

甲状腺乳頭癌および未分化癌の 癌抑制遺伝子に関する検討

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)

Study of Tumor Suppressor Genes in Papillary and Anaplastic Thyroid Carcinomas

Kazuhiko ASANUMA

Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Futoshi IIDA)

Mutations of tumor suppressor genes have been identified in various human cancers. Although a few studies concerning p53 gene abnormalities have been reported, little is known about the mutations of other tumor suppressor genes in thyroid carcinoma. In this study, loss of heterozygosity (LOH) of tumor suppressor genes such as p53, RB, APC, and DCC was investigated using 35 papillary thyroid carcinomas, 7 anaplastic carcinomas, and one recurrent tumor composed of papillary and anaplastic carcinomas.

No LOH of p53, RB, APC and DCC genes was observed in papillary thyroid carcinomas. In anaplastic thyroid carcinomas, LOHs were detected in 2 out of 5 cases for the p53 gene locus, but not in other tumor suppressor genes. Moreover, LOH of the p53 gene was identified in anaplastic carcinoma co-existing in recurrent papillary carcinoma. From these results, it was inferred that multiple genetic alterations of tumor suppressor genes is not required for the development of papillary thyroid carcinoma. Mutation of the p53 gene may be associated with anaplastic transformation of papillary carcinoma but may not be essential for genetic alteration of anaplastic carcinoma. *Shinshu Med J* 42: 389-396, 1994

(Received for publication May 20, 1994)

Key words: tumor suppressor genes, papillary thyroid carcinoma, anaplastic thyroid carcinoma
癌抑制遺伝子, 甲状腺乳頭癌, 甲状腺未分化癌

I 緒 言

癌は、複数の遺伝子変異の集積により多段階的に発生、進展していくと考えられている¹⁾。現在まで、retinoblastoma (RB), p53, deleted in colorectal carcinoma (DCC), adenomatous polyposis coli (APC), mutated in colorectal cancer (MCC) など

の癌抑制遺伝子が単離されている。これらの癌抑制遺伝子の変異は、多種類の癌において認められており²⁾⁻¹⁶⁾、遺伝性腫瘍のみならず、非遺伝性腫瘍の発生および進展にも重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、甲状腺癌については、C-myc, H-ras, N-ras, K-ras, ret, trk などの癌遺伝子の変異について報告されている¹⁷⁾⁻²¹⁾が、癌抑制遺伝子の変異に関しては、p53 遺伝子の報告²⁾⁻⁵⁾がみられるに過ぎない。

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

表1 PCR-LOH の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'
RB intron 20	5'-CTCCTCCCTACTTACTTGT-3'
	5'-AATTAACAAGGTGTGGTGG-3'
APC exon 11	5'-GGACTACAGGCCATTGCAGAA-3'
	5'-GGCTACAGGCCATTGCAGAA-3'
DCC	5'-TGCACCATGCTGAAGATTGT-3'
	5'-AGTACAACACAAGGTATGTG-3'

前回、甲状腺乳頭癌を対象に、多型性 DNA マーカーを用いた loss of heterozygosity (LOH) の検討、および、polymerase chain reaction (PCR) を用いた p53 遺伝子における LOH の検討を行った。その結果、甲状腺乳頭癌では染色体欠失に伴う癌抑制遺伝子の不活性化はまれであること、乳頭癌の発生および進展に p53 遺伝子変異の関与は薄いことが推察された²²⁾。今回、甲状腺乳頭癌および未分化癌の発生および進展に関与する癌抑制遺伝子の検索を目的として、p53, RB, APC, DCC 遺伝子を対象に PCR-LOH 解析を行った。

II 材料と方法

A 材料

手術によって得られた甲状腺乳頭癌35例、未分化癌7例、および患者の死亡後得られた乳頭癌の局所再発1例の癌組織および筋組織を実験に用いた。乳頭癌35例は、前報²²⁾の材料と異なる男性4例、女性31例であり、未分化癌例は全例女性であった。局所再発例は女性で、局所再発巣の甲状腺乳頭癌組織に微小な未分化癌巣が認められた。

B 方法

1 DNA の抽出

甲状腺乳頭癌35例および未分化癌7例については、前報と同様の方法²²⁾により DNA の抽出を行った。

局所再発例については、患者の死亡後、再発組織の一部を摘出しホルマリン固定した。それを凍結組織として、以下の方法で切り出した。すなわち、クリオスタットで1組織ブロックから20切片を切り出し、別に作成したヘマトキシリン・エオジン染色標本の所見を参考にして、各切片から乳頭癌組織と未分化癌組織を顕微鏡下で分離した。

2 PCR 反応による LOH の検討

前報の方法²²⁾により行った。なお、Primer は、p53 exon 4 は Ara ら²³⁾の報告、p53 intron 6 は McDaniel ら²⁴⁾の報告、RB は Yandell と Dryja²⁵⁾の報告、APC は Boynton ら²⁶⁾の報告、DCC は Huang ら¹¹⁾の報告をもとに作成した(表1)。

PCR には、MiniCycler™ (MJ Research Inc.

表2 甲状腺乳頭癌35例における癌抑制遺伝子と loss of heterozygosity (LOH)

	Informative cases	Number of LOH
p53	exon 4	17
	intron 6	3
	total	19 *
RB	intron 20	18
APC	exon 11	17
DCC		12

* 1例は exon 4 および intron 6 両者において informative であった。

表3 甲状腺未分化癌7例における癌抑制遺伝子と loss of heterozygosity (LOH)

	Informative cases	Number of LOH
p53	exon 4	5
	intron 6	0
	total	5
RB	intron 20	4
APC	exon 11	4
DCC		3

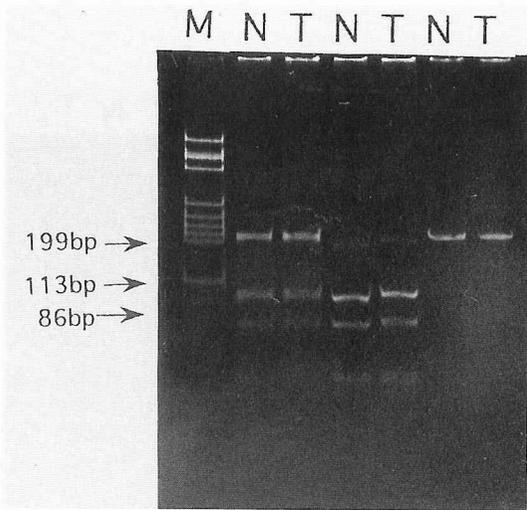


図1 甲状腺乳頭癌の p33 exon 4 の *Bst*UI 処理後の電気泳動像

Lane M はサイズマーカー, lane N は筋組織, lane T は乳頭癌組織を示す。左から, 隣接する N と T が同一症例である。左端が informative case であるが, LOH を認めない。他の 2 症例は, informative case ではない。

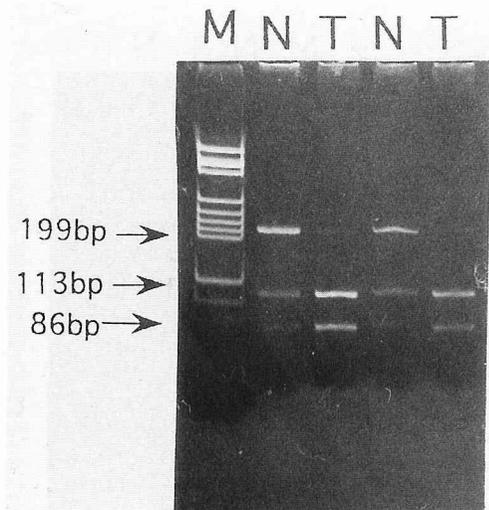


図2 甲状腺未分化癌の p33 exon4 の *Bst*UI 処理後の電気泳動像

Lane M はサイズマーカー, lane N は筋組織, lane T は未分化癌組織を示す。左から, 隣接する N と T が同一症例である。2 例とも, 未分化癌組織では 199bp のバンドが薄く, 113bp と 86bp のバンドが強く描出された。

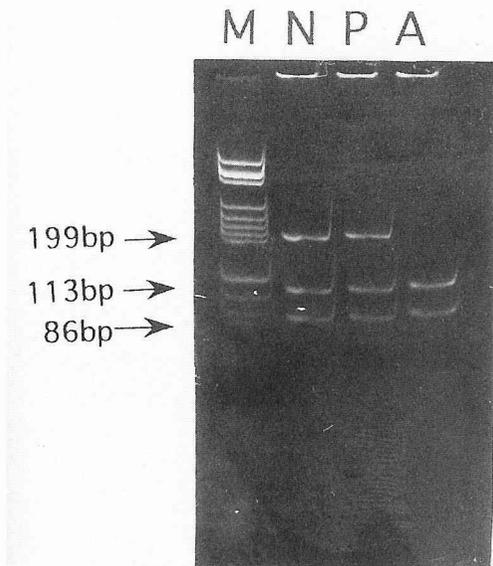


図3 甲状腺乳頭癌の局所再発症例の *Bst*UI 処理後の電気泳動像

Lane M はサイズマーカー, lane N は筋組織, lane P は乳頭癌組織, lane A は未分化癌組織を示す。乳頭癌組織に LOH を認めないが, 未分化癌組織に LOH が認められる。

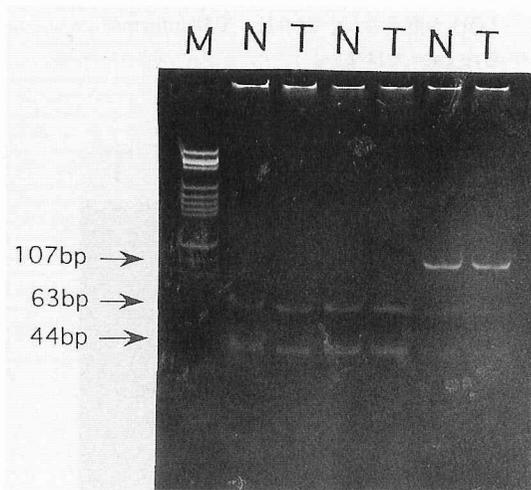


図4 甲状腺乳頭癌の p33 intron 6 の *Msp*I 処理後の電気泳動像

Lane M はサイズマーカー, lane N は筋組織, lane T は乳頭癌組織を示す。左から, 隣接する N と T が同一症例である。右端が informative case であるが, LOH を認めない。他の 2 例は, informative case でない。

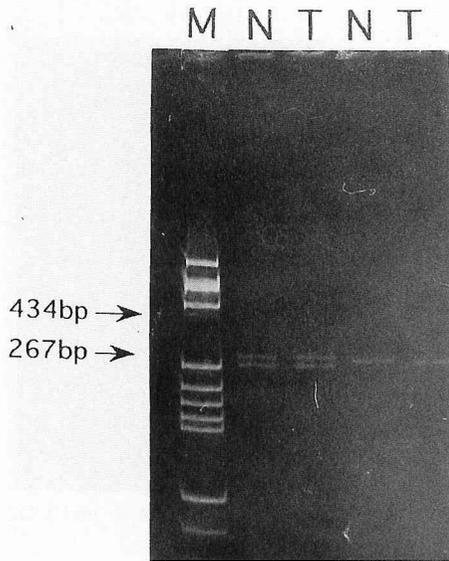


図5 甲状腺乳頭癌のRB intron 20の電気泳動像

Lane Mはサイズマーカー, lane Nは筋組織, lane Tは乳頭癌組織を示す。左から, 隣接するNとTが同一症例である。左のN, Tはinformative caseであるが, LOHを認めない。右のN, Tはinformative caseではない。

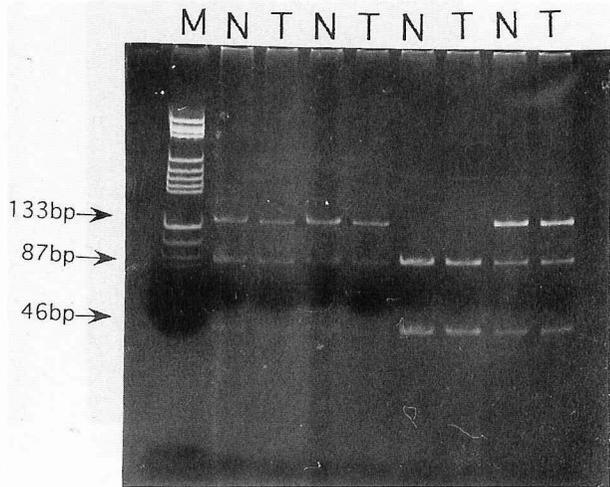


図6 甲状腺乳頭癌のAPC exon 11のRsaI処理後の電気泳動像

Lane Mはサイズマーカー, lane Nは筋組織, lane Tは乳頭癌組織を示す。左から, 隣接するNとTが同一症例である。左の2症例および右の1症例がinformative caseであるが, LOHを認めない。

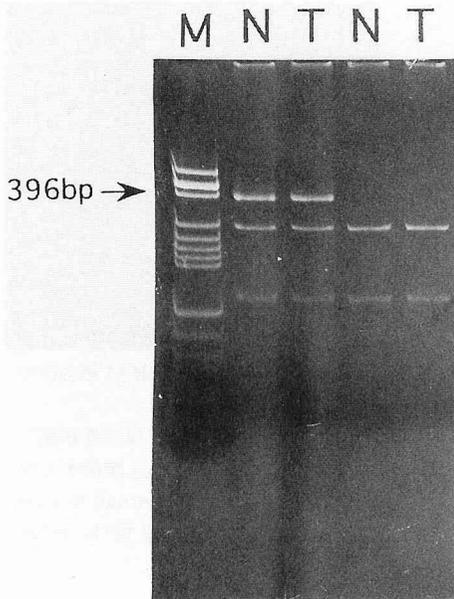


図7 甲状腺乳頭癌のDCCのMspI処理後の電気泳動像

Lane Mはサイズマーカー, lane Nは筋組織, lane Tは乳頭癌組織を示す。左から, 隣接するNとTが同一症例である。左のN, Tがinformative caseであるが, LOHを認めない。右のN, Tはinformative caseではない。

USA) を用い以下の条件で行った。

p53 exon 4 については、94°C・120秒間熱処理後、94°C・25秒間の denature、58°C・25秒間の annealing、72°C・30秒間の extension を30サイクル行い、その後72°Cで180秒間静置した。PCR 終了後は-4°Cにて保存した。

p53 intron 6 については、p53 exon 4 と同一条件で行った。

RB intron 20については、annealing の温度を54°Cとした以外は、p53 exon 4 と同一条件で行った。

APC exon 11 については、p53 exon 4 と同一条件で行った。

DCC については、annealing の温度を54°Cとした以外は、p53 exon 4 と同一条件で行った。

制限酵素処理は以下の方法で行った。

p53 exon 4 については、エッペンドルフチューブに、増幅 DNA 液20 μ l、制限酵素 *Bst*UI (Sigma Chemical Co. USA) 0.5unit、滅菌蒸留水23.2 μ l、制限酵素に添付の Buffer4.8 μ l を加え37°Cで8時間反応させた後、*Bst*UI を0.2unit、滅菌蒸留水20 μ l、Buffer を2.2 μ l を加え37°Cで3時間反応させた。

p53 intron 6 については、エッペンドルフチューブに、増幅 DNA 液10.0 μ l、制限酵素 *Msp*I (宝酒造株式会社、東京) 0.5unit、滅菌蒸留水17.0 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、*Msp*I を0.3unit、滅菌蒸留水9.0 μ l、Buffer1.0 μ l を加え37°Cで3時間反応させた。

APC exon 11 については、制限酵素として *Rsa*I (和光純薬株式会社、東京) を1回目は1.0unit、2回目は0.3unit を用いた以外は p53 exon 4 と同様に行った。

DCC については、p53 intron 6 と同様に行った。

電気泳動については、RB intron 20の PCR 産物および、制限酵素処理した p53 exon 4、p53 intron 6、APC exon 11、DCC の PCR 産物を用い、前報の方法²²⁾により行った。

III 結 果

甲状腺乳頭癌35例の癌抑制遺伝子の LOH の有無は、表2に示すごとくである。おのおの癌抑制遺伝子の検討部位での LOH の頻度 (LOH/informative cases) は、p53遺伝子が0/19、RB 遺伝子が0/18、APC 遺伝子が0/17、DCC 遺伝子が0/12であった。また、甲状腺未分化癌例の癌抑制遺伝子の LOH の頻

度は表3に示すごとく、p53遺伝子が2/5、RB 遺伝子が0/4、APC 遺伝子が0/4、DCC 遺伝子が0/3であった。局所再発巣では、p53遺伝子の LOH は乳頭癌組織では認められなかったが、未分化癌組織においては認められた。

図1は、甲状腺乳頭癌組織から得られた DNA の、図2は甲状腺未分化癌組織から得られた DNA の p53 exon 4 の *Bst*UI 処理後の電気泳動像である。乳頭癌には LOH は認められなかったが、未分化癌2例に LOH が認められた。

図3は、局所再発症例の正常組織、乳頭癌組織および、未分化癌組織から得られた DNA の p53 exon 4 の *Bst*UI 処理後の泳動像である。乳頭癌組織には LOH は認められなかったが、未分化癌組織に LOH が認められた。本症例は72歳の女性である。45歳時に甲状腺右葉切除および右頸部郭清術を受けたが、その後局所再発を認め、再手術、¹³¹I 治療、化学療法、放射線外照射、温熱療法を行ったが、効なく72歳時死亡した。本組織は、剖検時局所再発巣の一部から得られたものである。

図4は、甲状腺乳頭癌例の p53 intron 6 の *Msp*I 処理後、図5は、RB intron 20、図6は APC exon 11 の *Rsa*I 処理後、図7は DCC の *Msp*I 処理後の電気泳動像である。いずれの症例にも LOH は認められなかった。

IV 考 察

RB 遺伝子産物は細胞周期の制御に²⁷⁾、APC および DCC 遺伝子産物は細胞間の相互作用²⁸⁾²⁹⁾に関与していると考えられている。また、DCC 遺伝子は、転移巣のみに変異が認められる場合があること³⁰⁾、また、癌の進行とともにその変異が高頻度となること³¹⁾より、血行転移および悪性化に関与する遺伝子と推測されている。これらの遺伝子変異は大腸癌、肺癌、食道癌、乳癌、腎癌など多種の癌で認められ、それらの癌抑制遺伝子の不活性化は主に LOH として認められている⁶⁾⁻⁸⁾¹¹⁾¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。しかしながら、今回検討した甲状腺乳頭癌の heterozygotes 全症例に、RB、APC、DCC 遺伝子の LOH は認められなかった。本研究では、RB、APC、DCC 遺伝子の全領域について LOH の検討を行っているわけではない。しかしながらこのことは、甲状腺乳頭癌においては、これらの癌抑制遺伝子の不活性化の関与がきわめて薄いことを示唆すると考えられる。しかし、甲状腺乳頭癌における癌抑制遺伝子の不

活性化に遺伝子欠損が関与していない可能性もあり得るので、この点については今後さらに検討を重ねなければならない。

一方、生物学的悪性度がきわめて高く、予後不良な甲状腺未分化癌のほとんどは、分化癌の未分化転化により発生すると考えられている³²⁾。今回の検討で、甲状腺乳頭癌のみならず未分化癌においても、RB, APC, DCC 遺伝子に LOH が認められなかったことより、甲状腺乳頭癌や未分化癌の発生および進展に、これらの癌抑制遺伝子の関与は薄いと推測され、未知の癌抑制遺伝子が関与している可能性、あるいは、Lynch 症候群³³⁾、多発性内分泌腺腫症 2 型³⁴⁾のように、癌抑制遺伝子の不活性化とは別の機序が関与している可能性が示唆された。

従来の報告²⁾⁻⁵⁾をみても、甲状腺乳頭癌における p53 遺伝子の変異はほとんど認められていない。一方、Ito らは、純粋な甲状腺乳頭癌 10 例に p53 遺伝子の変異を認めなかったにもかかわらず、未分化癌では、5 例中 3 例に LOH を、7 例中 6 例に点変異を認めたこと³⁾および、甲状腺未分化癌と共存した甲状腺乳頭癌 4 例中 1 例に p53 遺伝子の LOH を認めた⁴⁾ことより、p53 遺伝子変異が、甲状腺分化癌の未分化転化の主因であろうと推測している。本研究では点変異に関するシーケンス分析は行っていないが、未分化癌の全例において、RB (intron 20), APC (exon 11), DCC 遺伝子の検討部位に LOH が認められなかったにもかかわらず、p53 遺伝子の LOH の頻度は Ito らの報告とほぼ同率であった。また、局所再発巣では、腫瘍のほぼ全体を占める乳頭癌組織に p53 遺伝子の LOH が認められなかったが、共存した微小な未分化癌組織に LOH が認められた。これらのことより、p53 遺伝子変異は、甲状腺乳頭癌の未分化転化の一因であろうと推測された。しかし、germ line に p53 遺伝子変異を有する Li-Fraumeni 症候群で甲状腺未分化癌の発生頻度は高くなく³⁵⁾³⁶⁾、また、p53 遺伝子変異を有する他の癌腫に、甲状腺未分化癌にみられるような急速な増大や広範な転移は必ずしも認められない⁹⁾⁻¹³⁾。さらに、未分化癌の特徴の一つである高齢者発症には、複数の遺伝子変異が関与していると考えられる。これらのことより、p53 遺伝子変異は未分化癌における遺伝子変

異の一つではあるが、甲状腺未分化癌の生物学的悪性度は、別の未知の遺伝子により規定されていると推測された。

本研究では、既に詳述した方法²²⁾に従って、顕微鏡下でできる限り高密度の癌組織を取り出す方法を用い LOH の検討を行った。その結果、乳頭癌組織中にわずかに存在する未分化癌組織に、p53 遺伝子の LOH を見いだした。この症例における変異の検討は、本方法を用いてのみ可能であったと考えられる。微小な病変や複数の異なる組織型を混在している腫瘍における遺伝子変異の検索には本法は有用であることが明らかとなった。

V 結 語

甲状腺乳頭癌および未分化癌の発生および進展に関与する癌抑制遺伝子の検索のため、甲状腺乳頭癌 35 例、甲状腺未分化癌 7 例について、p53, RB, APC, DCC 遺伝子の LOH について、PCR を用い検討した。その結果は以下のごとくである。

- 1) 甲状腺乳頭癌の LOH 頻度は、p53 が 0/19, RB が 0/18, APC が 0/17, DCC が 0/12 であった。
- 2) 甲状腺未分化癌の LOH の頻度は、p53 が 2/5, RB が 0/4, APC が 0/4, DCC が 0/3 であった。
- 3) 乳頭癌組織の一部に未分化癌組織が認められる再発巣では、未分化癌組織に p53 遺伝子の LOH が認められた。

以上の結果より、甲状腺乳頭癌のみならず未分化癌においても、p53, RB, APC, DCC 各癌抑制遺伝子の関与は薄く、甲状腺癌の発生または進展には未知の癌抑制遺伝子が関与している可能性、または、癌抑制遺伝子の不活性化とは別の遺伝子変異が関与している可能性が示唆された。また、p53 遺伝子変異は、甲状腺乳頭癌の未分化転化に関与している可能性が考えられたが、未分化癌の生物学的悪性を規定する遺伝子変異ではないと考えられた。

本論文の要旨の一部は、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。

文 献

- 1) Stanbridge EJ: Identifying tumor suppressor genes in human colorectal cancer. *Science* 247: 12-13, 1990
- 2) Herrmann MA, Hay ID, Bartelt DH Jr, Rittland RR, Dahl RJ, Grant CS, Jenkins RB: Cytogenetic and

- molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. *J Clin Invest* 88 : 1596-1604, 1991
- 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ : Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 241 : 353-357, 1988
 - 7) Varley JM, Armour J, Swallow JE : The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumors. *Oncogene* 4 : 725-729, 1989
 - 8) Ishikawa J, Xu HJ, Hu SX, Yandell DW, Maeda S, Kamidono S, Benedict WF, Takahashi R : Inactivation of the retinoblastoma gene in human bladder and renal cell carcinomas. *Cancer Res* 51 : 5736-5743, 1991
 - 9) Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B : Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 238 : 193-197, 1987
 - 10) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, VanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B : Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244 : 217-221, 1989
 - 11) 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
 - 12) Bressac B, Galvin KM, Liang TJ, Isselbacher KJ, Wands JR, Ozturk M : Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1973-1977, 1990
 - 13) 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
 - 14) Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Terada M, Saito T, Kobayashi M, Sugimura T, Hirohashi S : Frequent loss of heterozygosity at the *DCC* locus in gastric cancer. *Cancer Res* 52 : 3099-3102, 1992
 - 15) Höhne MW, Halatsch ME, Kahl GF, Weinel RJ : Frequent loss of expression of the potential tumor suppressor gene *DCC* in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 52 : 2616-2619, 1992
 - 16) Kinzler KW, Nilbert MC, Su L, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, Finniear R, Markham A, Groffen J, Boguski MS, Altschul SF, Horii A, Ando H, Miyoshi Y, Miki Y, Nishisho I, Nakamura Y : Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253 : 661-665, 1991
 - 17) Suárez HG, Du Villard JA, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, Parmentuier C, Monier R : Detection of activated *ras* oncogenes in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 2 : 403-406, 1988
 - 18) Terrier P, Sheng ZM, Schlumberger M, Tubiana M, Caillou B, Travagli JP, Fragu P, Parmentier C, Riou G : Structure and expression of *c-myc* and *c-fos* proto-oncogenes in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 57 : 43-47, 1988
 - 19) Namba H, Gutman RA, Matsuo K, Alvarez A, Fagin JA : H-*Ras* protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 71 : 223-229, 1990
 - 20) Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Porta GD, Fusco A, Vecchio G : PTC is a novel rearranged form of the *ret* proto-oncogene and is frequently

- detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60 : 557-563, 1990
- 21) Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Porta GD: *TRK-T1* is a novel oncogene formed by the fusion of *TPR* and *TRK* genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 7 : 237-242, 1992
 - 22) 麻沼和彦: 甲状腺乳頭癌における染色体欠失領域および p53 遺伝子変異の検討. 信州医誌 42 : 371-378, 1994
 - 23) Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H : Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* 18 : 4961, 1990
 - 24) 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 MspI. *Nucleic Acids Res* 19 : 4796, 1991
 - 25) Yandell DW, Dryja TP : Detection of DNA sequence polymorphisms by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. *Am J Hum Genet* 45 : 547-555, 1989
 - 26) Boynton RF, Blount PL, Yin J, Brown VL, Huang Y, Tong Y, McDaniel T, Newkirk C, Resau JH, Raskind WH, Haggitt RC, Reid BJ, Meltzer SJ : Loss of heterozygosity involving the APC and MCC genetic loci occurs in the majority of human esophageal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 : 3385-3388, 1992
 - 27) Wagner S, Green MR : A transcriptional tryst. *Nature* 352 : 189-190, 1991
 - 28) Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JW, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, Vogelstein B : Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247 : 49-56, 1990
 - 29) Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P : Association of the *APC* gene product with β -Catenin. *Science* 262 : 1731-1734, 1993
 - 30) Miyaki M, Seki M, Okamoto M, Yamanaka A, Maeda Y, Tanaka K, Kikuchi R, Iwama T, Ikeuchi T, Tonomura A, Nakamura Y, White R, Miki Y, Utsunomiya J, Koike M : Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 50 : 7166-7173, 1990
 - 31) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smith AMM, Bos JL : Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319 : 525-532, 1988
 - 32) Nishiyama RH, Dunn EL, Thompson NW : Anaplastic spindle-cell and giant-cell tumors of the thyroid gland. *Cancer* 30 : 113-127, 1972
 - 33) Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R : The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75 : 1027-1038, 1993
 - 34) Mulligan LM, Kwok JBJ, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L, Ponder MA, Telenius H, Tunnacliffe A, Ponder BAJ : Germ-line mutations of the *RET* proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363 : 458-460, 1993
 - 35) Srivastava S, Zou Z, Pirolo K, Blattner W, Chang EH : Germ-line transmission of a mutant p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348 : 747-749, 1990
 - 36) Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JFJr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH : Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250 : 1233-1238, 1990

(6. 5. 20 受稿)