

研究速報

膵胆管合流異常における K-ras 遺伝子の点突然変異

松原 俊樹 笹山 可則 神野 治 丸上 善久  
 落合 正宏 船曳 孝彦 松本 和幸\* 廣野 巖\*

はじめに：膵胆管合流異常症では膵液の胆道内逆流に基づき高率に胆道癌が合併する。われわれはこれらの発癌機序を遺伝子レベルで検討することは重要であると考え、合流異常の胆道粘膜における K-ras 系遺伝子の突然変異について解析を行った。

対象：膵胆管合流異常患者11例（癌合併3例、非癌8例）の胆嚢および胆管組織を癌部、非癌部（過形成または化生部、正常部）に分け、非合流異常患者3例の胆嚢と比較検討した。

材料と方法：材料は外科的に摘出し、ホルマリン固定後パラフィン包埋したブロックから5~7 $\mu$ mの薄切切片より H.E 染色標本をもとに目的とする胆道粘膜を実体顕微鏡下で選択的に切り出し、セパジーン・キット(三光純薬)を用いて DNA を抽出した。K-ras, exon 1 に対する primer を DNA 合成機 (ABI Model 1391) にて作製し、DNA 1 $\mu$ l と 0.7unit の taq polymerase (宝酒造) および 15pmol ずつの [ $\alpha$ -32P] dCTP を用い、polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) 法により点突然変異の有無について検索した。PCR は DNA 増幅装置 (MI Research) を用いて、94度 0.5分、55度 1分、72度 2分を35回行った。5 $\mu$ l の PCR 反応液にホルムアミド色素液 (95% formamide, 20mM EDTA, 0.5% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) 45 $\mu$ l の希釈液を加え、80度で2分間熱変性後、2 $\mu$ l ずつ 5% polyacrylamide gel に注入し 40W, 1.5~3時間、室温の条件で電気泳動を行った。次に SSCP ゲルより異常バンドを切り取り 50 $\mu$ l の蒸留水で溶解し (80度 30分間) DNA を抽出した。その 20 $\mu$ l を template として 2.5 unit の Taq polymerase と 50 および 5pmol の primer を用いて 94度 0.5分、55度 1分、72度 2分の asymmetric PCR による DNA の増幅を行った。エタノール沈殿後、Ultrafree C3GC filter (Millipore Ltd.) による未反応の塩基および primer の除去を行い、[ $\alpha$ -32P] dCTP を用いた Sequenase Version 2.0 (United states Biochemical Corp.) によるシーケンス反応を行った。PCR産物は 60W, 1.5~2時間、室温の条件で

Fig. 1 SSCP Analysis of K-ras Exon 1 in Pancreatico-Biliary Maljunction  
 G: Gallbladder (non PBM), K: Kidney (non PBM), Car: Carcinoma, H.M: Hyperplasia and/or Metaplasia, N: Normal epithelium,  $\circ$ : Abnormal shifted band



行い、6% polyacrylamide gel にて電気泳動した。  
 結果：コントロールとした腎組織および非合流異常の胆嚢粘膜のバンドに対し、合流異常の胆道粘膜は癌部、過形成部、化生部、正常部の検体とともに異常バンドが検出され (Fig. 1 に結果の一部を示す)、direct sequence による塩基配列では codon 12 における GGT の gly が asp にすなわち GAT への mutation を認めた。この点突然変異は癌部で 3 例中 3 例 (100%)、過形成部および化生部で 6 例中 5 例 (83%)、正常部で 10 例中 6 例 (60%) に認めた。  
 考察：膵胆管合流異常症における K-ras 遺伝子の変異に関する詳細な報告はない。今回の検討では非合流異常の胆道粘膜では K-ras 遺伝子の変異では認められないのに対し、合流異常の胆道粘膜では癌部のみならず非癌部においても認められることが判明し、すでに発癌準備状態にあることが示唆された。今後合流異常と共に先天的に遺伝子変異が存在しているのか、合流異常の病態が後天的に遺伝子変異をおこすのか、それはいつかなどの検討を行いたい。

Key word: K-ras in pancreatico-biliary maljunction  
 文献: 1) 林 健志: SSCP 法による核酸配列変化の検出. 実験医 9: 95-98, 1991

K-ras Gene Mutations in Pancreatico-Biliary Maljunction

Fujita Health University, School of Medicine, Department of Surgery, \*Second Department of Pathology. Toshiki Matsubara, Yoshinori Sasayama, Osamu Jinno, Yoshihisa Marugami, Masahiro Ochiai, Takahiko Funabiki, Kazuyuki Matumoto\* and Iwao Hirono\*

<1995年3月8日受理> 別刷請求先: 松原 俊樹 〒470-11 豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98 藤田保健衛生大学船曳外科