

マイクロサテライトを利用した LOH Assay

癌関連遺伝子の機能解析が広く実施され、癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化が観察されています。癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活化は一次構造変化を伴う遺伝子変異と一次構造変化を伴わないエピジェネティックな変化に起因することが明らかになってきています。

遺伝子変異には塩基置換、Microsatellite Instability（マイクロサテライト不安定性）、遺伝子の欠失などがあります。エピジェネティックな変化としてはDNAのメチル化が代表的なものになります。

LOH（Loss of Heterozygosity）とは、ゲノムの一次構造が変異を起こした結果起こる一方の対立遺伝子（アリル）しか持っていないヘテロ接合性の消失を示します。LOH Assayは癌組織でその相関性が認められるようになり、癌遺伝子や癌抑制遺伝子に相関するマイクロサテライトマーカーを観察するフラグメント解析が利用されています。

マイクロサテライトを利用したLOH Assayは、マイクロサテライト領域を蛍光標識したプライマーセットで増幅し、同一個体の正常細胞と腫瘍細胞から抽出したDNAを客観的に比較観察する方法です。

LOHは RER(replication error)と同じ腫瘍のタイプにしばしば現れるため、LOH スクリーニングはRERスクリーニングと共に行う必要があります。RERと判定された場合はLOHの判定することが困難です。またホルマリン処理したり、パラフィン処理されたりした組織からの高品質のDNAの抽出は困難なため、判定を困難にする場合があります。

この資料は GeneScan® Reference Guide Chemistry Reference for the ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (P/N4303189B) 第 8、9 章を参考に記載されています。

マーカーの選択と蛍光標識プライマーの準備

ターゲットとする遺伝子近傍のマイクロサテライトマーカーを選択し、蛍光標識プライマーを準備します。蛍光色素はプライマーセットの一方に標識を行い、6-FAM™、VIC®、NED™、PET® から選択します。2塩基以上のリピートを増幅する場合はテイルドプライマーを選択してください。

1つのマーカーがホモ接合体として検出された場合でも、隣接したマーカーがヘテロ接合体として検出されることがあります。

注意事項：NCBI 等で検索されるマイクロサテライトマーカーの Primer 配列は Caucasian の配列が採用されていることが多く、別の人種では増幅しない場合もあります。

サンプル準備

各個体から 2 種類の DNA サンプルを準備します。各サンプルの (N)、(T) は独立した泳動を実行します。

(N) : 正常な組織から抽出されたもの

(T) : 腫瘍組織から抽出されたもの

注意事項 : 腫瘍組織サンプルには、正常な組織が混入することを考慮する必要があります。

PCR Amplification

ここで示されたプロトコルは、LOH/RER 分析のために最適化された Microsatellite RER/LOH Assay プロトコルを使います。これらの分析を熟知するためには便利な方法です。

Preparing PCR Samples

DNA は 10 ng/ μ L に調整します。

各マーカーは別々に PCR 増幅します。そのため、正常サンプルと腫瘍サンプル用の各マーカー分だけ PCR 反応チューブを用意します。例えば 5 個体を 5 マーカー分析する場合は 50 本の PCR 反応チューブを用意します。以下に PCR 試薬調整プロトコルを示します。

Table 1 : PCR 試薬調整プロトコル

Reaction Component	Volume(μ L) (20 μ L rxn)
DNA (10 ng/ μ L)	2.50
PCR Primer Mix (5 μ M each primer)	1.50
10X GeneAmp [®] PCR Buffer II	2.00
GeneAmp [®] dNTP Mix (2 mM each dNTP)	2.50
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase (5 U/ μ L)	0.16
MgCl ₂ (25 mM)	2.00
Distilled, deionized H ₂ O	11.34

Thermal Cycler セットアップ

GeneAmp[®] 9700 PCR System (9600 Emulation Mode) のために最適化されサイクリングコンディションを示します。他の装置では最適化を必要です。

Table 2 : Samples Isolated from Fresh or Frozen Tissue

活性化 Step	30 cycle			Final Step
	Melt	Anneal	Extend	
95°C	96°C	55°C	70°C	70°C
10分	10秒	30秒	3分	30分

注意事項:各マーカーを別々に増幅することで、特異性を高めることができます。パラフィン処理された組織から抽出したDNAは、新鮮あるいは凍結保存組織から抽出したDNAより増幅が悪いため、サイクル数を 45 サイクルに変更します。

Pool the Markers

同じDNAで反応したものは、条件が整えば別々にPCR増幅したマーカーをMixして泳動することが出来ます。この操作を Pooling と呼びます。

Pooling が可能な条件

- ・ 異なる蛍光色素で増幅している。
- ・ 同じ色素の場合、互いの増幅サイズ範囲が重複しない。
- ・ 増幅効率を考慮できる十分な増幅を得ている。増幅効率はパラフィン処理された組織から場合と、新鮮あるいは凍結保存組織から抽出した場合では異なるため、それぞれの増幅を確認しておきます。

Optimizing Pooling Ratios

予想したより増減する場合もありますが、マーカーごとに蛍光強度を確認します。

蛍光強度があまりにも高い、もしくは、低い場合：

各マーカーを単独で泳動しそれぞれの傾向強度を比較します。Peak Heightは約 500–1000 RFU（蛍光シグナル強度）が理想的です。それぞれのマーカーが何倍に希釈すると理想のPeak Height値になるか確認します。それぞれの希釈倍率になるようにPCR産物を混合します。

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer セットアップ

PCR増幅サンプルは、GeneScan® システム LIZ® 蛍光 Size Standardを各サンプルに加え、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer を用いて変性系の電気泳動を行います。

増幅確認の電気泳動を実施する場合はPCR産物の一部を10倍希釈してから調整します。

サンプル調整

PoolingしたPCR産物 1.0 ul

サイズスタンダード(LIZ) 0.5 ul

Hi-Di™ Formamide 24 ul

調整したサンプルは95°C, 2分加熱し、氷中に5分間置いてからSample Trayにセットします。

電気泳動

Sample Tray を AutoSampeler にセットします。

Sample Sheet の Sample Name には同じ検体由来のDNAであることが分かるように名前を入力します。

Run Module は GS_STR_POP4(1mL)G5v2.md5 を選択します。

Analyzing LOH Data

電気泳動結果として得られたデータ（サンプルファイル）は、GeneMapper® ソフトウェアを用いて分析します。GeneMapper® ソフトウェアでの分析方法はGeneMapper® ソフトウェア v4.0 LOH解析 Getting Start Guide (P/N JP657) をご参照下さい。

予備データ分析

正常組織から得たサンプルについて分析します。

解析のポイント

各マーカーの検出範囲の確認：Panel 情報に反映させる必要があります

各サンプルにおいて対立遺伝子型（アレルタイプ）の確認：ホモ接合体

LOH 解析

予備データ分析で設定した Panel を用いて（N）、（T）ともに解析します。

Calculate the LOH Value

LOH は、数学的に次のとおり定義されます：

$$\text{LOH 値} = \frac{\frac{(\text{Height of Normal allele 2})}{(\text{Height of Normal allele 1})}}{\frac{(\text{Height of Tumor allele 2})}{(\text{Height of Tumor allele 1})}}$$

この場合 LOH 値 0.5 以下は腫瘍組織において長い方のアレルが約 50% 消失している可能性を示します。また LOH 値 1.5 以上は腫瘍組織において短い方のアレルが約 50% 損失している可能性を示します。

腫瘍組織では正常組織の混入が予測されるため、判定基準を変える必要があります。

注意事項：（N）サンプルにおけるアレルタイプが同型のホモ接合体である場合はそのマーカーにおいては LOH を検証することは出来ません。必要な場合はヘテロ接合体を示すマーカーに変更します。

解析例

TP53-penta（p53 遺伝子の近くに位置している）例を示します。

図 1 では上段の electropherogram は正常な組織サンプル、下段の electropherogram は腫瘍組織サンプルを示しています。ピークに付した数値は Peak height を示しています。

$$\text{LOH} = (1343 / 1723) / (2315 / 480) = (0.2073 / 1.283) = 0.162$$

LOH 値 0.162 は、腫瘍サンプルにおいて heterozygosity の消失を明瞭に示しています。

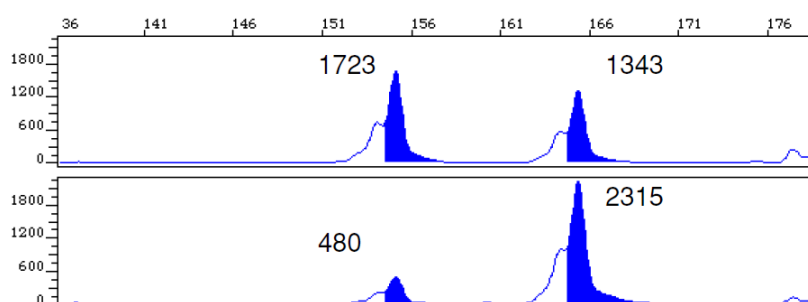


図 1 Example of LOH at TP53-penta

Peak Height vs. Peak Area

ここでは信頼できる測定基準として Peak Height を採用しています。Peak Area を用いて同様の結果を得ることも可能です (e.g., Canzian et al., 1996; Cawkwell et al., 1993)。

Preferential Amplification

アレルが 10 塩基以上のサイズで異なる時、長いアレルと比較し、短いアレルが優先的に PCR 増幅されていることを観察することがあります (Walsh et al., 1992)。パラフィン処理した組織から抽出された DNA や低いコピー数 DNA と増幅する場合にも同じような現象が認められます。優先的増幅が認められた場合 LOH 値が不正確な判定になることに注意が必要です。

図 2 は、マーカー D5S346 の優先増幅の electropherogram 例を示します。

上段は正常組織サンプル、下段は腫瘍組織サンプルにおいて、124bp のピーク高さは、110bp のそれより非常に少ない現象が認められます。

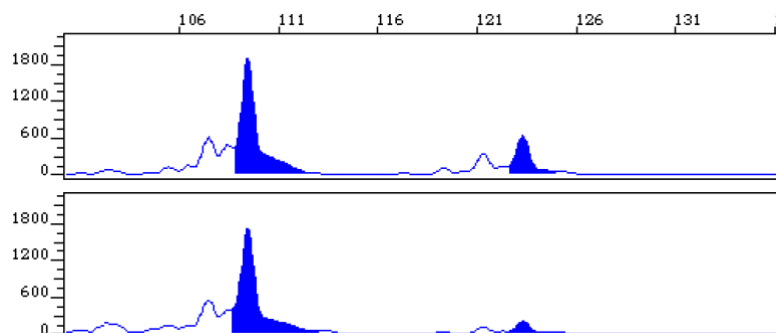


図 2 Example of preferential amplification of the shorter PCR product at D5S346

Reference

- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S. et al. 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812–816.
- Bacher JW, Flanagan LA, Smalley RL, et al. 2004. Development of a fluorescent multiplex assay for detection of MSI-High tumors. *Dis Markers*; 20(4–5):237–50.
- Bookstein, R., Levy, A., MacGrogan, D., Lewis, T.B. et al. 1994. Yeast artificial chromosome and radiation hybrid map of loci in chromosome band 8p22, a common region of allelic loss in multiple human cancers. *Genomics* 24: 317–323.
- Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L. et al. 1991. Identification of the hepatocyte growth factors the c-met proto-oncogene product. *Science* 251: 802–804.
- Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T. et al. 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homolog hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368: 258–261.
- Canzian, F., Salovaara, R., Hemminki, A., Kristo, P., Chadwick, R.B., Aaltonen, L.A., and de la Chapelle, A. 1996. Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res.* 56: 3331–3337.
- Cawkwell, L., Lewis, F.A., and Quirke, P. 1994. Frequency of allele loss of DCC, p53, WT1, NF1, NM23 and APC/MCC in colorectal cancer assayed by fluorescent multiplex polymerase chain reaction. *Br. J. Cancer* 70: 813–818.
- Cawkwell, L., Bell, S.M., Lewis, F.A., Dixon, M.F., Taylor, G.R., and Quirke, P. 1993. Rapid detection of allele loss in colorectal tumors using microsatellites and fluorescent DNA technology. *Br. J. Cancer* 67: 1262–1267.
- Chuaqui, R.F., Sanz-Ortega, J., Vocke, C. et al. 1995. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 8 in male breast carcinomas. *Cancer Res.* 55: 4995–4998.
- Cher, M.L., Bova, G.S., Moore, D.H. et al. 1996. Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res.* 56: 3091–3102.
- Cooper, C.S. 1992. The met oncogene: from detection by transfection to transmembrane receptor for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 7: 3–7.

- Cooper, C.S., Park, M., Blair, D.G. et al. 1984. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311: 29–23.
- Dean, M., Park, M., LeBeau, M., Robins, T.S., et al. 1985. The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. *Nature* 318: 385–388.
- Ericson K, Halvarsson B, Nagel J, et al. 2003. Defective mismatch–repair in patients with multiple primary tumours including colorectal cancer. *Eur J Cancer*. Jan;39(2):240–248.
- Fishel, R, Lescoe, M.K., Rao, M.R.S. et al. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027–1038.
- Greenberg J, Salinger M, Weschler F, et al. 1996. Circumflex coronary artery dissection following waterskiing. *CHEST* 113(4) APRIL: 1138–40.
- Gonzalez–Aguilera JJ, Nejda N, Fernandez FJ, et al. 2003. Genetic alterations and MSI status in primary, synchronous, and metachronous tumors in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Am J Clin Oncol*. Aug; 26(4):386–391.
- Grundeir T, Vogelsang H, Ott K, et al. 2000. Loss of heterozygosity and microsatellite instability as predictive markers for neoadjuvant treatment in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. Dec;6(12):4782–8478.
- Ichiro Yoshino, Seiichi Fukuyama, Toshifumi Kameyama, et al. 2003. Detection of Loss of Heterozygosity by High–Resolution Fluorescent System in Non–small Cell Lung Cancer: Association of Loss of Heterozygosity With Smoking and Tumor Progression. *CHEST* 123 (2) FEBRUARY: 545–550
- K. Demopoulos, D. A. Arvanitis, D. A. Vassilakis, et al. 2002. MYCL1, FHIT, SPARC, p16INK4 and TP53 genes associated to lung cancer in idiopathic pulmonary fibrosis. *J.Cell.Mol.Med*. Vol 6, No 2, 215–222
- Kwok, S., and Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237–238.
- Leone, A., McBride, O.W., Weston, A. et al. 1991. Somatic allelic deletion of nm23 in human cancer. *Cancer Res*. 51: 2490–2493.
- Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C.A. 1991. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351: 453–456.
- Lindblom, A., Tannergard, P., Werelius, B., and Nordenskjold. M. 1993. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non–polyposis colon cancer. *Nature Gen*. 5: 270–282.
- Liu, B., Nicolaides, N.C., Markowitz, S. et al. 1995. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nature Gen*. 9: 48–45.
- M in al Vaish, A njali Mishra Manish Kaushal, et al. 2004. Microsatellite instability and its correlation with clinicopathological features in a series of thyroid tumors prevalent in iodine deficient areas. *Exp. Mol. Med*. Vol. 36(2), 122–129
- Magnusson, P., Wilander, E., and Gyllensten, U. 1996. Analysis of loss of heterozygosity in microdissected tumor cells from cervical carcinoma using fluorescent dUTP labeling of PCR products. *BioTechniques* 21: 844–847.
- Mendes–da–Silva P, Moreira A, Duro–da–Costa J, et al. 2000. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 5 in non–small cell lung carcinoma. *Mol Pathol*. Aug;53(4):184–7.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase–catalyzed chain reaction. In: Wu, R., ed. *Methods in Enzymology*, Vol. 155, Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp. 335–350.
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y. et al. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253: 665–669.
- Pamela S. Larson, Antonio de las Morenas, Sheila R. Bennett, L. et al. 2002. Loss of Heterozygosity or Allele Imbalance in Histologically Normal Breast Epithelium Is Distinct from Loss of Heterozygosity or Allele Imbalance in Co–Existing Carcinomas. *American Journal of Pathology*, Vol. 161, No. 1, July , 283–290
- Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Wei, Y.–F. et al. 1994. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263: 1625–1629.
- Parsons, R. Li, G.–M., Longley, M.J., Fang, W.H. et. al. 1993. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 75: 1227–1236.
- Peltomaki, P., Aaltonen, L.A., Sistonen, P., et al. 1993. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260: 810–812.
- Rucinska M, Kozlowski L, Pepinski W, et al. 2005. High grade sarcomas are associated with microsatellite instability (chromosom 12) and loss of heterozygosity (chromosom 2) *Med Sci Monit*, 2005; 11(2): BR65–68
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F. A., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Amheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β –globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
- Sang–Wook Choi, Kyung Jun Lee, Young–An Bae, Ki–Ouk Min, Mi–Seon Kwon, Kyoung–Mee Kim, and Mun–Gan Rhyu. 2002. Genetic Classification of Colorectal Cancer Based on Chromosomal Loss and Microsatellite Instability Predicts Survival. *Clinical Cancer Research* Vol. 8, 2311–2322, July

- Shih-Ching Chang, Jen-Kou Lin, Tzu-Chen Lin, Wen-Yih Liang. 2005 Loss of heterozygosity: An independent prognostic factor of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*;11(6):778-784
- Smith, J.R., Freije, D., Carpten, J.D. et al. 1996. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 274: 1371-1374.
- Sood AK, Holmes R, Hendrix MJ, Buller RE. 2001. Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer Res.* Jun 1;61(11):4371-4.
- Vocke, C.D., Pozzatti, R.O., Bostwick, D.G. et al. 1996. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res.* 15: 2411-2416.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E. et al. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New Engl. J. Med.* 319: 525-532.
- Walsh, P.S., Erlich, H.A., and Higuchi, R. 1992. Preferential PCR amplification of alleles: Mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl.* 1: 241.
- Weizhu Zhu, Wenyi Qin, Hormoz Ehya, et al. 2003. Microsatellite Changes in Nipple Aspirate Fluid and Breast Tissue from Women with Breast Carcinoma or Its Precursors. *Clinical Cancer Research* Vol. 9, 3029-3033, August 1
- Yaremko, M.L., Recant, W.M., and Westbrook, C.A. 1995. Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is an early event in breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 13: 186-191.
- Yaremko, M.L., Kutsa, C., Lyzak, J., Mick, R., Recant, W.M., and Westbrook, C.A. 1996. Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is associated with invasive behavior in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 16: 189-191.
- Richter HE, Lohrer HD, Hieber L, et al. 1999. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in radiation-associated thyroid carcinomas of Belarussian children and adults. *Carcinogenesis* vol.20 no.12 pp.2247-2251
- Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, et al. 1999. Genetic alterations in bronchial lavage as a potential marker for individuals with a high risk of developing lung cancer. *CANCER RESEARCH* 59, 2690-2695, June 1
- Vassilakis DA, Sourvinos G, Markatos M, et al. 1999. Microsatellite DNA instability and loss of heterozygosity in pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* Nov;160(5 Pt 1):1729-1733
- Vassilakis DA, Sourvinos G, Spandidos DA, et al. 2000. Frequent genetic alterations at the microsatellite level in cytologic sputum samples of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* Sep;162(3 Pt 1):1115-1119

研究用のみに使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

The PCR process and 5' nuclease process are covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd.

ABI PRISM, Applied Biosystems, GeneAmp, GeneMapper, GeneScan, LIZ, PET and VIC are registered trademarks and AB (Design), Applera, 6-FAM, Hi-Di and NED are trademarks of Applera Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries.

AmpliTaqGold and TaqMan are registered trademarks of Roche Molecular Systems, Inc.