

甲状腺乳頭癌における染色体欠失領域および p53遺伝子欠失の検討

麻 沼 和 彦

信州大学医学部第2外科学教室

(主任: 飯田 太教授)

Allelotype Study and Investigation of p53 Gene Deletion in Papillary Thyroid Carcinoma

Kazuhiko ASANUMA

Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Futoshi IIDA)

Allelic losses of chromosomes and the mutations of tumor suppressor genes have been studied in many human cancers. In this study, loss of heterozygosity (LOH) was investigated in 44 papillary thyroid carcinomas using 15 polymorphic DNA markers. Moreover, DNA deletions in the p53 gene were examined in these 44 cases and in a further 50 cases of papillary thyroid carcinoma including 8 regional metastatic nodes using the polymerase chain reaction (PCR), with a newly developed technique.

The highest incidence of LOH studied with 15 polymorphic DNA markers was 23 % at the p53 gene locus. However, no LOH at the p53 gene was observed in the 54 informative cases including 8 metastatic lymph nodes in the consecutive PCR study.

In the tumorigenesis and progression of papillary thyroid carcinoma, multiple genetic alterations might not be necessary, and DNA structure might be relatively well preserved. This would be related to the clinical properties of this tumor characterized by slow growth and excellent prognosis. Moreover, LOH at the p53 gene may not be related to the development and nodal metastasis of papillary carcinoma. *Shinshu Med J* 42 : 371-378, 1994

(Received for publication May 20, 1994)

Key words: allelic loss of chromosome, p53 gene, papillary thyroid carcinoma, nodal metastasis
染色体欠失, p53遺伝子, 甲状腺乳頭癌, リンパ節転移

I 緒 言

癌の発生および進展に、細胞の増殖や分化を制御している癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異の関与が、近年の分子生物学的研究から明らかになりつつある¹⁾²⁾。癌遺伝子は活性化により、癌抑制遺伝子は不活性化に

より癌化に寄与しており、散発性の腫瘍の発生に、これらの遺伝子の複数種の変異が必要と考えられている。また、ある種の遺伝子は、癌の生物学的悪性度を規定していると考えられており、腫瘍における遺伝子変異の検索は、発癌の機序の解明に有用であるのみならず、癌の診断や治療に役立つ可能性を内包している。

甲状腺乳頭癌は、ヒト癌の中で予後良好な癌腫の1つである。しかし、浸潤・転移は高頻度に認められ、

別刷請求先: 麻沼 和彦
〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部第2外科

また、高度の局所浸潤、広範なリンパ節転移を伴う症例も認められる。現在まで、多彩な臨床像を示す乳頭癌の特性を的確に判定し得る指標は明らかにされていない³⁾⁻⁷⁾。

今回、甲状腺乳頭癌の発生や進展に関与する癌抑制遺伝子の同定を目的に、多種類の多型性DNAマーカーを用い、乳頭癌における染色体欠失領域の検索を行った。さらに、多種類の癌において高頻度の loss of heterozygosity (LOH) が報告されている p53 遺伝子⁸⁾⁻¹³⁾ について、polymerase chain reaction (PCR) を用いて、多型性DNAマーカーの検索で同定不可能な小範囲の欠失の検索を行った。

II 材料と方法

A 多型性DNAマーカーによるLOHの検討

1 材料

44例の甲状腺乳頭癌症例から手術時採取した癌部および筋組織を実験に用いた。

2 方法

摘出した乳頭癌組織と筋組織を液体窒素の中で急速凍結し、 -70°C で保存した。一辺5mm~10mmの組織を液体窒素存在下に、乳鉢中で粉末状にし、15mlの容器中で、lysis buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.4), 50mM NaCl, 50mM EDTA (pH 8.5), 27% (W/V) ショ糖) を加え攪拌後、10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.4ml, proteinase K (10mg/ml) 0.35ml を添加し、 65°C で3時間反応させた。

フェノール・クロロホルム抽出を2~3回繰り返した後、イソプロピルアルコールにてDNAを沈澱させ回収し、70%エタノールで洗浄後、TE液 (10mM Tris-HCl (pH 8.5), 1mM EDTA (pH 8.5)) で溶解した。この溶液2 μl を用い、吸光度を測定しDNA濃度を算定した後、各検体のDNA濃度を0.5mg/mlとするようにTE液で希釈し、 4°C で保存した。

抽出したDNA約5 μg を、4種類の制限酵素 (*Msp* I, *Taq* I, *Bam*H I, *Hae* III) それぞれ50単位を用いて完全に消化し、反応停止液を加えた後、0.8%のアガロースゲルで電気泳動した。エチジウムブロマイド溶液 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でDNAを染色後、ポラロイドカメラで撮影し、DNAの完全切断およびDNA量の均一性を確認した。次に、ゲルをトランスファー溶液 (0.1M NaCl, 0.1N NaOH) 中で15分間振とうし、DNAを変性させた。ついで、トランスファー溶液を浸潤させたスポンジ上で、ゲルからナイロ

ンフィルター Biotodyne A (Pall BioSupport, USA) へ、一晩かけDNAをトランスファーした。このナイロンフィルターを、2倍濃度の standard saline Citrate (SSC) (0.15M NaCl, 0.015M クエン酸ナトリウム) で中和後、UV Stratagene 1800 (Stratagene Cloning Systems, USA) を用い、フィルターにDNAをクロスリンクさせた¹⁴⁾¹⁵⁾。

フィルターを、熱変性させたヒト胎盤DNAを含むハイブリダイゼーション液 (7% polyethylene glycol 8000, 10% SDS) に浸し、 65°C で一晩静置し、プレハイブリダイゼーションを行った。次に、目的の放射性プローブDNAを含むハイブリダイゼーション液にフィルターを移し 65°C で一晩ゆるやかに振とうし、ハイブリダイゼーションを行った。プローブはランダムプライム法により、DNAを [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP でラベルして作成した¹⁶⁾。

フィルターをまず2倍濃度のSSCで10分間室温で洗浄し、次いで0.1倍濃度のSSCと0.1%のSDSを混合した洗浄液で 65°C 15分間洗浄した。フィルターに非特異的なハイブリッドが残存している場合は、 65°C 15分間の洗浄を追加した。フィルターの水分を濾紙上で除去後ラッピングし、増感紙と共に Kodak XAR フィルム (Kodak Co., USA) に固定し、 -70°C でオートラジオグラフィーを行った。

B PCR法を用いたp53遺伝子の欠失についての検討

1 材料

多型性DNAマーカーによるLOHの検討に用いた甲状腺乳頭癌44症例および、その後の手術によって得られた甲状腺乳頭癌50症例、計94症例の癌部および筋組織と、8例の転移リンパ節組織を用いた。なお、原発癌および筋組織は凍結保存した組織を用い、リンパ節転移組織はホルマリン固定組織を用いた。

2 方法

a DNAの抽出

多型性DNAマーカーによるLOHの検討に用いた甲状腺乳頭癌44例については、前述のDNAを用いた。その他の甲状腺乳頭癌50例については、組織摘出後 Tissue Tek II (Miles Inc., USA) にコンパウンド (Miles Inc., USA) で包埋し、液体窒素で急速凍結し、 -70°C にて保存した。クリオスタットを用い、癌組織および筋組織の薄切切片を作製した。1切片の厚さは10 μm で、癌組織は1検体当たり5~10切片、正常組織は1検体当たり2切片を切り出した。各切片を

甲状腺乳頭癌における遺伝子欠失

表1 PCR-LOH 検討に用いたプライマー

Priming region	Primer sequences
p53 exon 4	5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3'
	5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3'
p53 intron 6	5'-AGGTCTGGTTTGCAACTGGG-3'
	5'-GAGGTCAAATAAGCAGCAGG-3'

表2 甲状腺乳頭癌における染色体欠失 (LOH)

Chromosome location	Probe name	Locus symbol	Enzyme	Allelic loss / informative cases (%)
1p	*CMM12	D1S76	BamH I	0/13
1q	HHH105	D1S67	Msp I	0/9
3p	*cC13-515	D3S685	Msp I	0/19
4p	*YNZ32	D4S125	HaeIII	0/7
5q	LS 5. 3-4	—	Msp I	0/12
7q	*JCZ67	D7S396	Taq I	1/21 (5)
10q	*EFD75	D10S25	HaeIII	0/16
11p	*Insulin	INS	HaeIII	0/15
11q	SS6	Int2	Taq I	3/15 (20)
13q	*MCOC46	D13S54	HaeIII	1/21 (5)
14q	*CMM101	D14S3	HaeIII	0/32
17p	*YNZ22	D17S30	Taq I	1/28 (4)
	BHP53	p53	BamH I	3/13 (23)
17q	*CMM86	D17S74	Taq I	0/23
19p	*JCZ3. 1	D19S20	HaeIII	0/6

* VNTR marker

表3 PCR 法による甲状腺乳頭癌の p53 遺伝子欠失 (LOH)

	Exon 4		Intron 6		Total	
	LOH	Inf.	LOH	Inf.	LOH	Inf.
甲状腺乳頭癌 (n=44)	0	25	0	5	0	27*
甲状腺乳頭癌 (n=50)	0	24	0	5	0	27**
転移リンパ節 (n=8)	0	8	0	0	0	8

Inf=informative cases

* 重複例 3 例

** 重複例 2 例

ヘマトキシリンで30秒間染色後、滅菌蒸留水で30秒間洗浄した。癌組織は顕微鏡下100倍の倍率で、鋭利なピンセット2本を用いて間質部分をできる限り避け、癌細胞の密度が最も高い部分を、1切片当たり1~2個、合計10~15個取り出した。筋組織は顕微鏡下40倍

の倍率で、他の組織成分の混入を避けて、筋組織のみを取り出した。ピンセットはその都度洗浄後ガスバーナーで焼灼した。以上の方法にて取り出した組織片を2mlのエッペンドルフチューブ (Eppendorf-Netheler-Hinz, Germany) に入れ、前述の lysis buffer

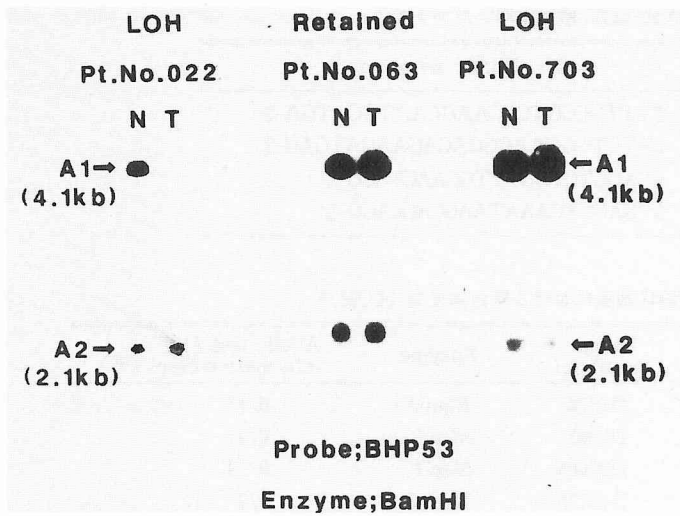


図1 BHP53をプローブとしたオートラジオグラム

Nは筋組織, Tは乳頭癌組織である。Pt. No.022で lane T にアレル A1 の消失を認め, loss of heterozygosity (LOH) と判定される。Pt. No.703で lane T にアレル A2 のシグナルの減弱を認め, LOH と判定される。Pt.No.063には LOH を認めない。

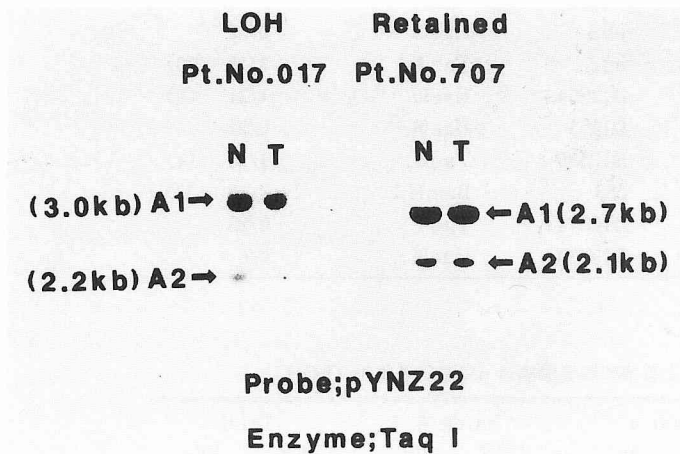


図2 pYNZ22をプローブとしたオートラジオグラム

Nは筋組織, Tは乳頭癌組織である。Pt. No.017で lane T にアレル A2 の消失を認め, loss of heterozygosity (LOH) と判定されるが, Pt.No.707に LOH を認めない。

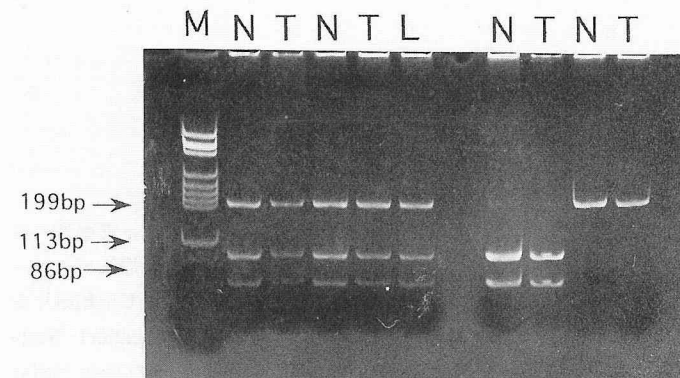


図3 p53 exon 4のPCR産物を制限酵素 *Acc* II で処理した後の電気泳動像

Mはサイズマーカーを, Nは筋組織を, Tは乳頭癌組織を, Lはリンパ節転移癌巣を示す。Informative caseは左端の症例(N, T)およびその右の症例(N, T, L)の2例であるが, この2例に loss of heterozygosity (LOH) を認めない。

500 μ l と、proteinase K 100 μ g を加え、50°Cで12時間反応させた。500 μ l のフェノールを加えて1時間混和したのち、12,000rpmで10分間遠沈し、上清を新しい2mlのエピンドルフチューブに入れ、ここに500 μ l のフェノールを加え30分間混和後、12,000rpmで10分間遠沈した。この上清を微量濃縮器 Centricon-30 (W.R. Grace and Co., USA) に移し、TE液を1ml添加し、3,000rpmで20分間遠沈した。この操作を、全量が30 μ l 程度になるまで繰り返し、これをエピンドルフチューブに入れ4°Cで保存した。

リンパ節の転移癌巣については、ホルマリン固定後のパラフィン包埋組織から、厚さ5 μ mの切片を10個切り出した。キシレンに12時間浸した後、ヘマトキシリン染色し、顕微鏡下40倍の倍率で、凍結切片の場合と同様に癌組織を取り出し、エピンドルフチューブに入れた。1.0mlのキシレンで2度脱パラフィンを行い、100%エタノールで洗浄した。そこに50mM Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA (pH 8.5), 0.1M NaCl, 1% SDS を含んだ溶液500 μ l および、0.1%のproteinase Kを10 μ l 添加し、50°Cで24時間反応させた。それ以降のフェノール抽出およびDNAの濃縮は、凍結切片の場合と同様の方法で行った。

b PCR 反応

反応液は、buffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH8.4), MgCl₂ 15mM, 0.01% (W/V) gelatin) 5 μ l, dNTP (ATP, CTP, TTP, GTP, 各200 μ M) 4 μ l, 後述の primer 各2 μ l (50pmol), Taq polymerase 0.5 μ l (2.5Units), とDNA溶液および滅菌蒸留水を加え50 μ l とした。DNA溶液については、多型性DNAマーカーの実験に用いたDNA溶液を20ng/ μ l に調節したもの2 μ l を、最近の50例で顕微鏡下で取り出したDNA溶液は10 μ l (約40ng) を用い、滅菌蒸留水で50 μ l とした。

DNA増幅反応(PCR)には、MiniCycler™ (MJ Research Inc., USA) を用い、以下の条件で行った。94°C120秒間熱処理後、94°C30秒間のdenature, 58°C30秒間のannealing, 72°C45秒間のextensionを30サイクル行い、その後72°C180秒間静置した。PCR産物は、-30°Cにて保存した。

PCRに用いたプライマーについては、p53 exon 4 は、Araら¹⁷⁾の報告、p53 intron 6 は、McDanielら¹⁸⁾の報告に基づき作成した(表1)。

制限酵素処理は以下の方法で行った。p53 exon 4 については、エピンドルフチューブに、増幅DNA

液10 μ l, 制限酵素 Acc II (宝酒造株式会社, 東京) を0.5Units, 滅菌蒸留水17 μ l, 制限酵素に添付のBuffer3.0 μ l を加え37°Cで8時間反応させた後、制限酵素 Acc II を0.3Units, 滅菌蒸留水9 μ l, 制限酵素に添付のbufferを1.0 μ l を加え37°Cで3時間反応させた。p53 intron 6 については、制限酵素として Msp I を用いる以外は、p53 exon 4 の場合と同様の方法で行った。

電気泳動については、制限酵素で処理したPCR産物に反応停止液を加えた後、15%のアクリルアミドゲルを用い、リアルスラブ泳動装置・Model BE220 (Bio Craft Co., 東京) で泳動した。サイズマーカーとして、Hae III 切断したPBR322DNA (Boehringer Mannheim, Germany) を用いた。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線で発光させバンドを検出した。正常組織と癌組織とのバンドの比較からLOHの有無を判定した。

III 結 果

A 多型性DNAマーカーによるLOHの検討

甲状腺乳頭癌44例の結果は表2のごとくであり、LOHは、17pのp53遺伝子に23%、11qのInt 2部位に20%、7qのD7S396部位に5%、13qのD13S54部位に5%、17pのD17S30部位に4%認められた。他に、LOHは認められなかった。図1は、BPH53をプローブとした時のオートラジオグラムを示す。Pt. 022およびPt. 703にLOHを認める。図2はpYNZ22をプローブとした時のオートラジオグラムを示す。Pt. 017にLOHを認める。

B PCR法を用いたp53遺伝子の欠失についての検討

多型性DNAマーカーによる検討を行った乳頭癌44症例についての実験結果は表3に示すごとくである。Exon 4におけるheterozygoteは25例で、全例LOHを認めなかった。Intron 6におけるheterozygoteは5例であり全例LOHを認めなかった。Heterozygoteの重複症例は3例であるため、p53遺伝子のLOHは、0/27であった。

最近の手術症例で、顕微鏡下で取り出した50例の乳頭癌症例のDNAを用いた実験結果は、exon 4におけるheterozygoteは24例で、全例LOHを認めなかった。Intron 6におけるheterozygoteは5例であり全例LOHを認めなかった。Heterozygoteの重複症例は2例であるため、p53遺伝子のLOHは、0/27で

あった。

リンパ節の転移巣のDNAの実験結果は、exon 4におけるheterozygote 8例全例において、LOHは認められなかった。

図3に4例の電気泳動像を示す。Informative case (heterozygote) の2例には、癌の主病巣およびリンパ節転移巣ともにLOHを認めない。

IV 考 察

癌抑制遺伝子の不活性化の機序として、Knudson¹⁹⁾が提唱したTwo hit theoryが一般に認められている。すなわち、対立遺伝子の両方に変異が生じた場合に、正常遺伝子産物が皆無となり、癌化に寄与するというものである。遺伝子変異は、1塩基の置換から遺伝子を含む染色体領域の欠失あるいは再構成など多様であるが、対立遺伝子の少なくとも一方の欠失が、癌抑制遺伝子不活性化の主要な現象と考えられている。実際に、多型性DNAマーカーを用いた多種類の癌における分析から、高頻度に欠失している染色体領域が同定されている。染色体欠失が、癌化の二次的変化によっても生ずるため、30%以上の欠失頻度を認める部位に、癌抑制遺伝子の存在が推察される。今回、甲状腺乳頭癌について、15種類の多型性DNAマーカーを用い検索を行ったが、欠失頻度はいずれの染色体部位においてもきわめて低く、乳頭癌の発生および進展に関与する癌抑制遺伝子の存在部位は明らかにされなかった。この理由として、今回の検索部位以外に甲状腺乳頭癌の癌抑制遺伝子が存在する、あるいは、乳頭癌組織への正常組織の混入のためLOHが検出され得ない、あるいは、乳頭癌における癌抑制遺伝子の不活性化の多くは多型性DNAマーカーによる検討でとらえられない狭い範囲の変化であるという3通りの可能性が考えられた。後2者の検討のため、多型性DNAマーカーの検討で最も高頻度にLOHが認められたp53遺伝子について、顕微鏡下で非癌組織を可能な限り除去し、PCR法を用いてLOHの検索を行った。しかし、多型性DNAマーカーの検討を行った44症例および、最近の50症例計94症例のうち、heterozygote54例の全例にLOHは認められなかった。この検討結果から、甲状腺乳頭癌において染色体欠失が低頻度である理由は、正常組織の混入によるものではないことが明らかとなった。さらに、甲状腺乳頭癌の癌抑制遺伝子の不活性化には、染色体欠失という広範囲の変異はまれである可能性が推測された。

多型性DNAマーカーによるLOHの検討とPCR法によるLOHの検討結果が異なった理由として、切除癌組織の阻血の影響、あるいは、p53遺伝子の狭い領域のLOHの存在が考えられる。手術時の組織採取手技の都合上、筋組織は虚血に陥る以前に摘出し凍結するが、癌組織は血管処理後でなければ摘出不可能なため、癌組織にのみ温阻血が発生する。このため、癌組織の高分子DNAが分解され、一方のアレル(長いDNA断片)のシグナルの減弱、すなわち、LOHとしてとらえられた可能性が考えられる。また、p53遺伝子のLOHが、exon 4以外の部位に存在する場合には、多型性DNAマーカーの検討でLOHは認められるが、PCR法でLOHは認められない。この際、p53遺伝子の方に欠失が存在する場合と、隣接する遺伝子の欠失がp53遺伝子にまで及んでいる場合とが考えられる。これまでの甲状腺癌におけるp53遺伝子変異の検討は、本研究を含めて、exon 4~9、およびintron 6、7での検討が主であり、exon 4の5'側およびexon 9の3'側についての検討はほとんどなされていない。したがって、これらの部位に欠失が存在する可能性は否定できない。

p53遺伝子は、これまで知られている癌抑制遺伝子の中で、最も高頻度に変異が見いだされている癌抑制遺伝子である^{9)~13)}。p53遺伝子の不活性化には、一方のアレルの変異で十分であり、LOHは必ずしも必要ではない¹⁰⁾が、現在までに報告されているp53遺伝子の変異は、一方のアレルの欠失と残存アレルの点突然変異が大部分¹¹⁾である。甲状腺癌組織のp53遺伝子の変異について、これまでいくつかの報告がみられる^{4)~7)}が、未分化癌と共存しない乳頭癌組織にLOHを認めた報告例は認められない。今回、多型性DNAマーカーによる検討で3例にLOHが認められたが、PCR法による検討では、3例ともheterozygoteでなく、LOHの有無について判断は不可能であった。一方、最近の乳頭癌50症例においても、PCR法による検討でp53遺伝子のLOHは認められず、リンパ節の転移癌巣のp53遺伝子についても、検討症例8例全例にLOHは認められなかった。このことより、甲状腺乳頭癌の発生および進展には、リンパ節転移を含め、p53遺伝子の関与は薄いと推測された。

本研究では、腫瘍組織に含まれる正常組織を極力排除する目的で、顕微鏡下に癌細胞のみを取り出す方法を考案し、その微量組織からDNAの抽出およびPCR法によるDNAの増幅に成功した。パラフィン

ブロックからDNAを取り出す際、隣接する連続切片のHE染色を参考にして目的とする腫瘍組織を取り出すことは、これまで行われている^{11,12)}が、この方法ではある程度の正常組織の混入は避けられない。PCRサイクルが、25回以下の場合には、5%以下の混入は、問題にならないとの報告²⁰⁾はあるが、結合組織に富む甲状腺乳頭癌では、正常組織の混入が、限度以内という保障はない。また、今回検討した微小なリンパ節転移癌巣についてのLOHの検討は、本方法によらなければ不可能であり、本方法は微小な病変に関する遺伝子変異の研究に非常に有用であると考えられた。

本研究により、甲状腺乳頭癌では、多くの悪性腫瘍で変異が認められているp53遺伝子に、広範囲の欠失は認められないことが明らかとなった。また、本研究の検索部位におけるLOHの頻度はきわめて低値であったことより、甲状腺乳頭癌における癌抑制遺伝子の不活性化の機序として、遺伝子欠失はまれである可能性が示唆された。一方、他癌に比しDNA配列の欠落がきわめて少ないことが、生物学的悪性度が低く、予後が良好な甲状腺乳頭癌の臨床像を規定している一因子である可能性が示唆された。

V 結 語

甲状腺乳頭癌の発生および進展に関与する遺伝子を見いだすため、15種類の多型性DNAマーカーを用いて染色体欠失領域の検索を行った。この検討で最も高頻度にLOHを認めたp53遺伝子について、新しく考

案した方法でDNAを抽出し、PCR法によってLOHの検討を追加した。その結論は、以下のごとくである。

- 1 多型性DNAマーカーによる検討でp53遺伝子にLOHが最も高頻度に認められたが、その頻度は23%であり、他癌と比し著しく低頻度であった。
- 2 非癌組織の混入を避けるため、顕微鏡下に癌組織を取り出しPCR法により検討を加えたが、p53遺伝子のLOHは、0/54であり、リンパ節の転移癌巣のp53遺伝子のLOHは、0/8であった。
- 3 以上の成績から、甲状腺乳頭癌における癌抑制遺伝子の不活化は、染色体欠失によることはまれであると考えられた。また、甲状腺乳頭癌にp53遺伝子変異が関与している可能性は少ないと考えられた。
- 4 本研究で用いた、顕微鏡下で癌組織を取り出しDNAを得る手法は、微小病変についてのDNA変異の検討にきわめて有用であると考えられた。

本論文の要旨は、65回日本内分泌学会学術総会(1992年5月29日、徳島)、第93回日本外科学会総会(1993年4月22日、仙台)、35th, World congress of international society of surgery (1993, 8, 27, Hong Kong)にて発表した。

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に適切な御教授、御協力を頂きました、太田正穂法医学教室講師、福島弘文法医学教室教授、および全てのDNAプローブを提供して下さいました中村祐輔癌研究会癌研究所生化学部部長に感謝致します。

文 献

- 1) Sager R: Tumor suppressor genes: The puzzle and the promise. *Science* 246: 1406-1412, 1981
- 2) Thomas DW: Oncogenes and anti-oncogenes; the molecular basis of tumor behaviour. *J Pathol* 165: 187-201, 1991
- 3) 伊藤公一: ヒト甲状腺乳頭癌の分子生物学的解析. *東女医大学誌* 62: 71-80, 1992
- 4) Herrmann MA, Hay ID, Bartelt DH Jr, Ritland SR, Dahl RJ, Grant CS, Jenkins RB: Cytogenetic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. *J Clin Invest* 88: 1596-1604, 1991
- 5) Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, Dohi K, Nakamura N, Akiyama M: Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 52: 1369-1371, 1992
- 6) Nakamura T, Yana I, Kobayashi T, Shin E, Karakawa K, Fujita S, Miya A, Mori T, Nishisho I, Takai S: p53 gene mutations associated with anaplastic transformation of human thyroid carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 83: 1293-1298, 1992
- 7) Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi Y, Dohi K, Nakamura N, Akiyama M: Genetic alterations in thyroid tumor progression: association with p53 gene mutations. *Jpn J Cancer Res* 84: 526-531, 1993

- 8) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC : p53 mutations in human cancers. *Science* 253 : 49-53, 1991
- 9) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, VanTuinen P, Ledbetter DH, Baker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B : Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244 : 217-221, 1989
- 10) Levine AJ, Momand J, Finlay CA : The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351 : 453-456, 1991
- 11) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B : Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342 : 705-708, 1989
- 12) Oka K, Ishikawa J, Bruner JM, Takahashi R, Saya H : Detection of loss of heterozygosity in the p53 gene in renal cell carcinoma and bladder cancer using the polymerase chain reaction. *Mol Carcinog* 4 : 10-13, 1991
- 13) Huang Y, Boynton RF, Blount PL, Silverstein RJ, Yin J, Tong Y, McDaniel TK, Newkirk C, Resau JH, Sridhara R, Reid BJ, Meltzer SJ : Loss of heterozygosity involves multiple tumor suppressor genes in human esophageal cancers. *Cancer Res* 52 : 6525-6530, 1992
- 14) Sato T, Tanigami A, Yamakawa F, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y : Allelotype of breast cancer : cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Res* 50 : 7184-7189, 1990
- 15) Southern EM : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 : 503-517, 1975
- 16) Feinberg AP, Vogelstein B : Technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132 : 6-13, 1983
- 17) Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H : Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* 18 : 4916, 1990
- 18) McDaniel T, Carbone D, Takahashi T, Chumakov P, Chang EH, Pirolo KF, Yin J, Huang Y, Meltzer SJ : A polymorphism in intron 6 of p53 detected by digesting PCR products with Msp I. *Nucleic Acids Res* 19 : 4796, 1991
- 19) Knudson AG : Mutation and cancer : statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68 : 820-823, 1971
- 20) Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16 : 11141-11156, 1988

(6. 5. 20 受稿)