

# プレキャスト Gradient Gel を用いた 非 RI PCR-SSCP 法による p 53 遺伝子変異の検出

奈良県立医科大学病態検査学

中 林 仁 美, 岡 本 康 幸, 中 野 博

奈良県立医科大学附属病院中央臨床検査部

丹 羽 欣 正, 久 保 田 力

## DETECTION OF MUTATIONS IN THE p53 GENE BY NONRADIOACTIVE PCR-BASED SSCP ANALYSIS USING PRECAST GRADIENT POLYACRYLAMIDE GEL

HITOMI NAKABAYASHI, YASUYUKI OKAMOTO  
and HIROSHI NAKANO

*Department of Clinico-Laboratory Diagnostics, Nara Medical University*

YOSHIMASA NIWA and CHIKARA KUBOTA

*Section of Central Clinical Laboratory, Nara Medical University Hospital*

Received August 12, 1996

**Abstract:** We optimized the convenient nonradioactive polymerase chain reaction (PCR)-based single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis using commercially available precast gradient polyacrylamide gels to detect point mutations in the p 53 gene. The optimization was made by using 2-15 % gradient gel whose running conditions were 2×Tris glycine or 1×TBE buffer, and 200 V for 2 hours at 4°C.

Also, we screened 47 patients with various hematologic malignancies and detected p 53 mutations in two patients with acute leukemia. Both of them showed a resistance to chemotherapy, whereas 20 other patients with acute leukemia and without detectable mutation did not show such a resistance except for one single case. Mutations in the p 53 gene could be closely associated with a resistance to chemotherapy in leukemias.

### Index Terms

polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP), p 53, point mutation, leukemia

### 緒 言

近年, 各種の悪性腫瘍において, 癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異が発症機転や進展との関連で注目されている。しかし, その検出方法の多くは手技の煩雑さなどのため, 未だ検査室レベルでの日常検査とはなっていない。

本研究では, 検査室でも応用可能な, 簡便かつ安全な遺伝子変異の検出法を確立するため, 代表的な癌抑制遺伝子である p 53 について, polymerase chain reaction (PCR) による遺伝子増幅産物の single strand conformation polymorphism (SSCP) 分析を, 市販のプレキャスト gradient gel (以下 GG) を用いて非 RI にて実施す

るための最適条件を検討し、さらに種々の造血管腫瘍患者を対象としてスクリーニングを試みた。

### 対象と方法

1) 対象：急性骨髄性白血病(AML)12例, 急性リンパ性白血病(ALL)10例, 慢性骨髄性白血病5例, 骨髄異形成症候群9例, その他(成人T細胞白血病, セザリー症候群, 多発性骨髄腫, 混合型白血病)11例の計47症例, 57検体を対象とした。陽性コントロールとしてp 53の exon 8に2ヶ所の点突然変異(codon 273; CGT → CAT, codon 306; CCC → TCC)の存在が知られている大腸癌細胞株 SW 480, 陰性コントロールとして特発性血小板減少性紫斑病の診断が確定しており, 骨髄に他の異常を認めない1症例を用いた。

2) 血液細胞からのDNA抽出：ヘパリン・EDTA合剤(アンチクロットET: 日本商事)を添加した骨髄穿刺液100 μlから, SepaGene(三光純薬)を用いてDNAを抽出した。

3) PCR: 造血管腫瘍で点突然変異が多く報告されている exon 5, 7, 8<sup>1-4)</sup> に対して, 同一条件でPCRが行なえるように primer を作成した(Table 1)。反応は, 94°C1分で変性後, 94°C50秒, 60°C50秒, 72°C50秒を32サイクル繰り返し, 最後に72°C5分で伸長反応を行った。PCR産物は2% agarose gel で電気泳動後, ethidium bromide 染色にて確認し, 目的の band の部分をフナーゲルチップ(フナコシ)で回収し, GeneClean II(BIO 101)にて精製した。

4) SSCP: 精製PCR産物の一部を変性溶液(0.1% xylene cyanole, 0.1% bromophenol blueを含むformamide)と1:4に混合し, 94°C3分間加熱後冷却し, 電気泳動を行った。泳動に用いた gel はプレキャスト GG の2-15%, 4-20%, 10-20%(それぞれ MULTIGEL 2/15, 4/20, 10/20, 第一化学), および5% poly-

acrylamide gel(PAG)の10% glycerol を含むもの, 含まないものとし, 比較検討した。gel はいずれも84×90×1.00 mmの大きさのものを用いた。泳動用 buffer は2× Tris-glycine(50 mM Tris, 384 mM glycine)および1× TBE(90 mM Tris, 92 mM borate, 2.5 mM EDTA)について検討した。泳動温度は4°C(低温室内)のみとし, すべて200 V 定電圧で泳動した。泳動時間は各 gel において目的の band が gel のほぼ中央にくるまでの時間とした。泳動終了後, 銀染色にてSSCPパターンを検討した。変異を認めたものについては, direct sequencing にて塩基配列を検索した。

### 成 績

GGを用いたSSCP分析で, 全47例中, AMLの1

SW Pt1 N



Fig. 1. SSCP analysis for p53 exon 8 with 4-20% gradient gel. SW; SW408 colon cancer cell, Pt1; a patient with AML, N; normal control. Electrophoresis for SSCP was performed with 4-20% GG in 1×TBE buffer. Other conditions and abbreviations used are described in the text.

Table 1. PCR primers for p 53 exon 5, 7 and 8

Exon 5	Sence	5'-tggtcactgtgcccctgact-3'
	Antisense	5'-caaccagccctgtctct-3'
	Size of products	272bp
Exon 7	Sence	5'-cacaggtctcccaaggc-3'
	Antisense	5'-aggggctcagcggaag-3'
	Size of products	232bp
Exon 8	Sence	5'-ggtggttgggagtagatgga-3'
	Antisense	5'-gcttctgtcctgctgtctt-3'
	Size of products	255bp

例, ALL の1例に p53 の変異を認めた(GG の2-15%, 4-20%, 10-20%のいずれでも検出可能). 前者を Pt 1, 後者を Pt 2 とする. Pt 1 は67才女性, FAB分類 M4, Pt 2 は61才女性, FAB分類 L2で, sequencingの結果 Pt 1 では exon 8, condon 278 の CCT → GCT 変異, Pt 2 では exon 7, condon 248 の CGG → TGG 変異を認めた.

Fig. 1 に exon 8 の GG 4-20%による SSCP 像を示す. 正常パターンと比べて, 細胞株 SW 480 および Pt 1 では異なった位置に band が認められた. Pt 1 は, 化学療法によっても寛解に至らず, 治療開始より約1年後に死亡した. 治療開始前より全経過を通じて同様の変異が持続していた.

5% PAG を用いた SSCP 分析では, glycerol を含まない gel では SW 480 の変異は明らかではなかったが, Pt 1 の変異は検出された. しかし, glycerol を含む gel では両者とも変異は明らかではなかった.

Fig. 2 に Pt 2 の exon 7 の GG 4-20%による SSCP 像を示す. 治療前には変異は明らかではなかったが, 化学療法は行われたにもかかわらず骨髄中芽球は減少せず(常に80%以上), 治療開始より約3ヶ月後に変異が出現してきた. 本例は, 治療開始約半年後に死亡した. 本例の変異も, glycerol 含有, 非含有にかかわらず5% PAG では検出されなかった.

変異を検出し得なかった急性白血病20例のうち寛解に至らなかったのは1例(56才女性, AAL L2, 診断よ

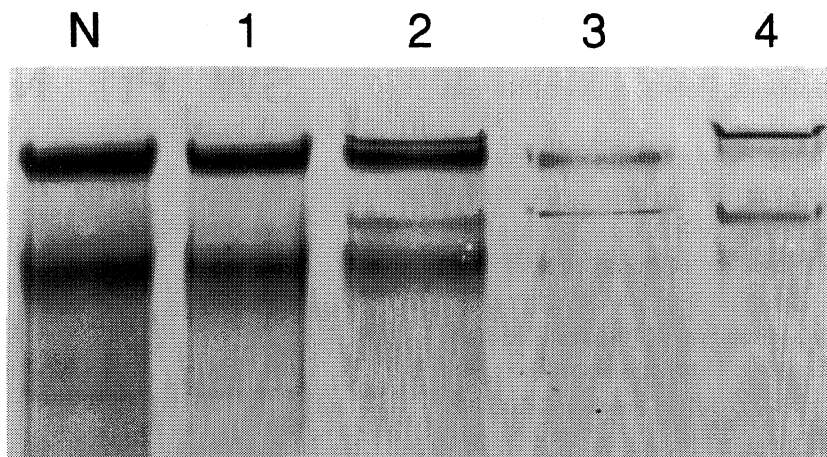


Fig. 2. Time course of SSCP pattern for p53 exon 7 in a patient with ALL (Pt2). N; normal control, lane 1-4; Pt2 at 1995/11/15, 1996/1/9, 1996/1/31 and 1996/2/2, respectively.

Table 2. Summary of SSCP conditions and their abilities to detect mutations in the p53 gene exon 5, 7 or 8

Gel	Running time on electrophoresis	Ability to detect mutations			
		SW 480	Pt 1	Pt 2	
GG	10-20%	4 hours	+	+	+
	4-20%	3 hours	+	+	+
	2-15%	2 hours	+	+	+
5% PAG	with glycerol	1 hours and 15 min.	-	-	-
	without glycerol	1 hours and 15 min.	-	+	-

+; detected, -; not detected.

Other conditions of electrophoresis were constant at 200V and at 4°C.

2×Tris-glycine or 1×TBE was used for running buffer, and the difference of buffer did not affect the results.

Abbreviations are described in the text.

り約20日後に死亡)のみであり、治療抵抗性を示す率は変異を有する例で高かった( $p < 0.01$ ,  $\chi^2$  検定)。

各 gel による至適泳動時間と変異検出の有無を Table 2 にまとめた。GG では、どの gel でも SW 480, Pt 1, Pt 2 のいずれの変異も検出可能であった。5% PAG では、glycerol 含有の有無にかかわらず、SW 480, Pt 2 の変異は不明瞭であった。buffer の種類による結果の違いは認められなかった。

## 考 案

PCR-SSCP<sup>5)</sup> 法は遺伝子の点突然変異を簡便にスクリーニングする方法として近年広く検討されるようになってきている。しかし、従来はSSCP bandの検出に radioisotope を用いる方法<sup>1-4)</sup>が多く、また特殊な泳動装置が必要となることなどから、日常検査には成り得ていなかった。しかし最近では、銀染色<sup>6,7)</sup>、ethidium bromide 染色<sup>8)</sup>、ピオチン化 primer<sup>9)</sup> などを用いた非 RI 法を、ミネゲルを用いて測定する方法などが試みられるようになってきており、スクリーニング検査としての応用が期待される。

そこで今回我々は、市販のプレキャスト GG を用いた非 RI の PCR-SSCP 法により、p 53 の点突然変異を検出するための最適条件を検討し、造血器腫瘍を対象にスクリーニングを行った。

SSCP に用いられる PAG の濃度や glycerol 含有の有無、buffer の種類、温度などの泳動条件は報告によって様々である<sup>1-9)</sup>。今回検討した gel の中では結果の明瞭性および所要時間の短さからみて、GG 2-15% が最も適当であると思われた。また、今回使用した二種類の buffer では結果の差は見られなかった。しかし、重要な要素の1つである温度については、一般の検査室では変更が困難であり、比較的安定と思われる低温室内での泳動のみとなった。この点については、今後の検討が必要と思われるが、過去の p 53 SSCP に関する報告では、4℃で最も良好な結果が得られているようである<sup>10)</sup>。

今回検討した造血器腫瘍 47 例の内、2 例に p 53 の点突然変異が認められた。この 2 例はいずれも化学療法によって寛解に至らず、p 53 に変異を認める造血器腫瘍は化学療法に反応しにくく、予後が悪いとする従来の報告<sup>11,12)</sup>と一致していた。正常 p 53 は、放射線などで DNA に障害を受けた細胞を apoptosis に導く機能を有していると言われている<sup>13)</sup>。p 53 に変異が起こるとこの機能が障害されることが、造血器腫瘍の予後不良と関連していると推察されるが、明らかではない。

Pt 2 は、初期の診断時には SSCP で変異が明らかでな

かったが、その後変異が出現し、最終的には変異を示す band のみとなった。これまで、初期診断時に変異が検出されず、いったん寛解した後再燃時に変異が検出された例の報告<sup>14)</sup>はあるが、本例のような経過を辿った症例の報告は今まで見られていない。初期には変異を持つ clone が存在しなかったかあるいは少ないために SSCP の感度以下であったものが、しだいに変異を持った clone に入れ替わっていったものと考えられるが、その間に行われた治療が何らかの影響を与えた可能性も否定できない。

造血器腫瘍における p 53 変異の頻度は従来の報告では 10-20% とするものが多く<sup>1-4,11,12)</sup>、今回の我々の検討では従来の報告よりやや頻度が低い結果(4%)であった。造血器腫瘍における p 53 の変異は今回検討した exon 5, 7, 8 の他にも exon 6 のものが多く報告されている<sup>1-4,12)</sup>。今回検討した症例のうち、p 53 の変異が検出されなかった中で化学療法に抵抗性を示した例は 1 例だけであったが、本例についても exon 6 で変異の有無は不明である。今回は陽性コントロールが少なかったため、本法自体の感度については不明であり、false negative の可能性は否定できない。今後は、さらに症例を増やすとともに他の exon についての分析や、変異の検出されなかった症例についても sequencing 結果と対比するなど、変異率と検出感度との関連についての詳細な検討が必要と思われる。

## 結 語

市販のプレキャスト gel を用いた非 RI の PCR-SSCP 法の最適条件を検討し、造血器腫瘍における p 53 変異のスクリーニングを試みた。その結果、2-15% GG を用いることにより、最も明瞭かつ短時間での変異 band の検出が可能であった。本法を用いて、p 53 の exon 5, 7, 8 中の変異を、造血器腫瘍 47 例で検索したところ、急性白血病 2 例で変異を検出した。p 53 変異を示した症例はいずれも化学療法への抵抗性を示しており、p 53 変異と治療抵抗性との関連が示唆された。

本法は、通常の検査室での装備で実施可能な、簡便かつ安全な変異スクリーニング法として有用であると考えられる。

## 文 献

- 1) Sugimoto, K., Toshiyama, H., Sasaki, R., Miyagawa, K., Hagiwara, K., Hirai, H., Ishikawa, F. and Takaku, F.: Mutations of the p 53 gene in lymphoid leukemia. *Blood* 77: 1153, 1991.

- 2) **Kaneko, H., Misawa, S., Horike, S., Nakai, H. and Kashima, K.** : TP 53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood* **85** : 2189, 1995.
- 3) **Preudhomme, C., Dervite, I., Wattel, E., Vanrumbeke, M., Flactif, M., Luc Lai, J., Hecquest, B., Coppin, MC., Nelken, B., Gosselin, B. and Fenaux, P.** : Clinical significance of p 53 mutations in newly diagnosed Burkitt's lymphoma and acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **13** : 812, 1995.
- 4) **Adamson, DJA., Dawson, AA., Bennett, B., King, DJ. and Haites, NE.** : p 53 mutation in the myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* **89** : 61, 1995.
- 5) **Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K.** : Rapid and sensitive detection of point mutation and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5** : 874, 1989.
- 6) **Neubauer, A., Brendel, C., Vogel, D., Schmidt, CA., Heide, I. and Huhn, D.** : Detection of p 53 mutations using nonradioactive SSCP analysis : p 53 is not frequently mutated in myelodysplastic syndromes(MDS). *Ann. Hematol.* **67** : 223, 1993.
- 7) **Oto, M., Miyake, S. and Yuasa, Y.** : Optimization of Nonradioisotopic single strand conformation polymorphism analysis with a conventional minislabs gel electrophoresis apparatus. *Anal. Biochem.* **213** : 19, 1993.
- 8) **Hongyo, T., Buzard, GS., Calvert, RJ.** : Weghorst, CM. 'Cold SSCP' : a simple rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res.* **21** : 3637, 1993.
- 9) **稲野浩一, 三井田 孝, 松戸隆之, 岡田正彦** : 非 RI 発色法を用いた PCR-SSCP 法の日常遺伝子検査法としての有用性. *臨床病理* **44** : 90, 1996.
- 10) **Condie, A., Eeles, R., Borresen, A-L., Coles, C., Cooper, C. and Prosser, J.** : Detection of point mutations in the p 53 gene : comparison of single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques. *Hum. Mut.* **2** : 58, 1993.
- 11) **Wattel, E., Preudhomme, C., Hecquet, B., Vanrumbeke, M., Quesnel, B., Dervite, I., Morel, P. and Fenaux, P.** : p 53 mutation are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* **84** : 3148, 1994.
- 12) **El Rouby, S., Thomas, A., Costin, D., Rosenberg, CR., Potmesil, M., Silber, R. and Newcomb, EW.** : p 53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR 1/MDR 3 gene expression. *Blood* **82** : 3452, 1993.
- 13) **加藤満雄** : p 53 とアポトーシス. *肝胆膵* **32** : 171, 1996.
- 14) **Hsiao, MH., Yu, AL., Yeargin, J., Ku, D. and Hass, M.** : Nonhereditary p 53 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia are associated with the relapse phase. *Blood* **83** : 2922, 1994.