日消外会誌 30（4）：897〜900，1997年

特集3

MASA法による変異遺伝子の検出とその臨床応用

熊本大学第2外科
林　尚子　江上　寛　高野　定　小川　道雄
大阪成人病センター外科
中森正二　今岡真義
東京大学医科学研究所分子病態施設
中村祐輔

Mutant-allele-specific amplification (MASA) 法により，約1万個の正常細胞中に含まれる遺伝子変異をもつ1個の腫瘍細胞を簡便に検出することができる．組織学的にリンパ節転移陰性と診断された大腸癌手術症例120例について，リンパ節に原発巣と同じ遺伝子変異が存在するか否かMASA法を用いて検討した．原発巣にK-rasあるいはp53遺伝子の変異を認めたのは71例であり，遺伝子診断でリンパ節転移陽性とされた37例中27例は術後5年以内に再発し，転移陰性とされた34例は全例において再発はみられず，遺伝子診断によるリンパ節転移と予後には高い相関が認められた．また，膵癌の早期診断を目的とし本法を用い，膵液中の変異K-ras遺伝子の検出を行ったところ，膵癌の80%（5例中4例）に膵液中から変異を検出できた．本法を臨床応用することで，正確な予後判定や癌の早期診断が可能になるものと思われる．

Key words: mutant-allele-amplification (MASA) method, lymph node metastasis of colorectal cancer, K-ras gene mutations in pancreatic juice

はじめに

発癌過程に癌遺伝子，癌抑制遺伝子，ミスマッチ修復遺伝子の異常が関与している．これらの遺伝子異常を癌細胞の指標とすることは，癌の早期診断，浸潤・転移の判定に有用である．遺伝子の変異解析には，検体よりDNAを抽出し，目的とする遺伝子をPCRで増幅し，シークエンスを行うのが一般的であるが，日常臨床の場で行うには繁雑である．また，PCR法により，微量の遺伝子の検出は容易になったものの，多量の正常細胞中から1個の変異遺伝子をもつ細胞を検出することは，その変異が正常型で稀釈されてしまうため困難である．

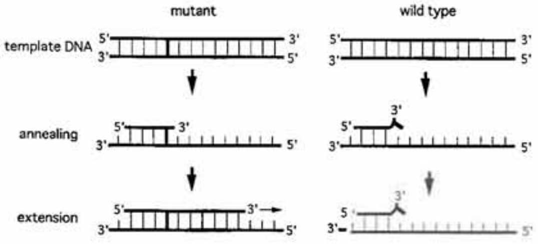
既知の遺伝子異常を最も効率よく検出する方法の1つとして，mutant-allele-specific amplification (MASA) 法[1]が開発された．このMASA法を微量の変異遺伝子を鋭敏に検出する方法として，癌の診断に応用するため，その感度を明らかにするとともに，臨床的意義について検討した．

1．MASA法の原理と感度：

Fig. 1のように，3′末端が変異特異的塩基になるよう設定した合成オリゴヌクレオチドプライマーを用い，厳密な条件設定のもとにPCR反応を行うと，多量の正常遺伝子中に混在するごく少量の変異遺伝子を特異的に検出することができる[1]．

本法の検出感度を調べるため，K-ras遺伝子のコド

Fig. 1 Principle of mutant-allele-specific amplification (MASA) method



＊第48回日消外会総会シンポ1・消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開
<1996年12月11日受理>別刷請求先：小川　道雄
〒860　熊本市本荘1−1−1　熊本大学医学部第2外科

Fig. 2 PCR amplification (MASA) after serial dilution of k-ras mutant DNA
M: marker, 1: mutant DNA 100ng, 2: mutant DNA 10ng/total DNA 100ng, 3: mutant DNA 1 ng/total DNA 100ng, 4: mutant DNA 0.1ng/total DNA 100ng, 5: mutant DNA 0.01ng/total DNA 100ng, 6: mutant DNA 0.001ng/total DNA 100ng, 7: normal DNA 100ng

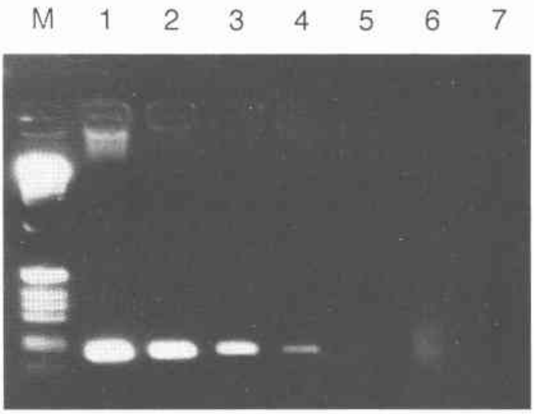


Table 1 Correlation of recurrence with lymph node metastasis by genetic method

	Recurrence		Total No.
	+	−	
Genetic diagnosis			
+	27	10	37
−	0	34	34
Total No.	27	44	71

p<0.0001

Table 2 Occurrence of micrometastasis for lymph nodes in relation to Dukes' stages

Dukes' stage	Cancer with recurrence [gn(+)(%)]	Cancer without recurrence [gn(+)(%)]	p
A	8/8 (100)	10/31(32.3)	0.0007
B	19/19(100)	0/13(0)	<0.0001
Total	27/27(100)	10/44(22.7)	<0.0001

ン13GGC が GAC と変異する大腸癌の DNA と正常型の DNA を準備した．この変異がプライマーの3′末端に対応するような変異プライマーを作製し，変異遺伝子のみが増幅されるように PCR の条件を設定した．その厳密な条件のもとで，変異遺伝子を正常遺伝子で稀釈し，PCR を行い，検出感度を測定した．

その結果，**Fig. 2** に示すように，1万倍の稀釈までの変異遺伝子を検出することができた．その感度は，約0.01％であり，他の方法の最高感度が0.1％であるのに比べて最も感度が高かった[2]．

このように，MASA 法により，既知の遺伝子異常を鋭敏にしかも簡便に検出することができるため，我々は，この方法をヒト癌における点突然変異の検出（微小リンパ節転移診断，手術操作により散布された癌細胞の検出，膵液を用いた膵癌の早期診断など）に応用している．ここでは，大腸癌のリンパ節転移診断と膵液中の変異 K-ras 遺伝子検出について紹介する．

2．MASA 法を用いた大腸癌のリンパ節転移診断：

遠隔転移のない大腸癌手術症例で，組織学的にリンパ節転移陰性（n_0）で5年以内に再発した症例45例と，n_0でかつ術後再発しなかった症例75例について，まず，原発巣における K-ras, p53遺伝子の変異を検索した．

大腸癌では，APC，K-ras，p53，NF2などの癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異が報告されている[3][4]．K-ras の点突然変異はコドン12，13，61に大腸癌の約40％に認められ，APC，p53の変異は約70〜80％に認められる．原発巣で癌細胞がこれらの遺伝子変異をもつ場合，転移巣における癌細胞も原発巣と同一変異をもつことが確認されている[5]ことから，今回は，スクリーニングが比較的容易な K-ras, p53の変異を癌細胞のマーカーとすることにした．

K-ras 遺伝子変異の検索には，コドン12，13，61について MASA 法を用い，p53遺伝子はエクソン5-8について SSCP および直接シークエンス法により変異を同定した．原発巣に変異の同定された症例について，リンパ節に原発巣と同じ病変をもつ細胞が存在するかどうか調べるため，それぞれの変異に相当するプライマーを設計し，リンパ節より抽出した DNA を鋳型とし，MASA 法を行い検索した．

原発巣に K-ras あるいは p53遺伝子の変異を認めた症例は，n_0再発例45例中27例，n_0非再発例75例中44例であり，これらの症例のリンパ節について検索を行った．**Table 1** に示すように，遺伝子診断でリンパ節転移陽性［gn（+）］とされた37例中27例は，術後5年以内に再発し，遺伝子診断でリンパ節転移陰性［gn（−）］とされた34例では術後5年経過しても全例において再発はみられなかった．また，再発例はすべて遺伝子診断でリンパ節転移陽性であった．

さらに，これらの症例を Dukes' stage に従い分類

Table 3 Detection of K-ras gene mutations in pancreatic juice

Patient	Diagnosis	Tumor size (mm)	Cytology	Mutant in pancreatic juice	Tumor mutation
1	Intraductal papillary adenocarcinoma	16×15	NA	TGT/AGT	TGT/AGT
2	Pancreatic adenocarcinoma	38×22	class Ⅳ	CGT	CGT
3	Pancreatic adenocarcinoma	35×17	class Ⅴ	GTT	GTT
4	Pancreatic adenocarcinoma	50×60	class Ⅰ	GTT	NA
5	Pancreatic adenocarcinoma	11×9	class Ⅰ	ND	GAT
6	Intraductal papillary tumor		class Ⅰ	ND	NA
7	Intraductal papillary tumor	29×17	class Ⅰ	ND	AGT
8	Serous cystadenoma	19×21	class Ⅰ	ND	NA
9	Pancreatic cyst (Pancreatitis)		class Ⅰ	ND	NA
10	Pancreatic cyst (Pancreatitis)		class Ⅰ	ND	NA

NA, not available ; ND, not detected

し，予後との関係について解析したものが**Table 2**である．Dukes'Aで，術後5年経過しても再発しなかった31例のうち10例は，遺伝子診断でリンパ節陽性と診断された．一方，Dukes'Bの症例では，遺伝子診断でリンパ節転移陽性と診断された19例すべて再発し，陰性と診断された13例は術後5年経過しても再発を認めていない．つまり，Dukes'Bの症例で，遺伝子診断によるリンパ節転移と予後により高い相関が認められた[6]．

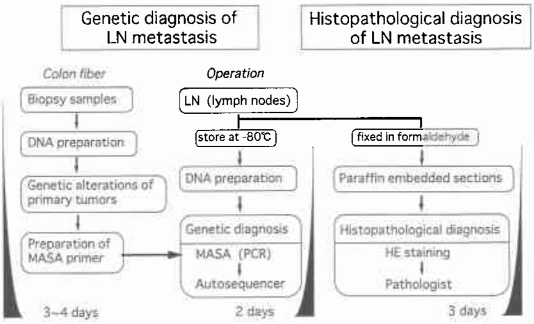
MASA法により，組織学的にとらえることのできなかった癌細胞の流れを，遺伝子レベルで，アイソトープを使用することなしに，鋭敏かつ迅速に検出することができた．従来の組織診断では，1切片でリンパ節転移の有無を診断するのに比べ，この方法はリンパ節1個に含まれる全細胞中に癌細胞あるいはDNA断片が存在するかどうかの診断が可能である．このような遺伝子レベルでのリンパ節転移と再発には高い相関が認められ，より正確な予後判定に応用可能と考えられた．遺伝子診断による陽性例が全て臨床的な意味で転移と考えてよいか否かについてはさらに今後の検討を要するものの，本診断法は，術後の効果的な補助療法の選択に応用可能であり，再発率の低下や不必要な化学療法の回避などの判定に役立つものと思われる．

3. 膵液中の変異K-ras遺伝子の検出：

intraductal papillary adenocarcinomaを含む膵癌5例，良性腫瘍性嚢胞3例，膵炎による炎症性嚢胞2例について，ERCP時に採取した膵液，あるいは手術中に採取した嚢胞液を用い，K-ras遺伝子コドン12の変異をMASA法により検索した．

Table 3に示したように，膵癌5例中4例(80%)に膵液中にK-ras遺伝子の変異を認め，そのうち1例は細胞診で陰性であったにもかかわらず，遺伝子レベルでは変異を検出することができた．一方，良性疾患の膵液中には変異を認めなかった．また，症例数は少ないものの，粘液産生膵腫瘍において，膵液中から変異K-ras遺伝子を検出し得た．

Fig. 3 Analysis of lymph node metastasis



膵液中の変異K-ras遺伝子を検出することは，膵癌診断に有用であるばかりでなく，膵粘液産生腫瘍において，膵液中から変異K-ras遺伝子を検出できたことから，膵嚢胞性疾患の鑑別，つまりmalignant potentialのある腫瘍の選択にも有用と考えられた．

今後の展望

従来の画像診断や病理診断にこの方法を併用することにより，個々の癌の広がりの診断や癌の早期診断がが可能となり，よりよい治療効果を得ることができるようになると考えられる．

本法を実際に臨床の検査室レベルに導入するに際しては，より大量のサンプルを迅速に処理するために，オートシークエンサーによる処理などの工夫も必要と考えられる．

大腸癌のリンパ節転移診断を例にして，このMASA

法を検査室に導入した場合の模式図を **Fig. 3** に示す．術前のCF，生検で原発巣の遺伝子変異があらかじめわかっていれば，術後早ければ2日で遺伝子レベルでのリンパ節転移の結果が判明することは，臨床的に有用と考える．この方法を臨床に応用することにより，癌の診断だけでなく，各症例における腫瘍の広がりを個別に評価し，それに応じた治療戦略をたてることが可能となるであろう．

文　献

1) Takeda S, Ichii S, Nakamura Y: Detection of K-ras mutation in sputum by mutant-alele-specific amplification (MASA). Hum Mutat **2**: 112—117, 1993
2) Hayashi N, Arakawa H, Nagase H et al: Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. Cancer Res **54**: 3853—3856, 1996
3) Bishop J: Molecular themes in oncogenesis. Cell **64**: 235—248, 1991
4) Weinberg RA: Tumor suppressor genes. Science **254**: 1138—1146, 1991
5) Losi L, Benhatter J, Costa J: Stability of K-ras mutations throughout the natural history of human colorectal cancer. Eur J Cancer **28**: 1115—1120, 1992
6) Hayashi N, Ito I, Yanagisaws A et al: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. Lancet **345**: 1257—1259, 1995

Detection of Genetic Alterations by MASA Method and its Clinical Application

Naoko Hayashi, Hiroshi Egami, Sadamu Takano and Michio Ogawa
Department of Surgery II, Kumamoto University Medical School
Shoji Nakamori and Shingi Imaoka
Department of Surgical Oncology, Center for Adult Diseases
Yusuke Namamura
Laboratory of Molecular Medicine, Institute of Medical Scinece, University of Tokyo

The mutant-allele-specific amplification (MASA) method is capable of detecting one tumor cell containing genetic changes in a sample containing 10,000 normal cells. We screened 120 colorectal cancers from patients who had no histologically detectable lymph-node metastasis at the time of operation for K-ras and p53 mutations, and examined corresponding regional lymph nodes at the genetic level by the MASA method. Somatic mutations were identified in 71 tumors; 27 of 37 patients with genetically positive lymph nodes had a tumor recurrence within 5 years of surgery; none of 34 patients without genetically confirmed lymph node metastasis had a recurrence. Thus, we found that tumor cells in lymph nodes identified by this genetic method had prognostic significance. We also analyzed DNA samples from pancreatic juice for the K-ras mutation, to diagnose pancreatic cancer in the early stage. K-ras mutations in pancreatic juice were detected in 4 of 5 (80%) with pancreatic cancer. Hence, clinical application of the MASA method may be useful for determining the prognosis of cancer patients and for detecting cancer in the early stage.

Reprint requests: Michio Ogawa　Department of Surgery II, Kumamoto University Medical School
1-1-1 Honjo, Kumamoto, 860 JAPAN