

市販のキットに含まれる STR ローカスの悪性腫瘍組織における変異

○吉本高士

医学系技術支援室 第一医学系形態構造解析班 第二技術

概要

多色蛍光標識プライマーを用いた市販の STR (short tandem repeat) 型判定用マルチプレックスキットが親子鑑定や個人識別に汎用されている。擬父や同胞等が既に死亡している場合、生前医療時に使われた検査試料が親子や血縁関係を調べる鑑定資料として利用することも少なくない。そのような場合、血液型判定用紙に付着している血痕の他に、肝生検などのパラフィン包埋の組織標本が利用されることもあるが、その組織が腫瘍細胞であることも多い。また、血縁関係を調べるばかりではなく、その組織標本が故人に由来するものかどうかの同定を必要とされる場合もある。さらに、腫瘍細胞での STR の不安定性についてはよく知られており、腫瘍細胞マーカーとして利用されているものもある。

本研究では、汎用されている市販のキットに含まれるローカスなど常染色体上の 25 STR ローカス及び Y 染色体上の 14 STR ローカスにおける突然変異の頻度及び動態について、正常組織と腫瘍組織を用いて比較検討した。

1. 材料および方法

癌により死亡した患者 11 例から病理解剖時に採取した正常組織及び腫瘍組織 0.04 g から QIAmp DNA Mini キットにより DNA を抽出した。2 ng の抽出 DNA を鋳型として、市販の AmpFlSTR Identifiler キット及び Y-PLEX™ 6 キット並びに当講座で作製した 3 種類のマルチプレックスシステム (FL-6、Quadraplex、Y-10plex) を用いて PCR 増幅した。各増幅産物を Genetic Analyzer310 を用いて解析し、Genotyper ソフトにより、常染色体 STR 計 25 ローカス、Y 染色体 STR 計 14 ローカス及び性別判定用であるアメロゲニンローカスを型判定した。その型判定結果を Genotyper plot パターン及びピーク高で、正常組織と腫瘍組織で比較した。変異と考えられるアレルが観察された試料を既報のプライマーセットにより増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動・銀染色でアレルを分離した。各アレルを再増幅したものについて Big Dye terminator V.3 を用いて塩基配列決定を行い、どのような変異が生じているかを観察した。

2. 結果と考察

表 1 に示すように、11 例中 5 例の腫瘍細胞で、アレル数が増加する変異が、FGA ローカスで 2 例、D7S820、D13S317、D8S1179、CSF1PO、D7S809 及び D14S299 で各 1 例において観察された。そのうち、アレルが大きくなったと考えられるものは 4 ローカス、小さくなったと考えられるものは 4 ローカスであった。これらのアレルについて、塩基配列を調べたところ、その変異は全てリピート数の増減であり、塩基置換やフランキング領域における欠失・挿入は見られなかった。一例として D8S1179 ローカスにおける Genotyper plot のパターンと塩基配列決定したリピート部位のエレクトロフェログラムを図 1 に示す。このアレル数の増加する変異の発生率は、調べられた常染色体 275 ローカス中で 8 ローカスであったので、約 2.9% と算出

された。また、このアレル数の増減を示す変異は全て常染色体 STR で観察され、Y 染色体上の STR には、全く観察されなかった。このことは、調べられたローカス数が Y 染色体 STR では約半分と少ないものの、染色体の大きさや 2 倍体ではないことと何だかの関係があるかもしれないことが考えられた。

その他の変異として、正常組織の常染色体 STR でヘテロ接合体と型判定されたローカスにおいて、Genotyper plot 上で、不均衡なピーク高が半数以上のローカスで観察された。このうち、2つのピーク高比が 0.5 以下のものは、STR で 35 ローカス、アメロゲニンローカスで 1 例観察された（表 1 参照。各マルチプレックスシステムの 1 例を図 2〜3 に示す。）。また、ピーク高比が 0.1 以下と極端に不均衡なものも 5 ローカスみられた。これらの中には Genotyper で自動型判定する際に、ヘテロ接合体と判定されないものもあった。調べられた常染色体 25STR ローカスでヘテロ接合体が 207 観察されたので、その発生率は約 17%、平均ピーク高比は 0.268 ± 0.145 であった。従って、本研究により、腫瘍組織の DNA 試料から STR 型判定する際には、アレル数の増加ばかりでなく、ピーク高の極端な不均衡による誤判定にも特に注意する必要があることが示唆された。

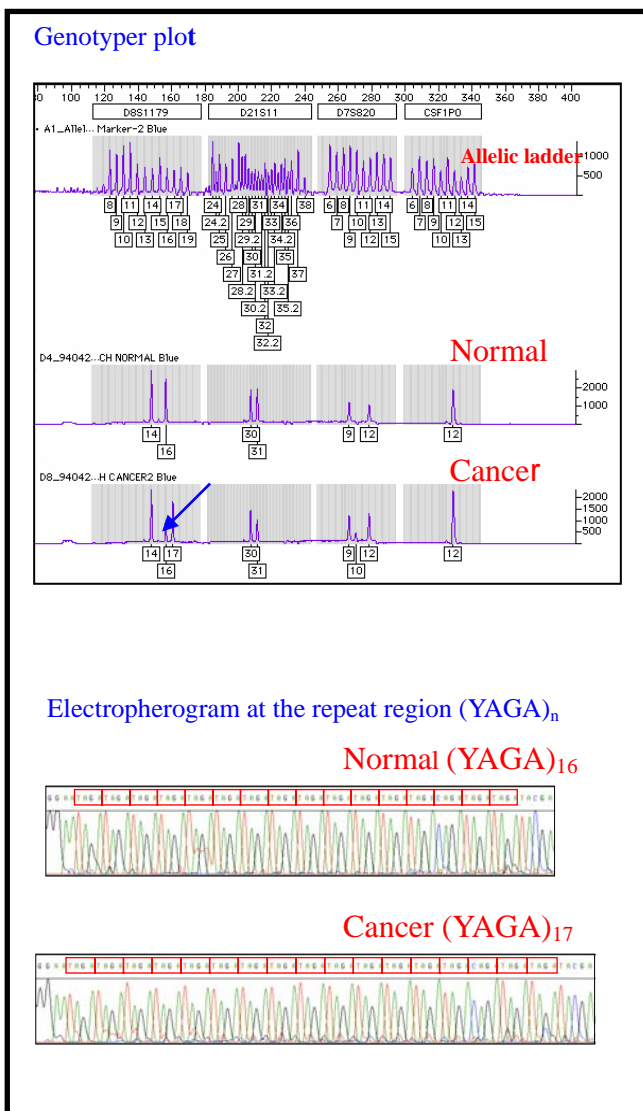


図 1. 事例 3 の D8S1179 ローカスにおける変異

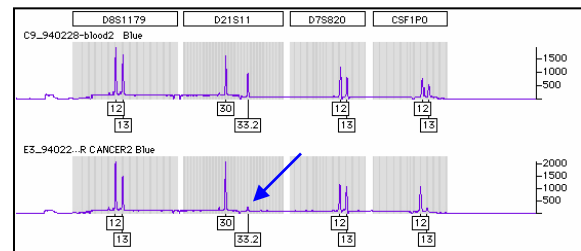


図 2. 事例 3 の D8S1179 ローカスにおける変異

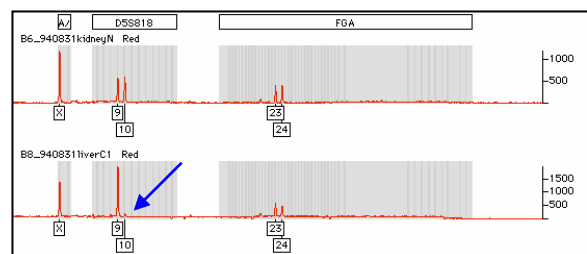


図 3. 事例 3 の D8S1179 ローカスにおける変異

表1. 本研究で観察された腫瘍組織における異常のまとめ

No.	性別	年齢	死因	臓器		アレルの増減			不均衡アレル		
				腫瘍	正常	ローカス	正常型	変異型	ローカス	ピーク高比	
1	M	47	肺癌	肝臓	血液					D21S11	0.0476
										CFS1PO	0.0856
										D18S51	0.3989
										D6S1056	0.0631
										D4S2639	0.4558
2	M	59	食道癌	食道	大動脈						
3	M	102	胃癌	胃	胃	D8S1179	14-16	14-16-17	D16S539	0.3482	
						D7S820	9-12	9-10-12	vWA	0.1206	
						D13S317	11-12	11-12-13	D15S233	0.4040	
									D6S1056	0.4739	
									D17S1290	0.3277	
4	M	62	胆管癌	肝臓	肝臓	FGA	25-26	18-25-26			
5	M	74	肝癌	肝臓	腎臓				D21S11	0.1106	
									D3S1358	0.1448	
									D19S433	0.1865	
									D16S539	0.1830	
									D18S51	0.4497	
									FGA	0.1636	
			D20S480	0.3526							
			D4S2639	0.0458							
6	M	56	肺癌	肺	腎臓						
7	F	47	肝門癌	肝臓	腎臓	D7S809	29-29	28-29			
						CFS1PO	11-12	10-11-12	D18S51	0.2638	
						D14S299	30-33	30-33-34	AMEL	0.3862	
8	M	49	舌癌	皮膚	肝臓				D7S809	0.3605	
									D20S480	0.3489	
									D9S1118	0.2664	
									D4S2639	0.3641	
									D21S11	0.1605	
9	F	53	大腸癌	肝臓	肝臓				D13S317	0.1945	
									D18S51	0.1049	
									D5S818	0.0441	
									D6S2439	0.4742	
									D6S1056	0.3550	
									D17S1290	0.1093	
10	F	78	肝門部胆管癌	肝臓	肝臓	FGA	24-25	23-24-25	D8S1179	0.2246	
									CFS1PO	0.3980	
11	M	80	膀胱癌	膀胱	膀胱 (転移)				D6S1056	0.2939	
									D9S1118	0.4891	
									D17S1290	0.4611	

Identifiler
 FL-6
 Quadraplex

参考文献

1) Chung-Yen Pai, Ling-Ling Hsieh, Chun-Wei Tsai, Fu-Shyan Chiou, Chiou-Herr Yang,.: Allelic alterations at the STR markers in the buccal tissue cell of oral cancer patients and the oral epithelial cell of healthy betel quid-chewers: an evaluation of forensic applicability . F Sci Int, 129: 158-167, 2002.