

**EXPRESSION OF *ras* GENES IN HUMAN STOMACH
AND THYROID CANCERS: PREPARATION OF ANTI-*ras* p21
MONOCLONAL ANTIBODIES AND IMMUNOHISTOCHEMICAL
ANALYSES**

ヒト胃癌及び甲状腺癌における *ras* 遺伝子発現:
抗 *ras* p21 モノクローナル抗体の作製と免疫組織化学的検討

KIYOHIRO HAMATANI, Ph.D. 浜谷清裕

KUNIKO YOSHIDA, M.D. 吉田邦子

NORI NAKAMURA, Ph.D. 中村 典

RYOZO ETO, M.D. 江藤良三

HIROSHI SHIKU, M.D. 珠玖 洋

MITOSHI AKIYAMA, M.D. 秋山實利



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION

財団法人 放射線影響研究所

A cooperative Japan - United States Research Organization

日米共同研究機関

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

We are indebted to Dr. O. Takahara for providing pathological tissue specimens. The mice used for immunization and for production of ascites of monoclonal antibodies were maintained in the Laboratory Animal Center for Biological Research, Nagasaki University School of Medicine. This work was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture, and by a grant from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

病理組織標本を提供された高原 耕博士に謝意を表する。免疫処置及びモノクローナル抗体の腹水の作製に用いたマウスは長崎大学医学部附属動物実験施設で飼育されたものである。本研究は、文部省科学研究補助金及び厚生省の補助金による援助を受けた。

A paper based on this report was published in the following journal:

本報告に基づく論文は次の雑誌に掲載された。

Cancer Res 48:5503-9, 1988

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

放射線影響研究所(元ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金をもって運営されている。

EXPRESSION OF *ras* GENES IN HUMAN STOMACH AND THYROID CANCERS: PREPARATION OF ANTI-*ras* p21 MONOCLONAL ANTIBODIES AND IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSES

ヒト胃癌及び甲状腺癌における *ras* 遺伝子発現：
抗 *ras* p21 モノクローナル抗体の作製と免疫組織化学的検討

KIYOHIRO HAMATANI, Ph.D. (浜谷清裕)¹; KUNIKO YOSHIDA, M.D. (吉田邦子)^{*};
NORI NAKAMURA, Ph.D. (中村 典)¹; RYOZO ETO, M.D. (江藤良三)²;
HIROSHI SHIKU, M.D. (珠玖 洋)^{**}; MITOSHI AKIYAMA, M.D. (秋山實利)¹

*Departments of Radiobiology*¹ and *Epidemiologic Pathology*²

放射線生物学部¹ 及び病理疫学部²

SUMMARY

Sixteen clones (RASK-1 to RASK-16) of murine hybridomas producing monoclonal antibodies against *ras* p21 protein were prepared. The p21 produced by *Escherichia coli* (*E. coli*) with an inserted v-Ki-*ras* gene was used as immunogen. RASK-1 was found to be specific to Ki-*ras* p21, whereas RASK-2 to -16 reacted with the p21s of Ki-, N-, and Ha-*ras* genes in both enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and immunoblotting assays. Binding inhibition assays by ELISA using biotinylated monoclonal antibodies showed that these 16 clones included those binding to several mutually distinct sites on p21.

The expressions of *ras* p21 in human stomach and thyroid tissues were examined with RASK-3, which reacted with all the Ki-, N-, and Ha-*ras* p21s, immunohistochemically by the avidin-biotin complex method. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of 101 cases of stomach cancer, 53 cases of noncancer stomach, 74 cases of cancer of the thyroid, and 59 cases of noncancer thyroid were analyzed. In both the stomach and thyroid, cancer cells expressed p21 predominantly. Cells of

要 約

v-Ki-*ras* 遺伝子を組み込んだ大腸菌により産生される p21 を免疫原として、*ras* p21 蛋白に対するマウスモノクローナル抗体を産生する16個のハイブリドーマクローン (RASK-1~RASK-16) を得た。酵素免疫測定法 (ELISA) 及びイムノブロッティングアッセイにより、RASK-1 は Ki-*ras* p21 に特異的であるが、RASK-2~16 のクローンは Ki-, N- 及び Ha-*ras* 遺伝子の p21 すべてと反応することが示された。ビオチン化モノクローナル抗体を用いた結合阻害試験を ELISA により解析した結果、16のクローンのモノクローナル抗体は p21 の同一部位に結合するのではなく、幾つかの異なった部位に結合することが示された。

Ki-, N- 及び Ha-*ras* p21 すべてと反応する RASK-3 を用いて、ヒト胃及び甲状腺組織における *ras* p21 の発現をアビジン-ビオチン複合法により免疫組織化学的に検討した。ホルマリン固定、パラフィン包埋した胃癌101症例、非胃癌53症例、甲状腺癌74例及び非甲状腺癌59症例の組織について解析した。胃及び甲状腺いずれも癌細胞においては、p21 が優位に発現していた。種々の良性疾患においては、病変

^{*}Central Diagnostic Laboratory, Nagasaki University Hospital

長崎大学医学部付属病院検査部

^{**}RERF Consultant and Department of Oncology, Nagasaki University School of Medicine

放影研顧問及び長崎大学医学部腫瘍医学教室

cases with various noncancerous disorders as well as certain types of normal cells were also p21 positive. These findings suggest that caution is required in the use of p21 as a cancer marker.

Expression of p21 was noted in moderately to well-differentiated stomach cancer, intestinal metaplasia, and atypical hyperplasia. This finding suggests that the appearance of p21 in these disorders of gastric epithelial cells is associated with their dedifferentiative changes to the p21-positive intestinal epithelial cells. Thus, expression of p21 in moderately to well-differentiated stomach cancer may have occurred prior to malignant transformation and be independent of the transformation process itself.

INTRODUCTION

Activation of *ras* genes results in either increased production of the normal gene product or production of an aberrant gene product.¹⁻⁸ These abnormal expressions of *ras* gene have been shown to be related to etiology of cancer in various species including humans.³⁻⁸ Two major reasons prompted us to study details of the profiles of expression of *ras* gene products at the cellular level. The first was that precise information on the cell types expressing p21 is essential in investigations of the functional role of *ras* gene products in physiological conditions and in the state of oncogenic processing. The second was to answer the question of whether the expression of *ras* p21 gene products is elevated in certain types of human cancer, and if so, whether expression of *ras* genes is associated with cellular transformation, and whether *ras* gene products are useful as marker for cancer diagnosis. Monoclonal antibodies that react with the *ras* gene product p21 are particularly useful for this purpose since they allow detection of p21 in both tissues and individual cells.⁹⁻¹¹

This paper reports the generation of anti-p21 monoclonal antibodies and analyses of p21 expression in human stomach and thyroid tissues.

MATERIALS AND METHODS

Antigen. Ki-*ras* p21, produced in *E. coli* bearing the plasmid pHN121 containing v-Ki-*ras* genes (provided by Dr. Hirobumi Nakano, Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Tokyo¹²) was used as immunogen. The specificities of monoclonal antibodies were examined using the following antigens: 1) Ki-*ras* p21

細胞及び一部の正常細胞も p21 陽性であった。これらの結果から、p21 を癌のマーカーとして使用するには注意を要するものと考えられる。

中分化～高分化型胃癌、腸上皮化生及び異型上皮巢において、p21 の発現が見られた。胃上皮細胞のこのような病変においても p21 の発現が見られることから、p21 の発現は胃上皮細胞が p21 陽性である腸上皮細胞へ異分化的变化することと関連していると思われる。それ故、中分化～高分化型胃癌における p21 の発現は、細胞が癌へと形質転換をする前に始まっており、p21 の発現そのものは細胞の癌化と直接には関連していないように思われる。

緒言

ras 遺伝子が活性化されると、正常遺伝子産物の産生の亢進又は突然変異型の遺伝子産物の産生が引き起こされる。¹⁻⁸ *ras* 遺伝子のこのような異常発現が、ヒトを含む様々な種における癌の病因と関連していることが示されている。³⁻⁸ 二つの主な理由から、細胞レベルでの *ras* 遺伝子産物発現の概略について詳細な研究を行った。第一の理由は、生理学的諸条件及び発癌過程における *ras* 遺伝子産物の機能的役割を検討する上で、p21 を発現する細胞型についての正確な情報が不可欠だということである。第二の理由は、*ras* p21 遺伝子産物の発現頻度が特定の種類のヒト癌において増加するか否か、もし増加するとすれば、*ras* 遺伝子の発現が細胞の形質転換と関連しているか否か、更に *ras* 遺伝子産物は癌診断のマーカーとして有用であるか否か等の疑問に答えるため、ということである。*ras* 遺伝子産物 p21 と反応するモノクローナル抗体は、組織及び個々の細胞において p21 を検出できるので、上述した目的に特にかなうものである。⁹⁻¹¹

本報では、抗 p21 モノクローナル抗体の産生並びにヒトの胃及び甲状腺組織における p21 の発現に関する解析について報告する。

材料及び方法

抗原. v-Ki-*ras* 遺伝子を含むプラスミド pHN121 を有する大腸菌により産生される Ki-*ras* p21 (協和発酵工業東京研究所の中野博文博士の提供¹²) を免疫原として使用した。以下の抗原を用いてモノクローナル抗体の特異性を検討した。1) 上述の Ki-*ras* p21,

described above; 2) N-ras p21 and Ha-ras p21, produced by *E. coli* with inserted recombinant N-ras genes or Ha-ras genes (provided by Dr. Toshikazu Matsui, Fujita-Gakuen Health University School of Medicine, Aichi¹³); 3) extracts of rat kidney cells transformed by Harvey or Kirsten murine sarcoma viruses (provided by Dr. Takeo Tanaka, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima¹⁴); and 4) NIH/3T3 cells transformed with the Ha-ras gene from the human urinary bladder cancer cell line EJ.

Human tissues. Paraffin blocks of 10% formalin-fixed tissues from the stomach and thyroid, removed at surgery, were obtained from the Department of Pathology, the Japanese Red Cross Nagasaki Atomic Bomb Hospital. The specimens were obtained from 101 cases of stomach cancer, 8 cases of atypical hyperplasia of the stomach (ATP), 15 cases of hyperplastic polyp of the stomach, 13 cases of gastric ulcer, 3 cases of gastritis, and 14 cases of normal stomach. For thyroid tissues, 5 cases of chronic thyroiditis, 2 cases of lymphocytic thyroiditis, 12 cases of follicular adenoma, 2 cases of oxyphilic adenoma, 3 cases of Graves' disease, 2 cases of nodular goiter, 1 case of cyst, 1 case of adenomatous goiter, and 1 case of normal thyroid were used. Similar blocks of thyroid tissues from autopsied cases were obtained at RERF in Nagasaki and Hiroshima. These tissues were from 74 cases of thyroid cancer and 30 cases with normal thyroid.

Preparation of anti-ras p21 monoclonal antibodies. BALB/c×C57BL/6 F₁ mice were immunized four times with v-Ki-ras p21 at 2-week intervals; the first time subcutaneously with 50 μg of v-Ki-ras p21 and complete Freund adjuvant, the second time subcutaneously with 100 μg and incomplete Freund adjuvant, and the third and fourth times intraperitoneally with 100 μg and 200 μg, respectively. Three days after the last immunization, spleens were removed, and spleen cells were fused with myeloma NS-1 cells as described previously.¹⁵ Culture fluids of the hybridomas were assayed for the presence of anti-ras p21 antibody by ELISA and immunofluorescence (IF) assays. Limiting dilution was carried out twice or three times to obtain monoclonality.

Purification and biotinylation of monoclonal antibodies. Protein A binding IgG antibody was prepared from ascites with an affigel protein A MAPS-II kit (Bio Rad Lab., USA). For biotiny-

2) 組み換え N-ras 遺伝子又は Ha-ras 遺伝子を組み込んだ大腸菌により産生される N-ras p21 及び Ha-ras p21 (愛知県藤田学園保健衛生大学医学部の松井俊和博士の提供¹³), 3) Harvey 又は Kirsten マウス肉腫ウイルスにより形質転換されたラット腎臓細胞抽出物(広島大学医学部の田中猛夫博士の提供¹⁴), 及び 4) ヒト膀胱癌細胞株 EJ の Ha-ras 遺伝子により形質転換された NIH/3T3 細胞.

ヒト組織. 外科的に切除された胃及び甲状腺組織の 10%ホルマリン固定, パラフィン・包埋ブロックは日本赤十字社長崎原爆病院病理部から入手した. 胃の標本は, 胃癌101例, 胃の異型上皮巢(ATP)8例, 胃の過形成性ポリープ15例, 胃潰瘍13例, 胃炎3例, 及び正常胃14例から採取したものである. 甲状腺組織採取には, 慢性甲状腺炎5例, リンパ球性甲状腺炎2例, 濾胞状腺腫12例, 好酸性細胞腺腫2例, Graves病3例, 結節性甲状腺腫2例, 嚢胞1例, 腺腫様甲状腺腫1例及び正常甲状腺1例が使用された. 長崎・広島の放影研で, 剖検例(甲状腺癌74例, 正常甲状腺30例)から同様の甲状腺組織ブロックを入手した.

抗 ras p21 モノクローナル抗体の作製. BALB/c×C57BL/6 F₁ マウスを 2 週間ごとに v-Ki-ras p21 で 4 回免疫した. 最初は v-Ki-ras p21 50 μg 及び完全 Freund アジュバントを皮下投与し, 2 回目には p21 100 μg と不完全 Freund アジュバントを皮下投与した. 3 回目及び 4 回目には, それぞれ 100 μg と 200 μg を腹腔内投与した. 最終免疫の 3 日後に脾臓を摘出し, 脾細胞を前報で述べたように骨髄腫 NS-1 細胞と融合させた. ELISA 及び免疫蛍光(IF) 検定法を用いて, ハイブリドーマ培養液に抗 ras p21 抗体が存在するか否かを調べた. 限界希釈法を 2 ~ 3 回行い, クローン化した.

モノクローナル抗体の精製及びビオチン化. Affigel プロテイン A MAPS-II キット (Bio Rad Lab., USA) を使用して, 腹水からプロテイン A 結合 IgG 抗体を調整した. 抗体をビオチン化するために, 抗体を

lation, antibodies were dialyzed against 0.1 M NaHCO₃ (1 mg/ml) and then mixed with N-hydroxysuccinimide biotin (1 mg/ml of dimethylsulfoxide) at room temperature for four hours.

Enzyme-linked immunosorbent assays. Target protein (50 µg/ml) was fixed to 96-well immunoplates (Nunc, Denmark), and used as the solid phase. Nonspecific binding of antibodies was blocked by incubation for one hour at room temperature with 5% bovine serum albumin (BSA), and then monoclonal antibodies were introduced and the plates were incubated at room temperature for 45 minutes. After blocking again with 5% BSA, goat antimouse Ig conjugated with peroxidase (Medical and Biological Lab. Co., Japan) was introduced as the second antibody. As substrate o-phenylenediamine was used and absorbance at 492 nm was measured with an automatic ELISA reader SLT210 (SLT-Labinstruments, Austria).

For inhibition assay, hybridoma culture supernatant of each clone was added to 96-well immunoplates with Ki-ras p21 as the solid phase and incubated at room temperature for 45 minutes. Biotinylated monoclonal antibodies (5 µg/ml) was then added and incubated for another 45 minutes. After washing nonbinding antibodies, peroxidase-labeled avidin-biotin complexes were added. As substrate o-phenylenediamine was used.

Immunohistochemical staining of tissues. The avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method was employed using Vectastain ABC kits (Vector Labs.). The 4 µm-sections were deparaffinized and immersed in methanol containing 0.3% H₂O₂ for 30 minutes to eliminate endogenous peroxidase activity. The sections were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), normal horse serum was added and the sections were incubated at room temperature for 20 minutes. The slides were then incubated at room temperature for 40 minutes with anti-p21 monoclonal antibody (10 µg/ml). They were then washed with PBS, and incubated at room temperature for 30 minutes after addition of biotinylated horse antimouse Ig antibodies. The slides were then washed with PBS again and incubated with peroxidase-labeled ABCs for 60 minutes. After washing with PBS, the slides were treated with 0.05% diaminobenzidine in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) containing 0.01% H₂O₂ for five minutes, washed and counterstained with

0.1 M NaHCO₃ (1 mg/ml) で透析し、室温で4時間 N-hydroxysuccinimide biotin (ジメチルスルホキシド 1 ml に 1 mg) と混合した。

酵素免疫測定法. 標的蛋白 (50 µg/ml) を96穴の免疫プレート (Nunc, Denmark) に固定し、固相として使用した。5%ウシ血清アルブミン (BSA) を加え、室温で1時間静置し、抗体の非特異的結合を阻害した。次にモノクローナル抗体を添加し、プレートを室温で45分間静置した。5% BSA で非特異的結合を再び阻害した後、ペルオキシダーゼを結合したヤギ抗マウス Ig (医学・生物学研究所, 日本) を2次抗体として加えた。基質として o-phenylenediamine を用い、492 nm での吸光度を自動 ELISA 読取機 SLT210 (SLT-Labinstruments, Austria) で測定した。

阻害試験のために、各クローンのハイブリドーマ培養上澄を、Ki-ras p21 を固相とする96穴の免疫プレートに添加し、室温で45分間静置した。次にビオチン化モノクローナル抗体 (5 µg/ml) を加え、更に45分間静置した。非結合抗体を洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識アビジン-ビオチン複合体を加えた。基質として o-phenylenediamine を用いた。

組織の免疫組織化学的染色. アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法は Vectastain ABC キット (Vector Labs.) を用いて行った。厚さ 4 µm の組織切片を脱パラフィンし、0.3% H₂O₂ を含むメタノールに30分間浸して内因性のペルオキシダーゼ活性を除去した。次にこの切片をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄し、正常ウマ血清を添加し、室温で20分間静置した。この標本スライドに抗 p21 モノクローナル抗体 (10 µg/ml) を加えて室温で40分間静置した。次にこれを PBS で洗浄し、ビオチン化ウマ抗マウス Ig 抗体を添加した後、室温で30分間静置した。その後スライドを PBS で再び洗浄し、ペルオキシダーゼで標識した ABC と共に60分間静置した。PBS で洗浄後、スライドを 0.05% diaminobenzidine 及び 0.01% H₂O₂ を含む 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) で5分間処理し、洗浄後、ヘマトキシリンで核染色

hematoxylin. Monoclonal antibody HPL-2 specific to human platelet was used as control antibody.

Immunoblotting. Extracted protein was separated on 12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel, and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. The membranes were then incubated with monoclonal antibodies at room temperature for one hour. The ABC was used for detection of antibodies by incubation at room temperature for 30 minutes with 4-chloro-1-naphthol as substrate.

RESULTS

Generation of p21 monoclonal antibodies. Culture supernatant of hybridomas prepared as described in the Materials and Methods were screened by ELISA. Hybridomas which gave supernatants that reacted with Ki-ras p21 but not with lysates of *E. coli* without the inserted v-Ki-ras gene were picked up and monoclonal cells were obtained by the limiting dilution two or three times. In this way, 16 hybridoma clones, RASK-1 to RASK-16, were obtained and their anti-p21 specificities were analyzed by ELISA and immunoblotting assays using p21 of the Ki-, N-, and Ha-ras genes. Figure 1 shows examples of immunoblotting assays with three clones of hybridomas and Table 1 summarizes the results obtained by ELISA and immunoblotting assays. The antibody of RASK-1 was specific to Ki-ras p21, whereas those of other 15 clones reacted with the p21s of all members of the *ras* family.

Multiple binding sites of monoclonal antibodies on p21 molecules. Antibody binding inhibition assays were used to determine whether the p21 antibodies of all our clones bound to the same site on p21 molecules. Anti-p21 monoclonal antibodies were biotinylated, and their binding to Ki-ras p21 that had been pretreated with other nonbiotinylated anti-p21 monoclonal antibodies were examined. Table 2 shows the results of inhibition assays with four biotinylated monoclonal antibodies, RASK-3 to RASK-6. Preincubation of p21 on the solid phase with six unlabeled clones, RASK-1 to RASK-6, resulted in inhibitions of the binding of subsequently added biotinylated antibodies in some combinations of antibodies, but not in others. Among the antibodies of the 16 clones, there were at least five groups of clones that bound to mutually distinct sites on p21.

した。ヒト血小板に特異的なモノクローナル抗体 HPL-2 を対照抗体として用いた。

免疫ブロッティング. 抽出した蛋白を12%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲルで分離し、電気泳動法でニトロセルロース膜に移動させた。次にこの膜をモノクローナル抗体と共に室温で1時間静置した。抗体の検出はABC法を用いて、室温で30分間、フィルターを基質の4-chloro-1-naphthol と反応させることにより検出した。

結 果

p21 モノクローナル抗体の産生. 「材料及び方法」での記述どおりに作製したハイブリドーマの培養上澄をELISAでスクリーニングし、Ki-ras p21とは反応するが、v-Ki-ras 遺伝子を組み込まない大腸菌抽出液とは反応しない上澄を有するハイブリドーマを選び、限界希釈法を2~3回行ってモノクローナル細胞を得た。このようにして、RASK-1 から RASK-16まで16個のハイブリドーマクローンを採取し、その抗 p21 特異性を Ki-, N- 及び Ha-ras 遺伝子の p21 を用いて ELISA 及び免疫ブロッティング法で解析した。図1に三つのハイブリドーマクローンをを用いた免疫ブロッティングの例を示し、表1にELISA及び免疫ブロッティング法で得た結果の要約を示した。RASK-1の抗体はKi-ras p21に特異的であるが、他の15個のクローンの抗体はrasファミリーのすべての遺伝子のp21と反応した。

p21 分子上のモノクローナル抗体の多重結合部位。抗体結合阻害試験を用いて、全クローンのp21抗体がp21分子上の同じ部位に結合するかどうかを調べた。抗p21モノクローナル抗体をビオチン化し、他の非ビオチン化抗p21モノクローナル抗体で前処理しておいたKi-ras p21との結合度を調べた。表2は、RASK-3 から RASK-6 までの四つのビオチン化モノクローナル抗体についての阻害試験の結果を示したものである。固相上のp21をRASK-1からRASK-6までの六つの標識していないクローンで前処理した結果、後に添加したビオチン化抗体の結合は幾つかの抗体の組み合わせでは阻害されたが、他の組み合わせでは阻害されなかった。p21に対する結合部位の相違により16個のクローンの抗体を分けると、少なくとも5種類に分けられた。

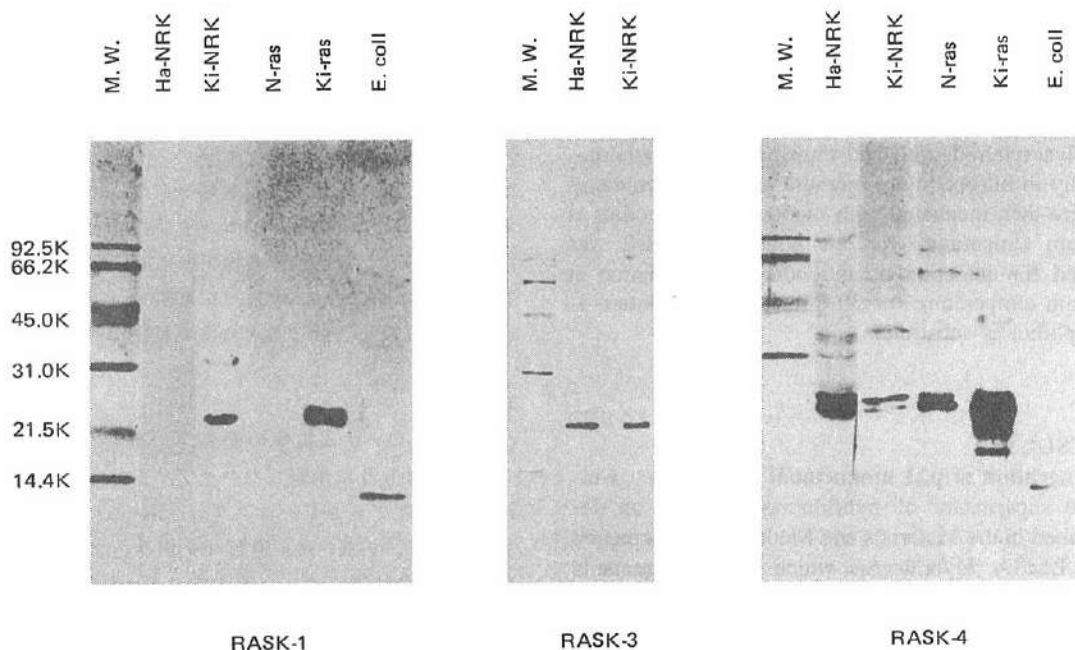


Figure 1. Immunoblotting assays with three anti-p21 monoclonal antibodies, RASK-1, RASK-3, and RASK-4. RASK-1 reacted with Ki-ras p21 but not with N-ras p21, whereas RASK-3 and RASK-4 reacted with the p21s of N-, Ki-, and Ha-ras genes. N-ras, N-ras p21 produced by *E. coli*; Ki-ras, Ki-ras p21 produced by *E. coli*; *E. coli*, extract of *E. coli* with no inserted ras gene; Ha-NRK, extract of rat kidney cells transformed by Harvey murine sarcoma virus; Ki-NRK, extract of rat kidney cells transformed by murine sarcoma virus. The ABC method was used.

図1 3種類の抗p21モノクローナル抗体、RASK-1、RASK-3及びRASK-4を用いた免疫ブロッティング検定。RASK-1はKi-ras p21と反応したが、N-ras p21とは反応しなかった。一方、RASK-3及びRASK-4はN-、Ki-及びHa-ras遺伝子のp21と反応した。N-ras、*E. coli*により産生されたN-ras p21; Ki-ras、*E. coli*により産生されたKi-ras p21; *E. coli*、挿入ras遺伝子を持たない*E. coli*の抽出物; Ha-NRK、Harveyマウス肉腫ウイルスにより形質転換したラット腎臓の細胞抽出物; Ki-NRK、マウス肉腫ウイルスにより形質転換したラット腎臓の細胞抽出物。ABC法を使用した。

TABLE 1 REACTIVITY OF ANTI-p21 MONOCLONAL ANTIBODIES WITH THE ras p21 FAMILY: SUMMARY OF ANALYSES BY ELISA AND IMMUNOBLOTTING ASSAYS

表1 ras p21ファミリーに対する抗p21モノクローナル抗体の反応性: ELISA及び免疫ブロッティング検定による解析の要約

Monoclonal antibody	p21		
	Ki-ras	N-ras	Ha-ras
RASK-1	++	-	-
RASK-2*	++	+	+
RASK-3	++	++	++
RASK-16	++	++	++

*The reactivities of RASK-2 with N-ras p21 and Ha-ras p21 were weaker than that with Ki-ras p21.

N-ras p21及びHa-ras p21に対するRASK-2の反応は、Ki-ras p21に対する反応よりも弱かった。

TABLE 2 BINDING INHIBITION ASSAYS

表2 結合阻害試験

Inhibitor*	Biotinylated Monoclonal Antibody			
	RASK-3	RASK-4	RASK-5	RASK-6
RASK-1	0.6**	0.66	0.78	0.34
RASK-2	0.38	0.53	0.45	0.04
RASK-3	0	0.39	0.44	0.03
RASK-4	0.18	0.19	0	0.03
RASK-5	0.51	0.65	0.08	0.07
RASK-6	0.53	0.60	0.59	0.01
None	0.64	0.70	0.78	0.32

*Nonbiotinylated monoclonal antibodies were preincubated with Ki-*ras* p21.

非ビオチン化モノクローナル抗体と Ki-*ras* p21 を前処理した。

**OD at 492 nm. 492 nm における OD.

Immunohistochemical studies on stomach and thyroid tissues with anti-p21 monoclonal antibodies. The expressions of *ras* p21 in the stomach and thyroid were analyzed immunohistochemically with one of the anti-*ras* p21 monoclonal antibodies, that of RASK-3, which reacts equally to p21 of Ki-, N-, and Ha-*ras* genes.

Expression of p21 in the stomach. Use of wide range of antibody concentration, 10 ng/ml to 100 μ g/ml, was initially attempted for immunohistochemistry. Based on consistency and intensity of reactivities, a concentration of 10 μ g/ml was chosen. Use of lower concentration of antibody sometimes gave inconsistent results and use of higher concentration sometimes gave nonspecific stainings. The expression of p21 was studied in 101 cancer cases and 53 noncancer cases of the stomach. In many cancer tissues, cancer cells gave a strongly positive reaction, whereas morphologically normal epithelial cells scarcely showed any reaction. Parietal cells and intestinal metaplasia, however, often gave a positive reaction, though chief cells and mucous cells gave an essentially negative reaction. Smooth muscle and ganglion cells consistently gave a positive reaction. In individual cells showing a positive staining reaction, the cytoplasm was always diffusely stained. Examples of immunohistochemical staining are shown in Figure 2. In cases of stomach cancer, the expressions of p21 in cancer cells as well as in morphologically normal epithelial

抗 p21 モノクローナル抗体を用いた胃及び甲状腺組織に関する免疫組織化学的検討。Ki-, N-及びHa-*ras* 遺伝子の p21 と等しく反応する抗 *ras* p21 モノクローナル抗体である RASK-3 を用いて、胃及び甲状腺における *ras* p21 の発現を免疫組織化学的に検討した。

胃における p21 の発現。 免疫組織化学的検討のために、10 ng/ml から 100 μ g/ml という広範な抗体濃度についてまず調べた。反応の一貫性及び強度に基づいて、10 μ g/ml の濃度を選択した。これより低い濃度の抗体を用いるとしばしば結果に一貫性が欠如し、これより高い濃度を用いるとしばしば非特異的染色が認められた。胃癌101症例及び非胃癌53症例について p21 の発現を調べた。多くの癌組織において、癌細胞は強い陽性反応を示したが、形態学的に正常な上皮細胞はほとんど反応を示さなかった。壁細胞及び腸上皮化生はしばしば陽性反応を示したが、主細胞及び粘液細胞は主に陰性反応を示した。平滑筋及び神経節細胞は一貫して陽性反応を示した。陽性の染色反応を示す各細胞においては、細胞質が常に広汎に染色されていた。免疫組織化学的染色の例を図2に示した。胃癌症例の場合、癌細胞及び形態学的に正常な上皮細胞における p21 の発現は同一の

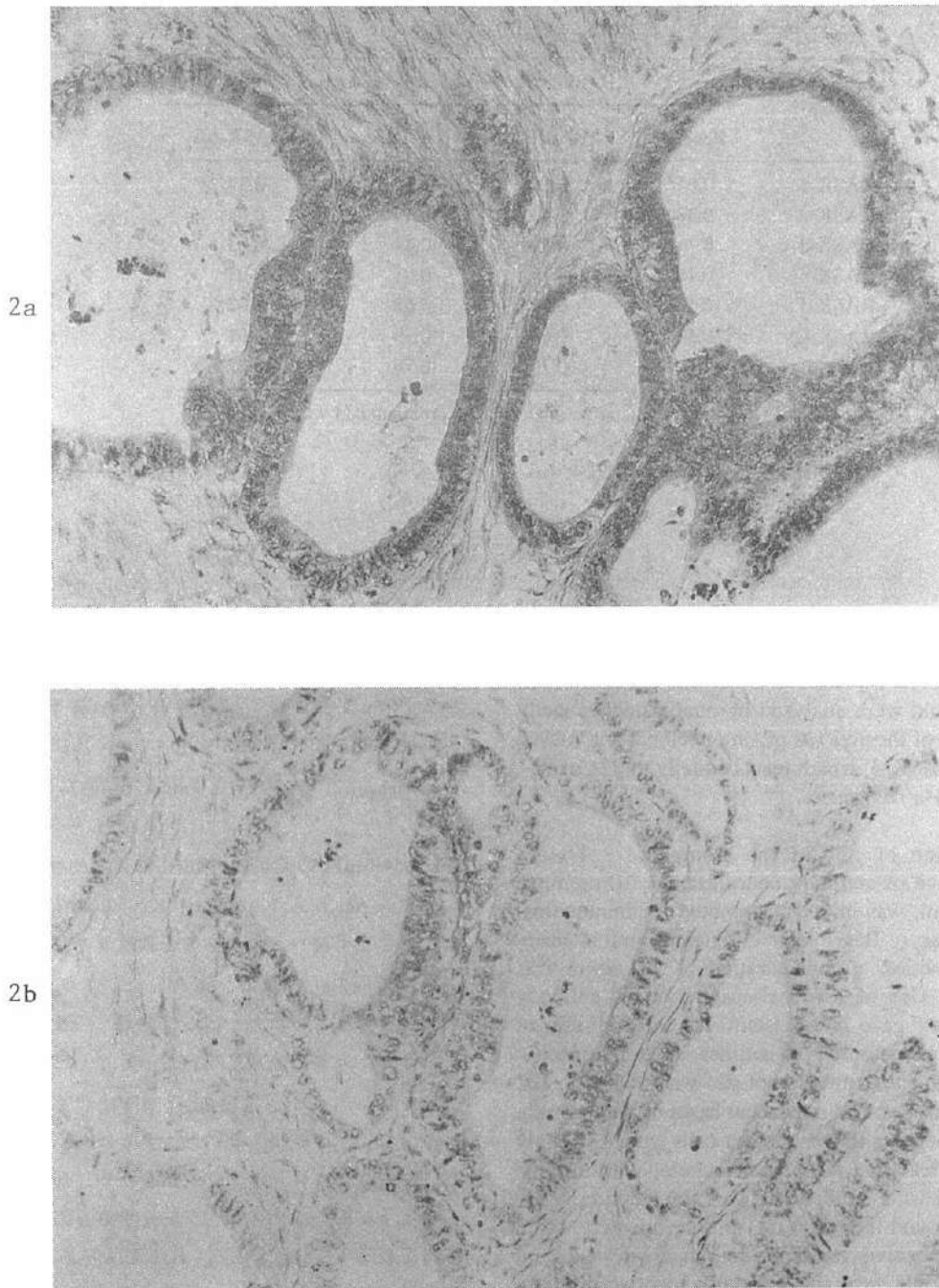


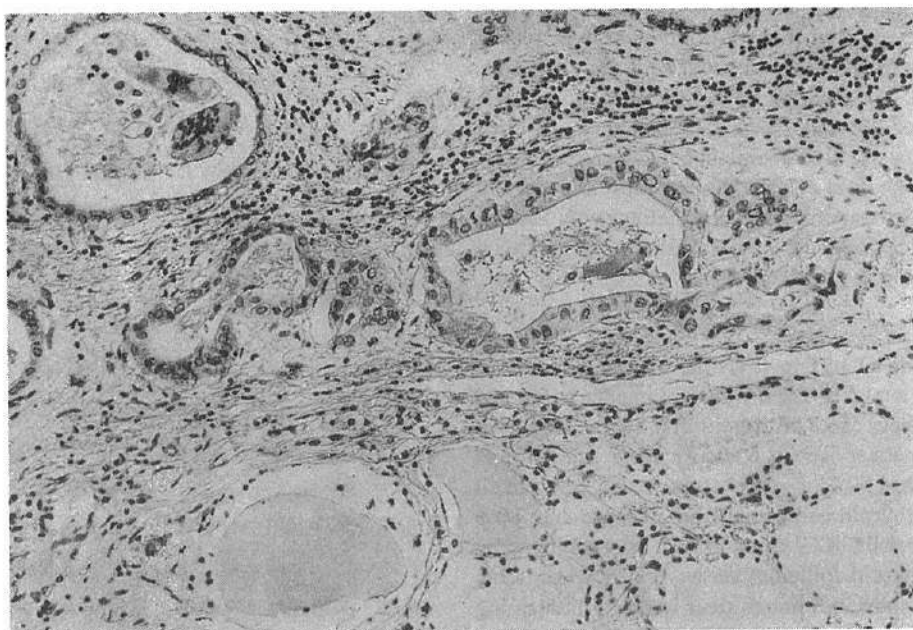
Figure 2. Examples of immunohistochemical staining of stomach and thyroid cancers by the ABC method. Each tissue was examined with RASK-3 and control monoclonal antibody, HPL-2. 2a, stomach cancer (RASK-3); 2b, stomach cancer (HPL-2); 2c, thyroid cancer (RASK-3); 2d, thyroid cancer (HPL-2).

図2 胃癌及び甲状腺癌のABC法による免疫組織化学的染色例、各組織はRASK-3及び対照モノクローナル抗体、HPL-2で調べた。2a、胃癌(RASK-3); 2b、胃癌(HPL-2); 2c、甲状腺癌(RASK-3); 2d、甲状腺癌(HPL-2)。

2c



2d



cells were evaluated on the same slide. The 101 cases were classified into five groups on the basis of the frequency of p21-positive cells to the total cells, and results are summarized in Table 3. More than 80% of the cancer cells in 45 cases, and 50% to 80% of those in 24 cases expressed detectable amount of p21. But in all cases, less than 50% of the morphologically normal cells expressed p21. Staining intensity of these p21-positive epithelial cells was in general weaker than that of cancer cells. In 87 cases (86%), normal epithelial cells were virtually p21-negative. Correlation of p21 expression with histological types of stomach cancer was analyzed (Table 4). In general, expression of p21 seems to be more dominant in more differentiated types of cancer. The detailed distribution of p21-positive cells was studied in two cases of stomach cancer. Totals of 112 and 84 sections for each case were prepared and p21 expression was evaluated. As shown in Figure 3, cancerous areas strongly expressed p21. In regions of normal epithelium, however, there were sparsely clusters of weakly positive normal epithelial cells, and these clusters showed some tendency to surround the cancerous areas.

Expression of p21 was also examined in 53 non-cancer cases of stomach and results are summarized in Table 5. In 7 of 8 cases of atypical hyperplasia, more than 50% of the epithelial cells were positive, and in 2 of 15 cases of hyperplastic polyp, 5% to 50% of the cells were p21 positive. In three cases of gastric ulcer, epithelial cells expressed p21. These three cases of gastric ulcer showed dominant regenerative patterns of the epithelium with healing of the ulcer and the same regenerating epithelial cells were p21 positive.

Expression of p21 in thyroid. The expression of p21 was analyzed for 74 thyroid cancer cases and 59 noncancer cases of thyroid in the same way as in stomach cancer (Tables 6 and 7). Expression of p21 in more than 50% of cancer cells was observed in all cases of thyroid cancer and that in more than 80% of cancer cells in 69 cases (93%). Morphologically normal thyroid follicular cells were, however, also often p21 positive though their intensity of staining was in general weaker than that of cancerous areas. Some cells were also p21 positive in noncancer thyroid though their frequency was less than that in cancer tissue (Table 7).

スライド上で検討した。全細胞に対する p21 陽性細胞の頻度に基づき101例を5群に分類し、結果を表3に要約した。80%以上の癌細胞が検出可能な量の p21 を発現していたのは45例であり、50%～80%の癌細胞が陽性であったのは24例であった。しかし全症例において、形態学的に正常な細胞中 p21 を発現したのは50%未満であった。このような p21 陽性上皮細胞の染色強度は癌細胞の染色強度よりも全般的に弱かった。87例(86%)においては、正常上皮細胞はほぼ p21 陰性であった。p21 の発現と胃癌の組織型との相関関係について検討した(表4)。全般的に見て、高分化型の癌ほど p21 の発現がより顕著なようである。胃癌2症例において、p21 陽性細胞の詳細な分布について検討した。各症例について合計112切片及び84切片を作製し、p21 の発現を評価した。図3に示すように、癌領域が強く p21 を発現した。しかし、正常上皮領域においては、弱い陽性を示す正常上皮細胞集団が散在しており、このような細胞集団は癌領域を取り囲む傾向を示した。

非胃癌53症例についても p21 の発現を調べ、その結果を表5に要約した。異型上皮巢8例中7例において、上皮細胞の50%以上が陽性であり、過形成性ポリープ15例中2例において同細胞の5%～50%が p21 陽性であった。胃潰瘍3例において上皮細胞が p21 を発現した。この3例では、潰瘍の治癒と共に上皮が顕著な再生パターンを示したが、この再生上皮細胞は p21 陽性であった。

甲状腺における p21 の発現。 甲状腺癌74症例及び非甲状腺癌59症例における p21 の発現を胃癌の場合と同様に解析した(表6及び7)。甲状腺癌全例において癌細胞の50%以上に p21 の発現が認められ、そのうち69例(93%)では癌細胞の80%以上に p21 が発現していた。形態学的に正常な甲状腺濾胞細胞については、染色強度は全般的に癌領域よりも弱かったが、しばしば p21 陽性であった。甲状腺良性病変においても幾つかの細胞は p21 陽性であったが、その頻度は癌組織の場合より低かった(表7)。

TABLE 3 EXPRESSION OF p21 IN FORMALIN-FIXED TISSUES OF 101 CANCER CASES OF STOMACH DETERMINED BY THE ABC METHOD

表3 ABC法による胃癌101例のホルマリン固定組織におけるp21の発現度

Tissue	Proportion of p21-positive cells (%)				
	>80	50-80	20-50	5-20	<5
Cancer*	45 (44%)	24 (24%)	14 (14%)	1 (1%)	17 (17%)
Noncancer**	0	0	7 (7%)	7 (7%)	87 (86%)

*Morphologically cancerous parts. 形態学的癌部位.

**Morphologically normal epithelium. 形態学的に正常な上皮.

TABLE 4 EXPRESSION OF *ras* p21 IN STOMACH CANCER: CORRELATION WITH HISTOLOGICAL TYPES OF CANCER表4 胃癌における *ras* p21 の発現: 癌の組織型との相関関係

Histological Type*	No. of Cases	Positive**	Partially Positive***	Negative****
Papillary	10	9 (90%)	1 (10%)	0
Tubular				
Well diff.	11	10 (91%)	1 (9%)	0
Mod. diff.	31	24 (77%)	2 (6%)	5 (16%)
Poorly diff.	37	21 (57%)	7 (19%)	9 (24%)
Mucinous	6	6 (100%)	0	0
Signet ring	6	0	4 (67%)	2 (33%)
Total	101	70	15	16

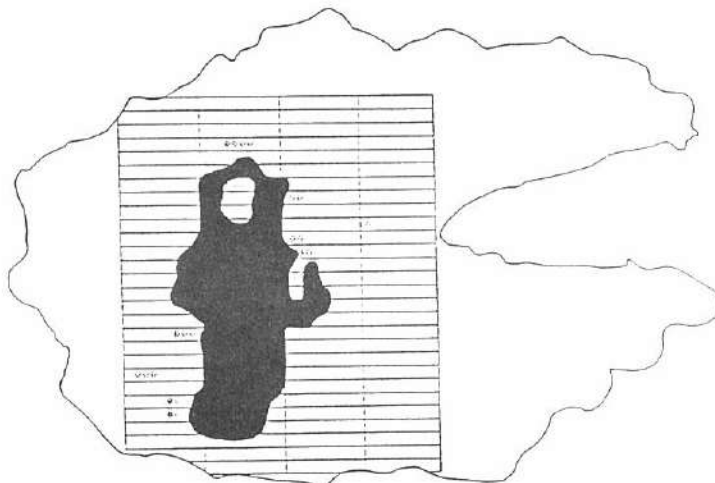
*Based on the criteria of the general rules for the gastric cancer study by Japanese Research Society for Gastric Cancer.¹⁶日本胃癌研究会編胃癌取扱い規約¹⁶に基づく.

**>50% of the cells were p21-positive. 細胞の50%以上がp21陽性.

***5%-50% of the cells were p21-positive. 細胞の5%-50%がp21陽性.

****<5% of the cells were p21-positive. 細胞の5%未満がp21陽性.

3a



3b

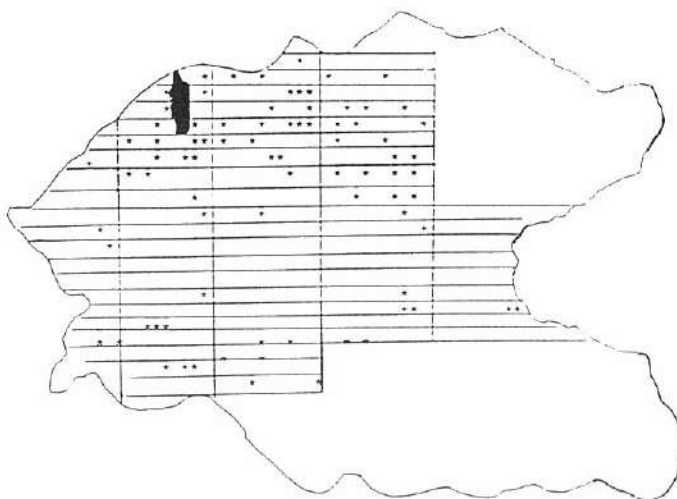


Figure 3. Expression of p21 in cancer stomach. In two cases of stomach cancer, 84 and 112 sections were made for each stomach, and the expression of p21 in all epithelial cells in all sections was examined. RASK-3 was used for the ABC method. Black areas, areas with cancer and strong p21 expression; asterisks, areas with p21-positive normal epithelial cells.

図3 胃癌におけるp21の発現。胃癌2例の各々について、84及び112個の組織切片を作製し、全組織切片におけるすべての上皮細胞でのp21の発現状況を調べた。ABC法ではRASK-3を用いた。黒の領域、癌が存在し、p21発現度の高い領域；星印、p21陽性の正常上皮細胞領域。

TABLE 5 EXPRESSION OF p21 IN FORMALIN-FIXED TISSUES OF 53 NONCANCER CASES OF STOMACH DETERMINED BY THE ABC METHOD

表5 ABC法による非胃癌53症例のホルマリン固定組織におけるp21の発現度

Tissue	No. of cases	Positive*	Partially Positive*	Negative*
Atypical hyperplasia (ATP)	8	7 (88%)	0	1 (13%)
Hyperplastic polyp	15	0	2 (13%)	13 (87%)
Ulcer	13	2 (15%)	1 (8%)	10 (77%)
Gastritis and Others	17	0	3 (18%)	14 (82%)

*As described in Table 4.

表4の記述どおり。

TABLE 6 EXPRESSION OF p21 IN FORMALIN-FIXED TISSUES OF 74 THYROID CANCER CASES DETERMINED BY THE ABC METHOD

表6 ABC法による甲状腺癌74症例のホルマリン固定組織におけるp21の発現

Tissue	Positive Cells (%)				
	>80	50-80	20-50	5-20	<5
Cancer	69 (93%)	5 (7%)	0	0	0
Noncancer*	2 (3%)	6 (8%)	20 (28%)	24 (33%)	20 (28%)

* The total number of cases is 72, because in two cases no noncancerous parts were observed.

2例で非癌部位が認められなかったため、症例総数は72である。

TABLE 7 EXPRESSION OF p21 IN FORMALIN-FIXED TISSUES OF 59 NONCANCER CASES OF THYROID DETERMINED BY THE ABC METHOD

表7 ABC法による非甲状腺癌59例のホルマリン固定組織におけるp21の発現

Tissue	No. of Cases	Positive*	Partially Positive*	Negative*
Adenoma	14	8 (57%)	5 (36%)	1 (7%)
Thyroiditis and Other Goiters	15	4 (27%)	8 (53%)	3 (20%)
No primary disease of the thyroid	30	5 (17%)	19 (63%)	6 (20%)

*As described in Table 4.

表4の記述どおり。

Specificity of immunohistochemical staining. Antibody-binding inhibition assays with biotinylated RASK-3 were used to confirm that tissue staining with RASK-3 was specific. Preincubation of sections with nonbiotinylated RASK-3, but not with control monoclonal antibody HPL-2, reduced the reactivities of biotinylated RASK-3 with stomach and thyroid cancer cells (data not shown).

DISCUSSION

The 16 clones of anti-p21 monoclonal antibodies produced in this work show differences in reactivity; one clone, RASK-1, reacted only with Ki-ras p21, but not with other N-ras or Ha-ras p21, whereas the other 15 clones reacted with p21s of all the Ki-, N-, and Ha-ras gene family. The antibodies produced by these clones were, however, composed of several groups which bound to distinct sites of molecules, and thus the binding of antibody of one clone does not interfere with the binding of others. These characteristics of our antibodies allowed us to examine the expressions of total ras p21 and Ki-ras only, and also to apply multiple antibodies for various serological analyses such as sandwich assays for detection of p21. Since all anti-p21 antibodies could detect p21 in 10% formalin-fixed tissues, we could use them to examine expression of p21 in large numbers and various types of tissues fixed with 10% formalin and embedded in paraffin wax.

In most cases of stomach cancer and in all cases of thyroid cancer, cancer cells were strongly p21 positive. In many cases, a variety of normal cells, such as parietal, smooth muscle, and ganglion cells, and also thyroid follicular cells were also found to express ras p21. However, normal epithelial cells, chief cells, and mucous cells of the stomach were mostly p21 negative. Thor et al¹⁷ reported the similar findings and suggested that many of the cell types with enhanced ras p21 expression have been associated with ion exchange functions and/or produce hormone products which effect ion exchange mechanisms in effector organ to maintain homeostasis within the normal physiologic range. Chesa et al¹⁸ also reported using immunohistochemical analyses with anti-ras p21 monoclonal antibodies that in many cell lineages, well-differentiated cells usually express p21 more than poorly differentiated cells. It was noted by Furth et al¹⁹ that relationship between expression of p21 and maturation of normal cells is different

免疫組織化学的染色の特異性. ビオチン化 RASK-3 を用いた抗体結合阻害試験を行い, RASK-3 による組織染色が特異的であるかどうか検討した. 非ビオチン化 RASK-3 で組織切片を前処理したところ, ビオチン化 RASK-3 と胃及び甲状腺癌細胞との反応は低下したが, 対照モノクローナル抗体 HPL-2 での前処理では反応の低下は起こらなかった(データ示さず).

考 察

本研究で産生された抗 p21 モノクローナル抗体の 16 個のクローンの反応性は異なっている. すなわち, RASK-1 クローンは Ki-ras p21 にのみ反応し, 他の N-ras 又は Ha-ras p21 とは反応しなかったが, その他の 15 個のクローンは Ki-, N-, 及び Ha-ras 遺伝子ファミリーすべての p21 と反応した. しかし, これらのクローンから産生された抗体は p21 分子に対する結合部位が異なる幾つかのグループから成っており, したがって, 一つのクローンの抗体の結合は他の抗体の結合を阻害しない. 我々の抗体にはこれらの特徴があるため, 全 ras の p21 及び Ki-ras のみの発現を調べたり, また, p21 検出のためにサンドイッチ検定など種々の血清学的検定に幾つかのクローンの抗体を同時に用いることも可能であった. すべての抗 p21 抗体が 10%ホルマリン固定組織中の p21 を検出できたので, それらを用いて, 10%ホルマリンで固定され, パラフィンワックスに包埋された多数の種々の組織における p21 の発現を調べることができた.

胃癌症例の大部分並びに甲状腺癌全症例において癌細胞は強い p21 陽性を示した. 多くの症例において, 壁細胞, 平滑筋細胞及び神経節細胞等の種々の正常細胞並びに甲状腺濾胞細胞も ras p21 を発現することがわかった. しかし, 胃の正常上皮細胞, 主細胞及び粘液細胞はほぼ p21 陰性であった. Thor ら¹⁷ は同様の所見を報告し, ras p21 の発現亢進がみられる細胞型の多くはイオン交換機能と関連しているか, 若しくは, 正常な生理的領域内に恒常性を維持するためのエフェクター器官におけるイオン交換機序に影響を与えるホルモンを産生することを示唆した. Chesa ら¹⁸ も, 抗 ras p21 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的解析を行い, 多くの細胞系において, 高分化細胞の方が低分化細胞よりも通常 p21 を多く発現すると報告した. Furth ら¹⁹ は p21 の発現と正常細胞の成熟度との関係が細胞系間で異なることを指摘し, p21 が細胞増殖と特定の細胞機能

among the cell lineages, suggesting that p21 has a role in both cellular proliferation and certain specialized cellular functions. The p21 is known to have GTP-binding capacity and thus might be related to cellular regulation of adenylyl cyclase like other members of the G protein family.²⁰⁻²² In highly differentiated cells with specified functions, p21 may be dominantly expressed because it participated in critical cellular functions.

A crucial question is whether dominance of p21 expression in cancer cells is a consequence of cellular transformation. In stomach cancer, expression of p21 was apparently higher in cancer cells than in normal epithelial cells. This tendency was marked in moderately to well-differentiated cancers. Similar results were reported by Noguchi et al.²³ who studied 96 cases of stomach cancer with anti-p21 monoclonal antibody, RAP-5, produced by Hand et al.⁹ The results, however, were not necessarily confirmed by Ohuchi et al.²⁴ who analyzed 44 cases of stomach cancer with the same RAP-5 antibodies. They observed essentially no correlation of histological types of stomach cancer with p21 expression by immunohistochemical analyses, and the observation was also confirmed by direct-binding liquid competitive radioimmunoassay and in situ hybridization. Reasons for this discrepancy are unclear. Possibilities may include differences of races for sample donors, methodologies, way of evaluation, and also antibodies. In situ hybridization to clarify this issue is ongoing in our laboratory.

Moderately to well-differentiated types of stomach cancer have been considered to originate from epithelial cells of the stomach. There is also circumstantial evidence that these types of cancer may appear via intestinal metaplasia.²⁵⁻²⁷ Interestingly, our analyses showed that p21 expression is marked in moderately to well-differentiated cancer, intestinal metaplasia, and atypical hyperplasia, but not in normal epithelial cells or hyperplastic polyps, a part of which was also the case in the report by Ohuchi et al.²⁴ These results may indicate that expression of p21 in epithelial cells of the stomach has increased as a consequence of cellular changes to premalignant status such as intestinal metaplasia and atypical hyperplasia. Alternatively, all these p21-positive gastric epithelial cells share morphological and other cellular characteristics with p21-positive epithelial cells of the intestine, as shown in Figure 4. From the pattern of p21 distribution observed

の両方に関与していることを示唆した。p21はGTP結合能を有することが知られており、したがって、Gプロテイン系の他の蛋白と同様アデニル酸シクラーゼの細胞性調節と関連している可能性がある。²⁰⁻²² p21は重要な細胞機能に関与しているので、特定の機能を有する高分化細胞に主に発現すると考えられる。

重要な問題は、p21が癌細胞に主に発現するのは細胞の形質転換の結果であるか否かということである。胃癌においては、p21の発現は正常上皮細胞よりも癌細胞に明らかに多く認められた。この傾向は中分化～高分化型癌に顕著であった。Handら⁹により産生された抗p21モノクローナル抗体、RAP-5を用いて胃癌96例の検討を行った野口ら²³も同様の結果を報告した。しかし、同じRAP-5抗体を用いて胃癌44例を解析した大内ら²⁴は、この結果を必ずしも確認してはいない。大内らは、免疫組織化学的解析により、胃癌の組織型とp21の発現の間に基本的には相関関係を認めなかった。この観察結果は直接的結合液体競合ラジオイムノアッセイ及びin situ hybridizationによっても確認された。この不一致の原因は不明であるが、考えられるものとしては、標本供与者の人種、検定方法、評価方法及び抗体における差異などが挙げられる。この問題を解明するため、当研究室でin situ hybridizationを実施中である。

中分化～高分化型胃癌は胃上皮に由来すると考えられてきた。また、この種の癌が腸上皮化生から生ずることを示す情況証拠もある。²⁵⁻²⁷興味深いことに、我々の解析によれば、p21の発現は中分化～高分化型癌、腸上皮化生及び異型上皮巢に顕著であるが、正常上皮細胞または過形成ポリープには顕著ではなかった。このような所見の一部は大内ら²⁴の報告にも認められた。これらの結果は、腸上皮化生及び異型上皮巢等のような前癌状態への細胞の変化の結果、胃上皮細胞におけるp21の発現が増加することを示唆していると考えられる。換言すれば、図4に示すごとく、これらp21陽性胃上皮細胞はすべて腸のp21陽性上皮細胞と同様の形態学的及びその他の細胞学的特徴を示す。本研究で観察されたp21の

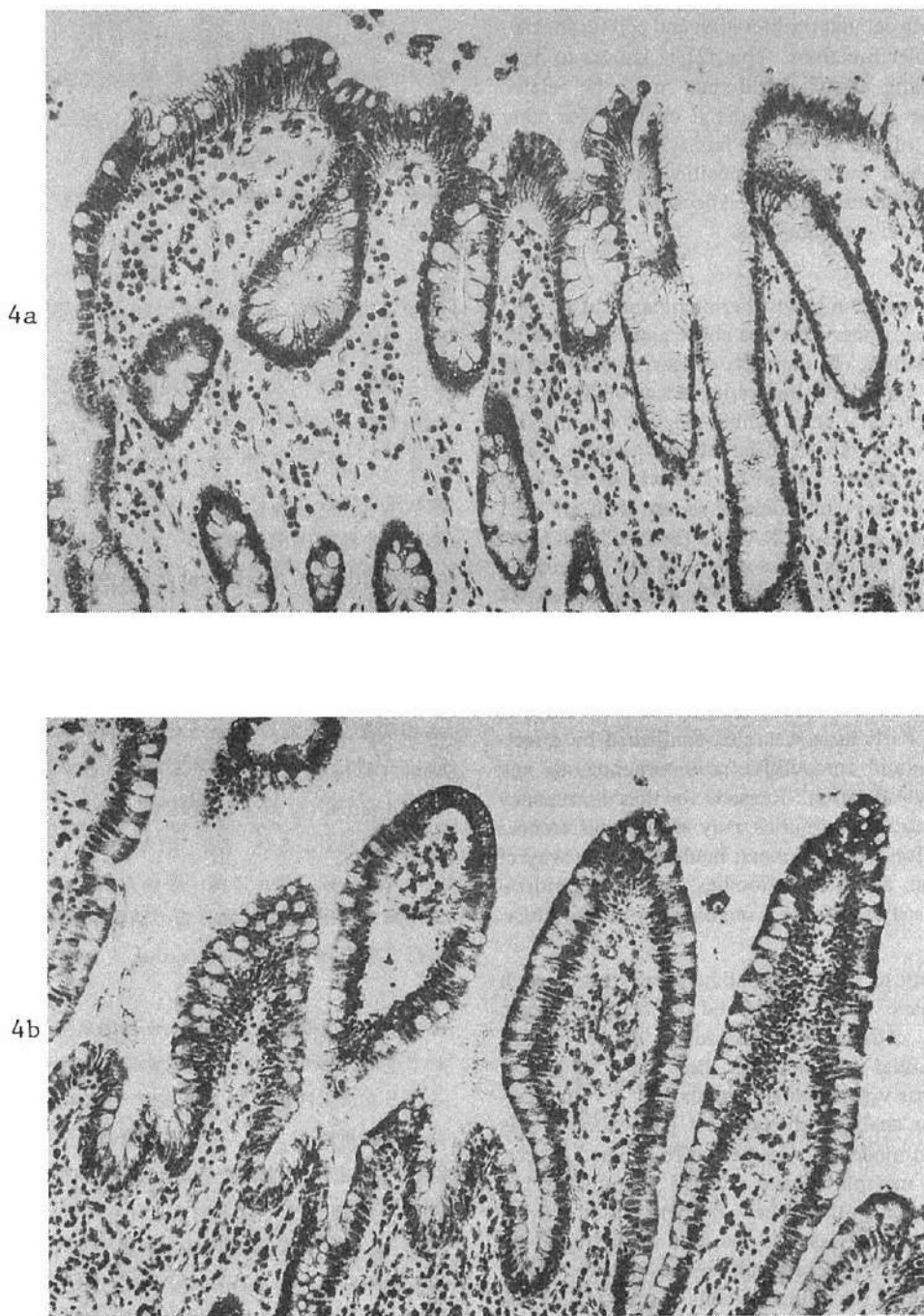


Figure 4. Expression of p21 in intestinal metaplasia and intestinal epithelial cells. RASK-3 was used for the ABC method. 4a, intestinal metaplasia; 4b, epithelial cells of normal intestine.

図4 腸上皮化生及び腸上皮細胞におけるp21の発現。ABC法ではRASK-3を用いた。4a, 腸上皮化生; 4b, 正常な腸の上皮細胞。

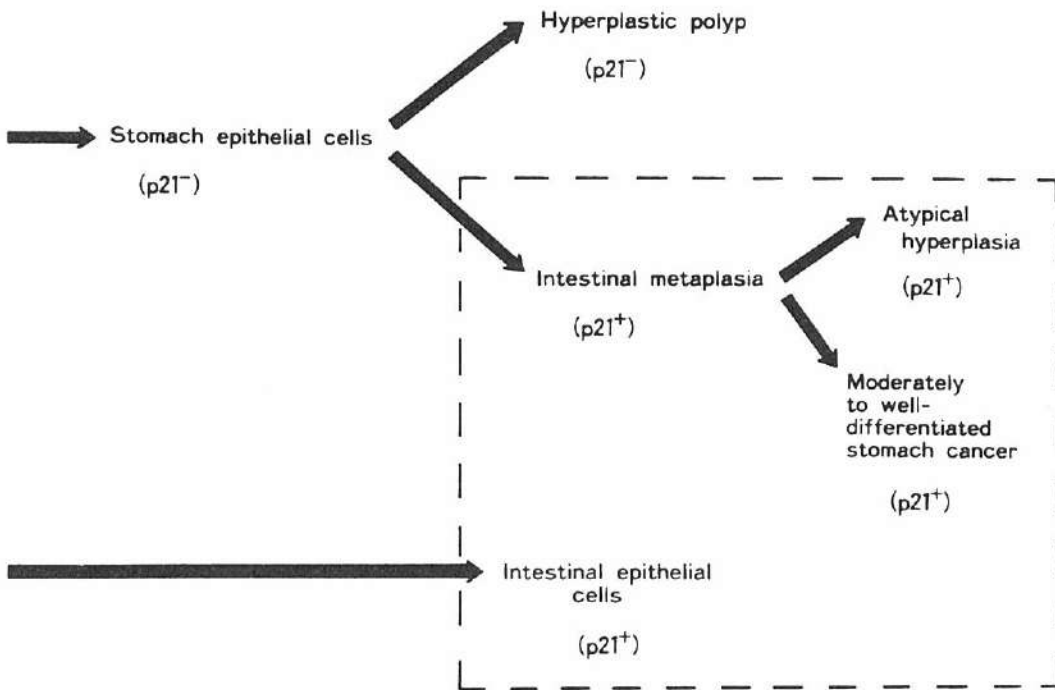


Figure 5. Pathways of cellular changes and expression of p21.

図5 細胞の変化及び p21 発現の経路.

in the present study we may illustrate pathways of cellular changes as shown in Figure 5. If this were the case, moderately to well-differentiated cancer, atypical hyperplasia, and intestinal metaplasia start to express p21 as a consequence of their metaplastic changes to intestinal epithelial cells. Expression of p21 by these differentiated cancers is therefore preexistent to cytological transformation. This interpretation may support the view of Chesa et al¹⁸ that p21 is related to cellular differentiation rather than to the maintenance of transformed phenotypes.

Reservations are necessary in the interpretations of other types of stomach cancer and thyroid cancer in the same way. Our monoclonal antibodies reacted with products of both protooncogenes and activated genes. The pattern of p21 expression by activated *ras* genes might be unique and different from that by protooncogenes, which cannot be distinguished with currently available anti-p21 monoclonal antibodies including ours.

Detailed analysis showed no dominant clustering of p21-positive normal epithelial cells. Cells showing

分布パターンに基づいて、図5のように細胞性変化の経路を図示できる。この図が正しいとすれば、中分化～高分化型癌、異型上皮葉及び腸上皮化生は、腸上皮細胞への化生性変化の結果 p21 を発現し始めることになる。したがって、これらの分化型癌による p21 の発現は、細胞学的形質転換より以前に生ずる。この解釈は、p21 が形質転換した表現型の維持より、むしろ細胞分化と関連しているとする Chesa ら¹⁸ の見解を支持するものであろう。

他の病型の胃癌及び甲状腺癌を同様に解釈することは控えなければならない。我々のモノクローナル抗体は原癌遺伝子と活性化遺伝子の両方の産物と反応した。活性化 *ras* 遺伝子による p21 の発現パターンは、原癌遺伝子によるものとは異なり独特なものかもしれないが、我々の抗体を含め、現在利用可能な抗 p21 モノクローナル抗体では鑑別できない。

詳細な解析を行っても、p21 陽性正常上皮細胞の大きな集団は認められなかった。p21 を弱く発現している

weak expression of p21 seemed to surround cancerous areas, though the reason for this is unknown.

There are reports on p21 expression observed by the immunohistochemical staining in cancers of the colon,^{9,28-30} mammary gland,^{9,17,31} prostate,³² urinary bladder,³³ thyroid,³⁴ and stomach.^{23,24} In general, expression of p21 in cancer cells was found to be greater than that in benign or normal cells. There are, however, reports of no significant difference between the expressions of p21 in cancer cells and normal cells in the colon.^{29,30} These results and ours suggest that precaution is required in the use of p21 as a cancer marker.

Thus we conclude that further investigations are needed on greater numbers and types of tissues with antibodies that are specific for the Ki-, N-, and Ha-*ras* gene products, respectively, and for point mutation sites of the proteins.

細胞が癌領域を取り囲んでいるように思われたが、その理由は不明である。

結腸癌,^{9,28-30} 乳癌,^{9,17,31} 前立腺癌,³² 膀胱癌,³³ 甲状腺癌³⁴ 及び胃癌^{23,24} において、免疫組織化学的染色によって p21 の発現が観察され、報告されている。全体的に見て、癌細胞における p21 の発現頻度は良性又は正常細胞の場合より高かった。しかし、結腸については、癌細胞と正常細胞の p21 発現に有意差はないとする報告がある。^{29,30} これらの研究結果及び我々の結果を考慮すると、p21 を癌マーカーとして使用する際には注意が必要である。

したがって、著者らは Ki-, N- 及び Ha-*ras* 遺伝子産物のそれぞれに特異的な抗体、並びに各蛋白の点突然変異部位に特異的な抗体で、多くの様々な組織について更に検討しなければならないと結論する。

REFERENCES

参考文献

1. DER CJ, KRONTIRIS TG, COOPER GM: Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3637-40, 1982
2. SHIMIZU K, GOLDFARB M, SUARD Y, PERUCHO M, LI Y, KAMATA T, FERAMISCO J, STAVNEZER E, FOGH J, WIGLER MH: Three human transforming genes are related to the viral *ras* oncogenes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2112-6, 1983
3. SCHWAB M, ALITALO K, VARMUS HE, BISHOP JM: A cellular oncogene (*c-Ki-ras*) is amplified, overexpressed and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumor cells. *Nature* 303:497-501, 1983
4. CHANG EH, FURTH ME, SCOLNICK EM, LOWY DR: Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297:479-83, 1982
5. DeBORTOLI ME, ABOU-LSSA H, HALEY BE, CHO-CHUNG YS: Amplified expression of p21 *ras* protein in hormone-dependent mammary carcinomas of humans and rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 127:699-706, 1985
6. TABIN CJ, BRADLEY SM, BARGMANN CL, WEINBERG RA, PAPAGEORGE AG, SCOLNICK EM, DHAR R, LOWY DR, CHANG EH: Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300:143-9, 1982
7. REDDY EP, REYNOLDS RK, SANTOS E, BARBACID M: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties of the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300:149-52, 1982

8. TAPAROWSKY E, SUARD Y, FASANO O, SHIMIZU K, GOLDFARB M, WIGLER M: Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 300:762-5, 1982
9. HAND PH, THOR A, WUNDERLICH D, MURARO R, CARUSO A, SCHLOM J: Monoclonal antibodies of predefined specificity detect activated *ras* gene expression in human mammary and colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5227-31, 1984
10. FURTH ME, DAVIS LJ, FLEURDELYS B, SCOLNICK EM: Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the cellular *ras* gene family. *J Virol* 43:294-304, 1982
11. KUZUMAKI N, ODA A, YAMAGIWA S, TANIGUCHI N, KOBAYASHI H, OIKAWA T: Establishment of four mouse hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies reactive with *ras* oncogene product p21. *JNCI* 77:1273-9, 1986
12. TAMAOKI T, MIZUKAMI T, PERUCHO M, NAKANO H: Expression of intact Ki-*ras* p21 protein in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 132:126-33, 1985
13. MATSUI T, HIRANO M, NOE T, YAMADA K, KUROSAWA Y: Production of chimeric protein of human N-*ras* and v-Ha-*ras* in *Escherichia coli*. *Gene* 52:215-23, 1987
14. TANAKA T, SLAMAN DJ, BATTIFORA H, CLINE MJ: Expression of p21 *ras* oncoproteins in human cancers. *Cancer Res* 46:1465-70, 1986
15. KATO K, NAOE T, HIRAIWA A, NAMIKAWA R, SUZUKI S, YAMADA K, SHIKU H: Production and analysis of HHI10 monoclonal antibodies reactive to immature hematopoietic cells and their use for monitoring acute leukemia cells. *Gann* 76:524-31, 1985
16. JAPANESE RESEARCH SOCIETY FOR GASTRIC CANCER: The General Rules for the Gastric Cancer Study, Ed 11. Tokyo, Kanehara Publ Co, 1985. pp 46-57
17. THOR A, OHUCHI N, HAND PH, CALLAHAN R, WEEKS MO, THEILLET C, LIDEREAU R, ESCOT C, PAGE DL, VILASI V, SCHLOM J: Biology of disease *ras* gene alterations and enhanced levels of *ras* p21 expression in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. *Lab Invest* 55:603-15, 1986
18. CHESA PG, RETTIG WJ, MELAMED MR, OLD LJ, NIMAN HL: Expression of p21^{ras} in normal and malignant human tissues: Lack of association with proliferation and malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3234-8, 1987
19. FURTH ME, ALDRICH TH, CORDON-CARDO C: Expression of *ras* proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene* 1:47-58, 1987
20. BISHOP JM: Viral oncogenes. *Cell* 42:23-38, 1985
21. SHIH TY, PAPAGEORGE AG, STOKES PE, WEEKS MO, SCOLNICK EM: Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21^{src} protein of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 287:686-91, 1980
22. SWEET RW, YOKOYAMA S, KAMATA T, FERAMISCO JR, ROSENBERG M, GROSS M: The product of *ras* is GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 311:273-5, 1984
23. NOGUCHI M, HIROHASHI S, SHIMOSATO Y, THOR A, SCHLOM J, TSUNOKAWA Y, TERADA M, SUGIMURA T: Histologic demonstration of antigens reactive with anti-p21 *ras* monoclonal antibody (RAP-5) in human stomach cancers. *JNCI* 77:379-85, 1986
24. OHUCHI N, HAND PH, MERLO G, FUJITA J, MARIANI-COSTANTINI R, THOR A, NOSE M, CALLAHAN R, SCHLOM J: Enhanced expression of c-Ha-*ras* p21 in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. *Cancer Res* 47:1413-20, 1987

25. PAGNINI CA, RUGGE M: Gastric cancer; problems in histogenesis. *Histopathology* 7:699-706, 1983
26. SUGIMURA T, MATSUKURA N, SATO S: Intestinal metaplasia of the stomach as a precancerous stage. *IARC Sci Publ* 39:515-30,1982
27. IIDA F, KUSAMA J: Gastric carcinoma and intestinal metaplasia. Significance of types of intestinal metaplasia upon development of gastric carcinoma. *Cancer* 50:2854-8, 1982
28. THOR A, HAND PH, WUNDERLICH D, CARUSO A, MURARO R, SCHLOM J: Monoclonal antibodies define differential *ras* gene expression in malignant and benign colonic diseases. *Nature* 311:562-5, 1984
29. KERR IB, LEE FD, QUINTANILLA M, BALMAIN A: Immunocytochemical demonstration of p21 *ras* family oncogene product in normal mucosa and in premalignant and malignant tumours of the colorectum. *Br J Cancer* 52:695-700, 1985
30. WILLIAMS ARW, PIRIS J, SPANDIDOS DA, WYLLIE AH: Immunohistochemical detection of the *ras* oncogene p21 product in an experimental tumor and in human colorectal neoplasms. *Br J Cancer* 52:687-93, 1985
31. OHUCHI N, THOR A, PAGE DL, HAND PH, HALTER SA, SCHLOM J: Expression of the 21000 molecular weight *ras* protein in a spectrum of benign and malignant human mammary tissues. *Cancer Res* 46:2511-9, 1986
32. VIOLA MV, FROMOWITZ F, ORAVEZ S, DEB S, FINKEL G, LUNDY J, HAND PH, THOR A, SCHLOM J: Expression of *ras* oncogene p21 in prostate cancer. *N Engl J Med* 314:133-7, 1986
33. VIOLA MV, FROMOWITZ F, ORAVEZ S, DEB S, SCHLOM J: *Ras* oncogene p21 expression is increased in premalignant lesions and high grade bladder carcinoma. *J Exp Med* 161:1213-8, 1985
34. JOHNSON TL, LLOYD RV, THOR A: Expression of *ras* oncogene p21 antigen in normal and proliferative thyroid tissues. *Am J Pathol* 127:60-5, 1987