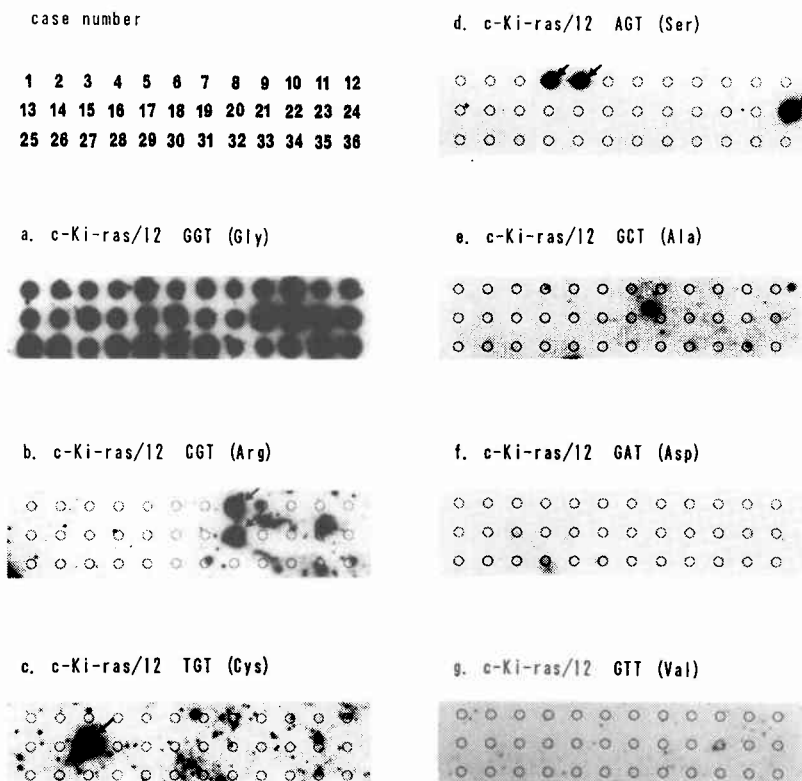


Table 4 Incidence of the point mutation of the c-Ki-ras oncogene in the multiple gastric carcinoma

Histological type	Mutation site		Total
	Codon 12	Codon 61	
Diff. ^{a)} carcinoma(pap, tub1, tub2) n=37	5	2	7(19.0%)
Undiff. ^{b)} carcinoma(por, muc, sig) n= 5	2	0	2(40.0%)
Total case n=42	7	2	9(21.4%)

Mutation type : Gly(GGT) → Ser(AGT) 2
 → Arg(CGT) 2
 → Cys(TGT) 1
 → Asp(GAT) 1
 → Val(GTT) 1
 Gln(CAA) → Glu(GAA) 1
 → His(CAC) 1

a) Diff. : Differentiated
 b) Undiff. : Undifferentiated

Table 5 Incidence of the point mutation of the c-Ki-ras oncogene in the single gastric carcinoma

Histological type	Mutation site		Total
	Codon 12	Codon 61	
Diff. ^{a)} carcinoma(pap, tub1, tub2) n=28	1	1	2(7.1%)
Undiff. ^{b)} carcinoma(por, muc, sig) n=28	3	1	4(14.0%)
Total case n=56	4	2	6(10.7%)
Mutation type: Gly(GGT) → Val(GTT)	2		
→ Asp(GAT)	2		
Gln(CAA) → Lys(AAA)		1	
→ Pro(CCA)		1	

a) Diff. : Differentiated
 b) Undiff. : Undifferentiated

Table 6 Incidence of the point mutation of the c-Ki-ras oncogene in the gastric tubular adenoma and non-tumor gastric mucosa

Histological type	Mutation site		Total
	Codon 12	Codon 61	
Gastric tubular adenoma n=36	6	2	8(22.2%)
Non-tumor gastric mucosa n=24	0	0	0(0%)
Mutation type: Gly(GGT) → Ser(AGT)	3		
→ Arg(CGT)	2		
→ Cys(TGT)	1		
Gln(CAA)→ Glu(GAA)		2	

起こった2症例(M-4, M-10)では主病巣にも変異が認められた (Table 7).

多発群の組織型では多発群42病巣のうち分化型37病巣中7病巣 (19.0%)に, 未分化型5病巣中2病巣 (40%)に変異が認められた (Table 4). 深達度は変異がみられた9病巣中早期癌4病巣(m : 2, sm : 2), 進行癌5病巣(pm : 1, ss : 1, se : 3)であった (Table 7). 変異が生じた9病巣中7病巣はcodon 12に, 2病巣はcodon 61であった (Table 4, 7). Codon 12での変異7病巣中2病巣の塩基配列の変異はcodon 12のアミノ酸が正常の場合のグリシン (Gly) からセリン (Ser) へ変換したことを示している. ほかにアルギニン (Arg) への変異は2病巣, システイン (Cys) への変異1病巣, アスパラギン酸 (Asp) への変異1病巣, バリン (Val) への変異1病巣であった. Codon 61での変異は2病巣であり, その塩基配列の変異は61番目の正常のアミノ酸であるグルタミン (Gln) が1病巣ではグルタミン酸 (Glu) へ, 1病巣ではヒスチジン (His) へ変異したことを示していた. 変異別ではcodon 12の変異が9例中7例 (77.8%)と高頻度であった (Table

4, Fig. 1).

単発群の組織型では分化型で28病巣中2病巣 (7.1%)に, 未分化型で28病巣中4病巣 (14.3%)に変異が認められた (Table 5). また変異部位はcodon 12において4病巣 (Gly から Val への変異2病巣, Asp への変異2病巣), codon 61において2病巣 (Gln からリジン (Lys) への変異1病巣, プロリン (Pro) への変異1病巣) であり, 多発群と同様にcodon 12が66.7%と高率であった (Table 5, Fig. 2). 深達度では変異がみられた6病巣全例が進行癌(pm : 1, ss : 1, se : 4)であった (Table 7).

腺腫群で変異がみられた8病巣の変異部位はcodon 12に6病巣, codon 61に2病巣認められ, 変異の75%はcodon 12に生じ, 胃癌と同様の傾向が認められた.

一方, 非腫瘍群には1例にも変異は認められなかった (Table 6).

2) 臨床病理学的所見との比較 :

各臨床項目と多発群および単発群の ras 変異を詳細に検討したが, 有意な差は認められなかった (Table 2).

Table 7 Cases of multiple and single gastric carcinoma and adenoma with point mutation of the c-Ki-ras oncogene

Group	Case No. ^{a)}	Age/Sex	Codon	Mutation ^{c)}	Histology
M	M-3-1 ^{b)}	79/F	12	GGT→GTT(Val)	tub2, se
	M-4-1	70/M	12	GGT→TGT(Cys)	tub1, sm
	M-4-3		12	GGT→GAT(Asp)	tub1, m
	M-6-1	57/M	12	GGT→CGT(Arg)	por, ss, CA ^{d)}
	M-7-1	79/M	61	CAA→GAA(Glu)	tub2, sm
	M-10-1	64/M	12	GGT→AGT(Ser)	por, se, RC ^{d)}
	M-10-2		61	CAA→CAC(His)	tub1, m
	M-17-1	60/M	12	GGT→AGT(Ser)	tub2, se
	M-18-1	74/M	12	GGT→CGT(Arg)	tub2, pm
S	S-6	54/M	12	GGT→GTT(Val)	por, se
	S-9	62/M	12	GGT→GTT(Val)	pap, pm
	S-26	67/F	61	CAA→AAA(Lys)	pap, ss
	S-34	78/F	61	CAA→CCA(Pro)	por, se
	S-48	70/F	12	GGT→GAT(Asp)	por, se
	S-56	69/F	12	GGT→GAT(Asp)	por, se
A	A-4	80/M	12	GGT→AGT(Ser)	tubular adenoma
	A-5	61/F	12	GGT→AGT(Ser)	tubular adenoma
	A-8	50/M	12	GGT→CGT(Arg)	tubular adenoma
	A-11	75/M	61	CAA→GAA(Glu)	tubular adenoma
	A-15	60/M	12	GGT→TGT(Cys)	tubular adenoma
	A-20	95/M	12	GGT→CGT(Arg)	tubular adenoma
	A-24	90/M	12	GGT→AGT(Ser)	tubular adenoma
	A-26	81/M	61	CAA→GAA(Glu)	tubular adenoma

a) M: Multiple carcinoma, S: Single carcinoma, A: Adenoma

b) 1: Main lesion; 2 or 3: Sublesion

c) Val: Valine, Cys: Cystine, Asp: Asparaginic acid, Arg: Arginine,

Glu: Glutamic acid, Ser: Serine, His: Histidine, Lys: Lysine, Pro: Proline

d) CA: colon adenoma, RC: rectal carcinoma

3) 術後生存率

多発群, 単発群ともに各 stage 別, 全体での *ras* の変異の有無による術後生存率に差は認められなかった。

考 察

多発胃癌は1855年 Barth によって報告されて以来, 病巣および背景粘膜について種々の臨床病理学的検索がなされている^{1)~10)}。すなわち多発胃癌は全胃癌の5~9%前後を占め^{1)~3)5)10)}、男性に多く^{1)~4)7)~10)}、早期胃癌の占める割合が多い^{1)~3)7)9)10)}などである。しかも胃癌に占める頻度は近年増加しつつある。今回の多発胃癌の検索はホルマリン固定下に肉眼的に確認可能であった病巣はすべて切り出したが、その頻度は5.2%とやや低率であった。馬場ら²⁰⁾が胃の全領域から組織片を作製(全割)することにより多発胃癌の頻度が約2倍に増加したとしていることから、臨床・病理学的に検索できなかった病巣の存在が考えられた。今後の検索では、術前の微小病巣への注意深い観察と主病巣の

みならず第2, 第3の病巣を絶えず念頭においた切除胃の詳細な検索の必要性を考えさせられた。

多発胃癌は胃癌全体の5.2%を占めていたが、男女比は3:1と男性に多く、早期癌も42病巣中29病巣(69.0%)であった。同時期に経験した全胃癌症例に占める早期胃癌の割合が33.3%であったのに比べ高率であった。主・副病巣とも早期癌である多発早期胃癌に限っても検討されており^{6)~10)}、多発胃癌の特徴のほか主・副病巣とも肉眼型・組織型を同じくする傾向にあると報告されている。今回の検討でも多発早期胃癌は多発胃癌20例中8例(40%)に認められ、男女比は3:1で、全例とも高・中分化型管状腺癌であり、8例中7例は両病巣とも同一の組織型であった。また5例は両病巣ともに同一の肉眼型(IIC)を呈していた。このように多発胃癌の病巣や腸上皮化生など背景粘膜に関しては従来多くの臨床病理学的検討がなされているが、病巣の遺伝子レベルでの検討については著者が

検索しえたかぎりいまだ報告をみないようである。

近年、生化学的手技の発達により50種以上の癌遺伝子や癌抑制遺伝子が発見されている。消化器腫瘍についても多数の癌遺伝子が解析されているが、各臓器癌に共通する癌遺伝子や高頻度に出現する癌遺伝子は少ないとされている。しかし、癌遺伝子の中でも *ras* は消化管腫瘍、特に大腸腫瘍に関して多くの検討がなされ、大腸癌においては40~50%^{12)~16)}、膵癌では80%以上^{27)~29)}に変異が認められている。Nagata ら³¹⁾は、胃癌25例と大腸癌30例について c-H-, c-Ki-, N- の3種の *ras* の codon 12, 13, 61 の9種類について検索を行い、胃癌で25例中2例、大腸癌で40例中8例の変異を認めている。しかし、組織病理学的検索はなされていない。また、胃癌において O'Hara ら³²⁾は N-*ras* の codon 61 の変異を報告し、Deng ら³³⁾は c-H-*ras* の codon 12を、Bos ら¹⁸⁾は c-Ki-*ras* の codon 12を、Nishida ら³⁴⁾は N-*ras* の codon 13の変異を報告している。また、PCR と選択的ハイブリダイゼーション法を用いることにより、ホルマリン固定パラフィン包埋永久標本切片からの微量DNAでも癌遺伝子の検索が可能となった²⁴⁾²⁵⁾³⁰⁾。そして永久標本を用いた検索でも、その頻度・部位ともに新鮮凍結標本を用いた検索と差がないこともすでに明らかにされている¹⁶⁾²⁴⁾³⁰⁾。このため過去の症例のDNAも研究に加えることができ、retrospective な研究が可能となった。

今回の検討では胃癌98病巢中15病巢(15.3%)に *ras* の変異を認めた。この頻度は単発胃癌一般で報告されている頻度よりも高率ではあるが、その原因は多発群での変異頻度による。多発群では20症例中7症例(35.0%)に *ras* の変異を認め、単発群56症例中6症例(10.7%)に比べ *ras* 変異が有意に高率に認められた ($p < 0.05$)。しかし病巢数では多発群と単発群との間に有意差は認められなかった。個体が悪性腫瘍に罹患すれば、他の罹患していない個体に比較して malignant potential があると考えられる。また単発群よりも多発群個体の胃粘膜のほうが malignant potential をより有していると思われる。多発群の症例単位での *ras* 変異が単発群や病巢単位のそれよりも高率であったことや、早期癌であっても進行癌であっても単発群よりも多発群に高頻度に *ras* 変異が認められることは、この多発群個体の有する malignant potential を現しているものと思われる。

胃癌全体では15.3%に *ras* 変異が認められたが、分化型癌での *ras* 変異率13.8% (65病巢中9病巢)に比

べ、未分化型における *ras* 変異率18.8%(33病巢中6病巢)が高率であり、胃癌の *ras* 変異は分化型に好発するとして報告¹⁹⁾³¹⁾とは一致しない結果が得られた。しかし、Koshiba ら³⁵⁾は分化型では変異は認めず、未分化型に変異を認めており、胃癌における *ras* 変異と組織型との関係は、いまだ一定の見解は得られていないといえる。また分化型における *ras* 変異率13.8%は Kihara ら¹⁹⁾が報告している分化型癌の変異率17.6%よりも低率であった。分化型の変異が低率であった原因としては、今回の検索では分化型のなかで早期癌が60%(39/65)を占めたためと思われた。今回の結果では早期癌より進行癌に高率に *ras* 変異が生じており、分化型であっても早期癌であるため *ras* 変異が認められず、分化度のみならず深達度によって変異率が低下したと考えられた。

ras 変異は、多発群では早期癌29病巢中4病巢(13.8%)、進行癌13病巢中5病巢(38.5%)であり、単発群では早期癌15病巢では認めず、進行癌41病巢中6病巢(14.6%)であった。多発・単発群ともに進行癌が早期癌よりも *ras* 変異率は高かったが、有意差は認めなかった。単発群の早期癌に *ras* 変異が認められなかった原因としては、腺腫群や多発群の早期癌そして進行癌には *ras* 変異が認められていることから *ras* 変異を介する発癌モデルが報告されている¹⁹⁾が、*ras* 変異を介しない発癌機構も考えられた。しかし微小で潰瘍病変を伴った早期癌に関しては炎症細胞などの正常細胞DNAがPCRによって、より増幅された可能性も考えられる。

以上のように *ras* 変異は単発群よりも多発群に、早期癌よりも進行癌に、そして分化型よりも未分化型に、より高頻度に認められ、その発現はより悪性度が高い群に認められている。すなわち *ras* 変異の発現は個体や病巢の malignant potential を現していると考えられた。そして多発群で *ras* 変異が副病巢よりも主病巢に好発していたこと、単発群の早期癌では *ras* 変異が認められなかったことなどから、胃癌に関しては malignant potential の高い病巢が発癌した後に *ras* 変異は生じてくるものと考えられた。

Kihara ら¹⁹⁾は胃腺腫に43%と高率に変異を認め、腺腫癌連鎖を支持している。今回の腺腫群の変異率は22.2%であった。この差は、大腸腺腫の大きさに比例して変異率の増加することが報告¹⁹⁾¹⁴⁾されていることを考えれば、検索した腺腫群がすべて径10mm以下の小病巢からの生検標本であったためと考えられた。

Vogelstein ら¹²⁾は大腸腺腫の異型度が進行するにしたがい *ras* 変異も高率となるが、癌では減少していると報告している。しかし、一度変異を起こした *ras* が、どうして大腸腺腫の癌化とともに正常化するのかが報告されていない。胃腺腫と大腸腺腫とでは、その臨床的振る舞いも取り扱われ方にも大きな違いがあるため、今後の検討が必要と思われる。

多発群の副病巣に *ras* 変異が生じた2例では両症例とも主病巣でも *ras* 変異が認められている。3重癌である症例番号 M-4では、深達度 sm の主病巣に codon 12での変異が認められた。第1副病巣、第2副病巣は両者とも粘膜癌であったが、より小さい第2副病巣に主病巣と同様に codon 12での変異が認められた。組織型は両病巣とも高分化腺癌であり、第2副病巣が主病巣の転移浸潤である可能性も考えられるが、同じ codon 12での変化でも、その遺伝子配列の変化はアミノ酸のレベルでは、主病巣がグリシン (Gly) からシステイン (Cys) への変異であるのに対し、副病巣ではグリシン (Gly) からアスパラギン酸 (Asp) への変異であり、転移浸潤である可能性は少ないと判定可能である。これに対し2重癌である M-10では、主病巣 (por) は codon 12において *ras* 変異が生じており、副病巣 (tub1) では codon 61での変異が認められた。組織型および *ras* 変異の codon の違いにより、両病巣が違うクローンから発生した癌であることが推察可能である。

Moertel の多発胃癌の診断基準²¹⁾では、一方が他の浸潤や転移でないことが条件であるが、この診断は容易ではない²⁾。このため脈管侵襲がないか、あっても軽度のもを多発胃癌とし、浸潤や転移の可能性を排除しようとする考えもある²²⁾。今回の検索では各病巣間に heterogeneity は認められなかったため、癌病巣個々の各種癌遺伝子を参考にすることも多発胃癌の診断に有用であると考えられた。

ras 変異の頻度が高率であった多発群においても症例に対しての変異率は35.0%であり、残りの症例では少なくとも今回の検討で *ras* の変異は認められなかったし、その働きについての鍵となるような要因は検出できなかった。Fujita ら³⁶⁾が報告したように胃癌発生に関しては、*ras* 遺伝子の関与は少ないようであるが、大腸癌のように癌発生のモデルを想定するためには、今後、他の各種癌遺伝子や癌抑制遺伝子の検索が必要のように思われた。

稿を終えるにあたり、実験の機会を下さり、御指導を賜り

ました福岡大学医学部第1病理学教室の菊池昌弘教授、村山 寛助教授に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は第81回日本病理学会総会、第40回日本消化器外科学会総会、第93回日本外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) 小坂建夫, 三輪晃一, 米村 豊ほか: 多発胃癌の臨床病理学的検討. 日消外会誌 21: 2362-2365, 1988
- 2) 石井淳一, 片岡 徹, 河村一敏ほか: 多発胃癌の臨床病理学的検討. 消外 11: 145-152, 1988
- 3) 石原 省, 中島聡總, 太田恵一朗ほか: 多発胃癌の臨床病理学的検討. 日臨外医会誌 52: 2821-2827, 1991
- 4) 齊藤善広, 大内明夫, 後藤慎二ほか: 多発胃癌の臨床病理学的検討. 日消外会誌 22: 32-37, 1989
- 5) 城所 功, 林田康男, 卜部元道ほか: 多発胃癌. 外科 MOOK 28: 155-164, 1982
- 6) 亀岡信悟, 押淵英晃, 鈴木博孝ほか: 多発早期胃癌の臨床病理学的検討. 癌の臨 24: 289-292, 1978
- 7) 東 昇, 鎌野俊紀, 榊原 宣ほか: 多発早期胃癌の検討. 日臨外医会誌 49: 431-437, 1988
- 8) 飯田辰美, 大貫義則, 渡辺 敬ほか: 多発早期胃癌の臨床病理学的検討. 癌の臨 34: 81-88, 1988
- 9) 吉川時弘, 北村正次, 荒井邦佳ほか: 多発早期胃癌の臨床病理学的検討. 日消外会誌 22: 1062-1066, 1989
- 10) 孝富士喜久生, 橋本 謙, 田中裕穂ほか: 多発早期胃癌(二重複癌)の臨床病理学的, 免疫組織学的検討. 日臨外医会誌 52: 299-304, 1991
- 11) Sasaki M, Sugio K, Sasazuki T: K-ras activation in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli. Cancer 65: 2576-2579, 1990
- 12) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al: Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 319: 525-532, 1988
- 13) Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR et al: Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. Nature 327: 293-297, 1987
- 14) Kathleen F, Concepcion A, Kyuhyung H et al: Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. Nature 327: 298-303, 1987
- 15) Ando M, Maruyama M, Oto M et al: Higher frequency of point mutations in the c-K-ras 2 gene in human colorectal adenomas with severe atypia than in carcinomas. Jpn J Cancer Res 82: 245-249, 1991
- 16) Burmer GC, Loeb LA: Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of

- human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2403—2407, 1989
- 17) Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y et al: Mutations of chromosome 5q 21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253 : 665—669, 1991
 - 18) Bos JL, de Vries V, Marshall CJ et al: A human gastric carcinoma contains a single mutated and an amplified normal allele of the Ki-ras oncogene. *Nucl Acid Res* 14 : 1209—1218, 1986
 - 19) Kihara T, Tsuda H, Hirota T et al: Point mutation of c-Ki-ras oncogene in gastric adenoma and adenocarcinoma with tubular differentiation. *Jpn J Cancer Res* 82 : 308—314, 1991
 - 20) 横崎 宏, 国安弘基, 中山宏文ほか: 腸上皮化生における遺伝子異常. *病理と臨* 10 : 1130—1134, 1992
 - 21) Moertel CG, Barga JA, Soule ED: Multiple gastric cancers. Review of the literature and study of 42 cases. *Gastroenterology* 32 : 1095—1103, 1957
 - 22) 胃癌研究会編: 胃癌取扱規程. 第11版. 金原出版, 東京, 1985
 - 23) 中村恭一: 胃癌の構造. 第2版. 医学書院, 東京, 1990
 - 24) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 230 : 487—491, 1985
 - 25) 長田康彦, 玖珠 洋: 合成オリゴヌクレオチドを用いる dot hybridization—c-ras 遺伝子における点突然変異の検索—。日臨 48 : 1771—1777, 1990
 - 26) 馬場保昌, 中村恭一, 菅野晴夫ほか: 二重複胃癌の病理組織学的研究—組織型の組み合わせに関する解析—。癌の臨 19 : 28—38, 1973
 - 27) 多田 稔, 横須賀収, 小俣政男ほか: 隣腫瘍における発癌遺伝子“Ras”の point mutation の直接塩基配列決定法による解析. *日消病会誌* 86 : 2566—2571, 1989
 - 28) Smit VTHB, Boot AJM, Smits AMM et al: KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinoma. *Nucleic Acids Res* 16 : 7773—7782, 1988
 - 29) Almoguera C, Shibata D, Forrester K et al: Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53 : 549—554, 1988
 - 30) Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ: Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 167 : 225—230, 1988
 - 31) Nagata Y, Abe M, Kobayashi K et al: Glycine to aspartic acid mutation at codon 13 of the c-K-ras gene in human gastrointestinal cancer. *Cancer Res* 50 : 480—482, 1990
 - 32) O'Hara BM, Oskarsson M, Tainsky MA et al: Mechanism of activation of human ras genes cloned from a gastric adenocarcinoma and a pancreatic carcinoma cell line. *Cancer Res* 46 : 4695—4700, 1986
 - 33) Deng G, Lu Y, Chen S et al: Activated c-Ha-ras oncogene with a Guanine to Thymine transversion at the twelfth codon in a human stomach cancer cell line. *Cancer Res* 47 : 3195—3198, 1987
 - 34) Nishida J, Kobayashi Y, Hirai H et al: A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in a human stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 146 : 247—252, 1987
 - 35) Koshiha M, Ogawa O, Habuchi T et al: Infrequent ras mutation in human stomach cancers. *Jpn J Cancer Res* 84 : 163—167, 1993
 - 36) Fujita K, Ohuchi N, Yao T et al: Frequent overexpression, but not activation by point mutation, of ras gene in primary human gastric cancers. *Gastroenterology* 93 : 1339—1345, 1987

A Study on c-Ki-ras Oncogene Point Mutation in Synchronous Multiple Gastric Carcinoma

Kazuaki Kido, Ryunosuke Kumashiro, Chiaki Sano, Shigemichi Yamasaki,

Kouichi Tanaka and Sadamitsu Inutsuka

Second Department of Surgery, School of Medicine, Fukuoka University

In 42 lesions of 20 cases of multiple gastric carcinoma, the c-Ki-ras oncogene was examined to investigate the characteristics of that carcinoma caused from gastric mucosa. A point mutation at c-Ki-ras was observed in 7 (35%) of 20 cases of multiple gastric carcinoma. The mutation ratio was statistically significantly higher than that of single gastric carcinoma, in which the point mutation was found in 6 (10.7%) of 56 cases. The mutation rate in 42 lesions of 20 cases of multiple gastric carcinoma was significantly higher in the main lesions (35.0%) than in the

sublesions (9.1%). The point mutation was more found having more malignant potential cases example for in multiple gastric carcinoma than single gastric carcinoma, advanced case than early case, main lesion than sublesion, so point mutation might be showing its malignant potential. In cases showing the c-Ki-ras mutation in the sublesions of multiple gastric carcinomas, types of c-Ki-ras mutations that differed from those in the main lesions were found. Therefore, it was suggested that observation of the c-Ki-ras mutation type may be helpful in judging metastasis and infiltration in multiple gastric carcinoma lesions.

Reprint requests: Kazuaki Kido Second Department of Surgery, School of Medicine, Fukuoka University
7-45-1 Nanakuma, Jyounan-ku, Fukuoka-shi, 814-01 JAPAN
