

## ヒト骨・軟部腫瘍組織における癌遺伝子の解析

岡山大学医学部整形外科学教室（主任：田辺剛造教授）

住居 広士，井上 一，伊藤 士郎，田辺 剛造

吉備高原医療リハビリテーションセンター

武 智 秀 夫

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部門

池 田 正 五，小 田 琢 三

（昭和63年12月7日受稿）

**Key words :** Oncogene, Gene amplification, c-myc, c-raf-1, Osteosarcoma, MFH

### 緒 言

癌遺伝子 (oncogene) は最初レトロウイルスのもつ発癌に関与する遺伝子 (v-onc) として発見されたが、その後それに相同な遺伝子 (c-onc, proto-oncogene) が正常細胞のゲノム中にも存在することが明らかとなった。さらにレトロウイルスには見いだされない新しい遺伝子が DNA トランスフェクション技術等により発見され、現在までに約50種類以上の癌遺伝子が報告されている<sup>1)</sup>。最近の分子生物学的研究により、正常細胞中にあった発癌活性を持たない癌遺伝子が何らかの変化を起こして発癌活性を持つようになり、細胞が癌化することが明らかにされ、癌遺伝子はもともと正常細胞中で細胞の増殖や分化にとり重要な働きをしている遺伝子であると考えられるようになってきた。癌遺伝子の活性化の機構として、遺伝子増幅による癌遺伝子産物の発現増加<sup>2)-6)</sup>、癌遺伝子の発現調節の変化<sup>7),8)</sup>、点突然変異や遺伝子再配列の結果としての癌遺伝子産物の質的な変化<sup>9)-14)</sup>等が知られている。

ヒトにおける癌遺伝子の研究は、当初培養細胞株やヌードマウスに植え継がれてきた癌細胞を用いて行われてきたが、最近臨床的に得られたいくつかのヒト癌組織中の癌遺伝子も活性化されていることが報告された<sup>1),5),6)</sup>。臨床組織材

料を用いた癌遺伝子の変化の解析は、発癌のメカニズムを解明する上での重要な知見を与えるのみならず、臨床経過や病理学的所見との関連性を見いだすことにより癌の診断や予後の判定に重要な手がかりを与えると考えられる。

本研究ではヒト骨・軟部腫瘍における癌遺伝子の変化 (増幅・再配列) を調べることを目的として、14症例の切除組織において、5種類の癌遺伝子 (c-myc, c-K-ras, c-fos, c-raf-1, N-myc) を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果骨肉腫2症例、悪性線維性組織球腫 malignant fibrous histiocytoma (MFH) 1症例に c-myc 遺伝子の増幅を、また c-myc 遺伝子の増幅した骨肉腫の1症例に c-raf-1 遺伝子の増幅を見いだした。さらにこれらの症例の癌遺伝子と臨床病理学上の関連について検討した。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 組 織

DNA 抽出材料として手術により摘出した14症例のヒト骨・軟部腫瘍組織を $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し使用した。症例として骨肉腫(4例)、傍骨性骨肉腫(1例)、MFH(2例)、悪性神経鞘腫(3例)、滑膜肉腫(1例)、巨細胞腫(3例)を使用した(表1)。対照としてヒト正常胎盤組織を

表1 ヒト骨・軟部腫瘍組織症例

診 断	年齢	性別
1 骨肉腫	13	女性
2 骨肉腫	12	男性
3 骨肉腫	15	女性
4 骨肉腫	13	男性
5 傍骨性骨肉腫	31	女性
6 悪性線維性組織球腫	44	女性
7 悪性線維性組織球腫	40	女性
8 悪性神経鞘腫	75	女性
9 悪性神経鞘腫	33	女性
10 悪性神経鞘腫	68	男性
11 滑膜肉腫	39	男性
12 巨細胞腫	42	女性
13 巨細胞腫	34	女性
14 巨細胞腫	29	女性

使用した。

#### 2. DNA 抽出<sup>15)</sup>

凍結組織を液体窒素を満たしたワーリングブレンダーでホモゲナイズした。その細切組織を lysis buffer (0.5M EDTA, proteinase K 0.1 mg/ml (Merk 社), 0.5% sarcosyl) に懸濁し、50°C 3時間加温した。DNA をフェノールとクロロホルムで抽出した後に RNase (Sigma 社) 処理を行った。最終的に DNA を TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1 mM EDTA) に溶解し実験に用いた。

#### 3. サザンプロットティング

10 $\mu$ g の DNA を制限酵素で切断した後、0.8% アガロースゲルで電気泳動した。サイズマーカーとしては  $\lambda$  ファージ DNA を制限酵素 Hind III で切断したものを使用した。DNA を ethidium bromide で染色し写真撮影した後に、サザンプロット法<sup>16)</sup>でナイロンフィルター(ポール社)に転写した。

#### 4. ハイブリダイゼーション

5種類の癌遺伝子(c-myc, c-K-ras, c-fos, c-raf-1, N-myc) (Amersham 社) をニックトランスレーション法<sup>13)</sup>で [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP を用いてラベルした。DNA を写したナイロンフィルターをまず前処置として 6 $\times$ SSC 溶液 (0.9M NaCl, 0.09M クエン酸ナトリウム, pH7.0),

表2 サザンハイブリダイゼーションの条件

1. DNA ; 10 $\mu$ g
2. ハイブリダイゼーション ;
6 $\times$ SSC
10mM EDTA
5 $\times$ Denhardt's solution
100 $\mu$ g/ml 変性サケ精子 DNA
<sup>32</sup> P 標識プローブ
(比活性 1 $\times$ 10 <sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g)
68°C, 24時間
3. 洗 浄 ;
① 6 $\times$ SSC
0.5% SDS
68°C, 10分, 1回
② 2 $\times$ SSC
0.1% SDS
68°C, 20分, 3回
4. オートラジオグラフィー ;
-70°C, 1-4日(増感紙を使用)

5 $\times$ Denhardt's solution (1 mg/ml牛血清アルブミン, 1 mg/mlフィコール400, 1 mg/mlポリビニルピロリドン), 0.1mg/ml変性サケ精子 DNA, 0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む混合液中で68°C, 4時間反応させた。つぎにそのフィルターを、<sup>32</sup>P でラベルした癌遺伝子を加えた上記混合溶液と68°Cで24時間加温しハイブリダイゼーション<sup>15)</sup>を行った(表2)。その後フィルターを0.5% SDS を含む6 $\times$ SSC 溶液で68°C, 10分間で一回洗浄し、次に0.1% SDS を含む2 $\times$ SSC 溶液で68°C, 20分間で3回洗浄した。ハイブリダイズしたプローブを検出するため-70°Cで1から4日間増感紙を用いてオートラジオグラフィーを行った。

## 結 果

ヒト骨・軟部腫瘍組織における癌遺伝子の変化を検討するために、5種の癌遺伝子(c-myc, c-K-ras, c-fos, c-raf-1, N-myc) をプローブとして14症例(表1)についてサザンハイブリダイゼーションを行った。14症例の骨・軟部腫瘍組織から高分子DNAを抽出し、EcoRIで切断後サザンプロットティングを行った。プローブとしてまずc-mycとc-K-rasを用いた。c-myc遺

伝子の増幅が No. 1, No. 3 及び No. 6 のレーン, すなわち骨肉腫 4 症例のうち 2 症例と MFH 2 症例のうちの 1 症例において見られた(図 1 A). 他の骨・軟部腫瘍組織において c-myc 遺伝子の増幅は, 認められなかった. c-K-ras 遺伝子に関しては全骨・軟部腫瘍において対照 DNA であるヒト正常胎盤組織と変化なく増幅は見られなかった. No. 1 と No. 3 の組織の c-myc 遺伝子の増幅の程度を調べるために, それぞれの DNA を希釈して胎盤 DNA と比較した(図 1 B). No. 1

の 2 症例において正常胎盤組織よりも 8 ~ 16 倍, No. 3 の症例において 2 ~ 4 倍 c-myc 遺伝子が増幅していた. 3 種の制限酵素 (EcoRI, Hind III, PstI) による c-myc 遺伝子の切断パターン (restriction fragment length polymorphism, RFLP) を調べたところ, 対照 DNA と変わらず, 両症例とも明らかな再配列異常は検出できなかった(図 1 C). さらに他の骨・軟部腫瘍組織においても c-myc 遺伝子の再配列異常はなかった.

次に図 1-A と同じフィルターを用いて, c-fos,

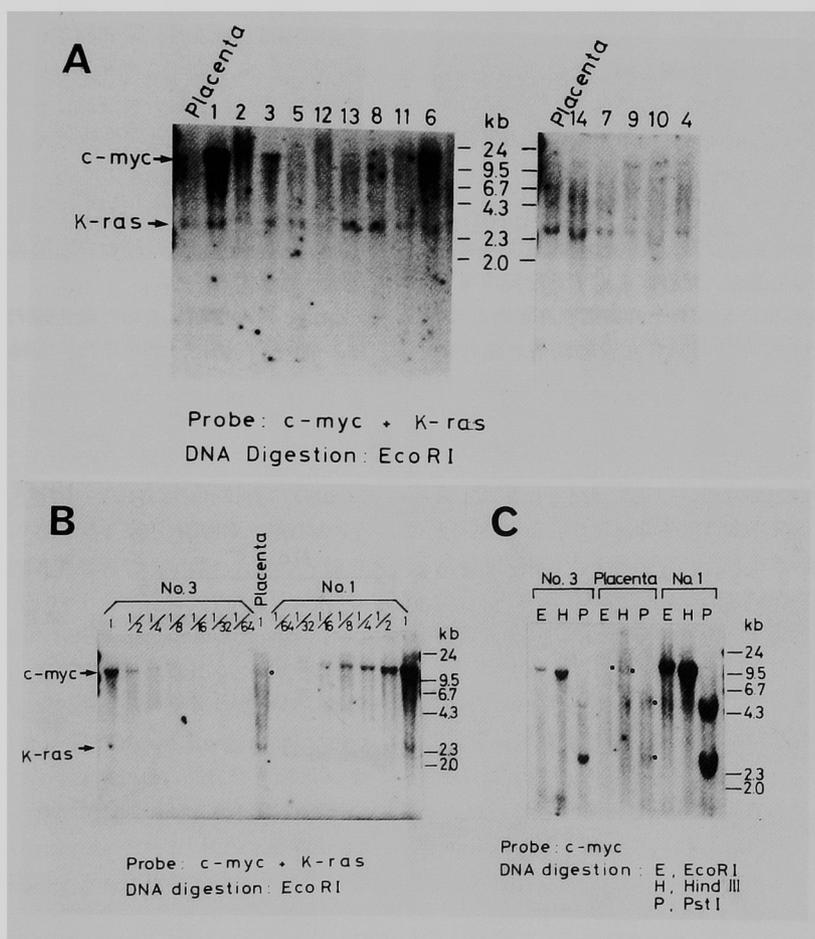


図 1 A: 骨・軟部腫瘍組織より抽出した DNA のサザンハイブリダイゼーション。DNA は EcoRI で切断した。プローブ DNA として  $^{32}\text{P}$  でラベルした c-myc と c-K-ras 遺伝子を使用した。レーンの番号は表 1 に準ずる。  
B: No. 1 と No. 3 の症例における c-myc 遺伝子の増幅度。EcoRI で切断した No. 1 と No. 3 の DNA を希釈して胎盤 DNA とバンドの濃さを比較した。  
C: No. 1 と No. 3 の症例における c-myc 遺伝子の再構成。EcoRI, Hind III, PstI で切断し断片の長さを比較した。

c-raf-1 及び N-myc プローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。c-raf-1 遺伝子が No. 1 のレーンに、著明に増幅していた(図 2 A)。その組織は c-myc 遺伝子が増幅していた骨肉腫 2 症例のうちの 1 症例(No. 1)であった。全骨・軟部腫瘍組織において c-fos と N-myc 遺伝子の変化は見られなかった。c-raf-1 遺伝子の増幅の程度は 16~32 倍と著明に増幅が見られた(図 2 B)。2 種の制限酵素 (Hind III, EcoRI) による c-raf-1 遺伝子の切断パターンは対照 DNA であるヒト正常胎盤組織と変わらず、明らかな再配列異常は検出できなかった(図 2 C)。

次に、癌遺伝子の増幅を示した症例について臨床病理学的所見を以下に述べる。

**症例 1** (図 3) c-myc と c-raf-1 遺伝子の増幅のあった骨肉腫は 13 歳女性、昭和 54 年 11 月より左膝痛が出現する。昭和 55 年 2 月 7 日初診する。レントゲン所見として左大腿骨々幹端部に著明な骨膜反応を認め、骨形成を示す骨陰影の増加を示し、同部位に骨シンチの集積をみとめた(図 3 A)。昭和 55 年 3 月 21 日左股離断術を施行す

る。その後 high dose methotrexate (MTX), adriamycin の化学療法を行うも、昭和 55 年 4 月 11 日肺転移、昭和 55 年 7 月 7 日左骨盤部への骨転移を認め、昭和 55 年 8 月 26 日死亡する。

その病理組織像は、弱拡大では、星棒状、紡錘型の細胞が密に増殖しており eosin 好性の osteoid を産生している(図 3 B)。細胞は、核の大小、クロマチンの濃淡等異形性が認められた。強拡大では、細胞のクロマチンの濃淡の差があり、mitosis が著明に認められた。

**症例 2** (図 4) c-myc 遺伝子のみ増幅のみられた骨肉腫は 15 歳女性、昭和 54 年 12 月より右膝痛が出現し、昭和 55 年 2 月 8 日当科初診する。レントゲン上右大腿骨骨幹端部に著明な骨膜反応を認め、骨形成を示す骨陰影の増加を示し、同部位に骨シンチの集積をみとめた(図 4 A)。昭和 55 年 3 月 19 日 above knee amputation を施行した。昭和 56 年 2 月肺転移を認め昭和 56 年 10 月 29 日死亡する。

c-myc のみ増幅していた骨肉腫の病理組織像は、前例と同様に、弱拡大では、星棒状、紡錘型

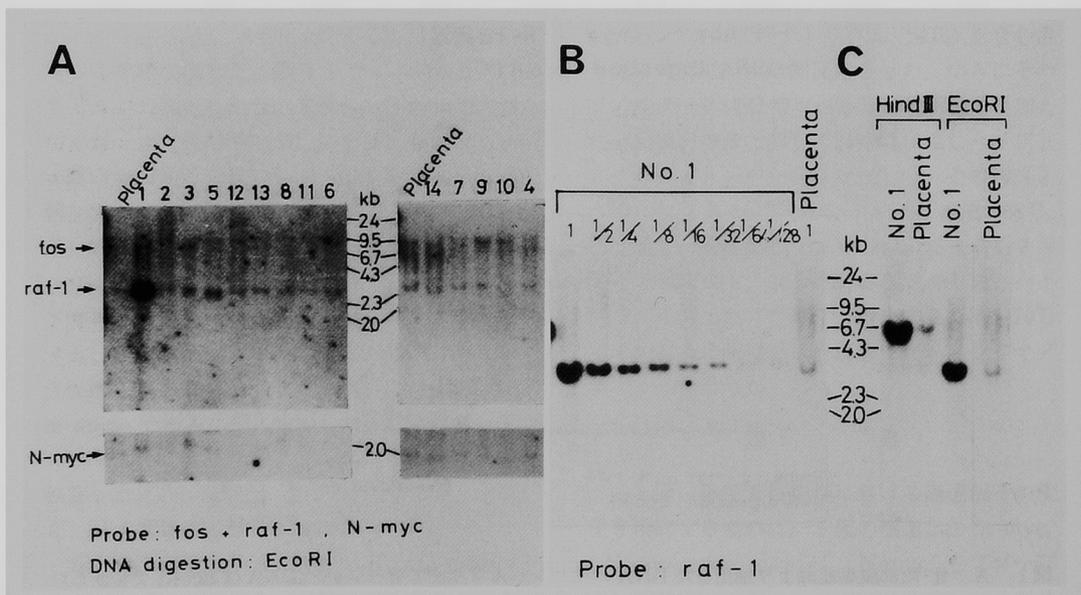


図 2 A : 骨・軟部腫瘍組織より抽出した DNA のサザンハイブリダイゼーション、プローブ DNA として<sup>32</sup>P でラベルした c-fos と c-raf-1 と N-myc 遺伝子を使用した。レーンの番号は表 1 に準ずる。  
B : No. 1 の症例における c-raf-1 遺伝子の増幅度。EcoRI で切断した No. 1 の DNA を希釈して胎盤 DNA とバンドの濃さを比較した。  
C : No. 1 の症例における c-raf-1 遺伝子の再構成。EcoRI と Hind III で切断し断片の長さを比較した。

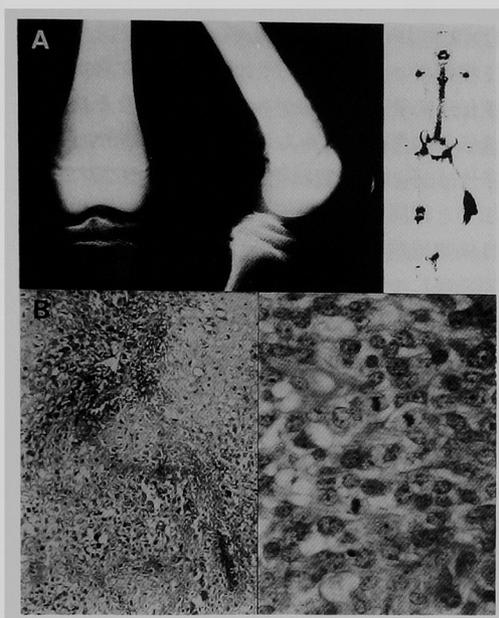


図3 症例1 c-myc と c-raf-1 遺伝子の増幅のあった骨肉腫症例 (13歳, 女性)  
 A: 左大腿骨々幹端部に著明な骨膜反応を認め, 同部位に集積を認めた骨シンチ。  
 B: 同部位の骨肉腫の病理組織像 (H. E. 染色)

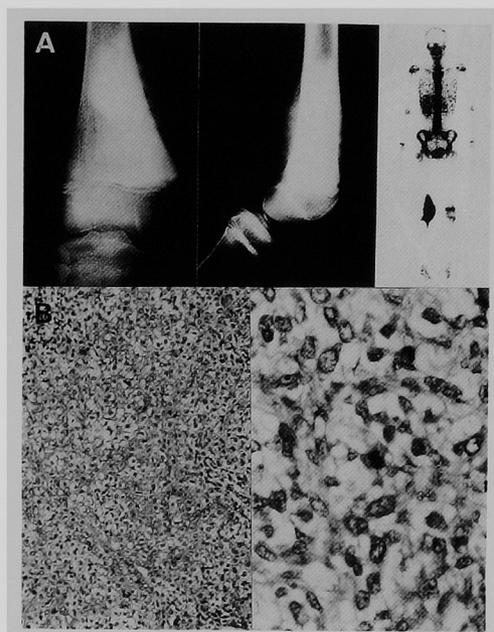


図4 症例2 c-myc 遺伝子のみ増幅のみられた骨肉腫症例 (15歳, 女性)  
 A: 右大腿骨々幹端部に著明な骨膜反応を認め, 同部位に集積を認めた骨シンチ  
 B: 同部位の骨肉腫の病理組織像 (H. E. 染色)

の細胞が密に増殖しており eosin 好性の osteoid を産生している (図4 B)。細胞は, 核の大小, クロマチンの濃淡等異形性が認められた。強拡大では, 細胞のクロマチンの濃淡の差があり mitosis が著明に認められた。

c-myc 遺伝子の増幅の見られなかった骨肉腫2症例は術後9年の現在も生存している。両症例ともに biopsy 後に above knee amputation をうけていた。1症例には, 肺転移を認め high dose MTX の化学療法をうけて肺転移の摘出をうけ以後 disease free である。他の1症例では, 肺転移巣も認めずさらに化学療法もうけていなかった。

症例3 (図5) c-myc 遺伝子の増幅のあった MFH は44歳女性であり, 昭和58年8月頃右大腿後面に軟部腫瘍が出現し, 近医で摘出術をうけ, その後同部位に再発した。その MFH は深大腿動脈より栄養された hypervascularity の性格を示した (図5 A)。剖面は薄い pseudocapsule に

包まれ黄かっ色で点在性の出血壊死巣を伴った。昭和61年5月9日広範囲切除術を施行するも術後再発を起し昭和62年10月2日右股離断術を施行した。以後肺転移をきたし昭和63年5月5日死亡する。

その病理組織像は, 弱拡大では, 紡錘型の細胞が密に増殖しており collagen, 膠原線維を産生し, 束状に増殖しており storiform pattern を呈する部分がある (図5 B)。強拡大では, 細胞の核は大小不同が著明であり, 空胞状で, さらに mitosis も多く認められた。

## 考 察

最近, 種々の悪性腫瘍組織における癌遺伝子の増幅や再構成の症例が報告され, 癌遺伝子の活性化と癌化の関連性<sup>1), 6)</sup>が指摘されている。しかし骨・軟部腫瘍組織において癌遺伝子を検索した報告は少ない<sup>6), 18)</sup>。今回我々は骨・軟部腫瘍組織における癌遺伝子の関与を検討する目的で,

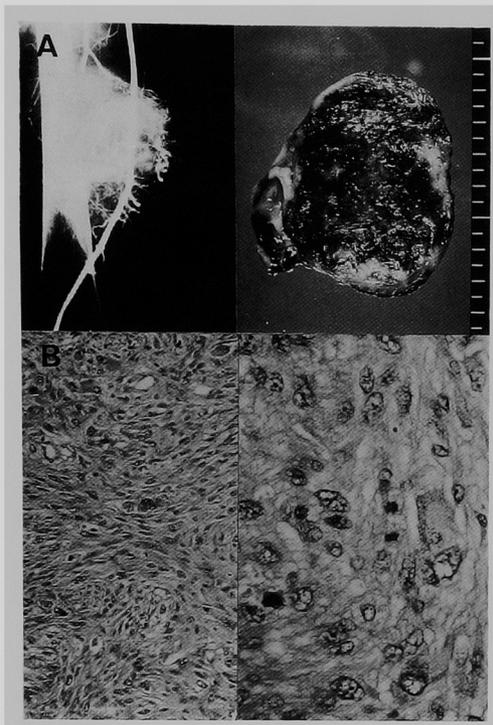


図5 症例3 c-myc 遺伝子の増幅のあった悪性線維性組織球腫症 (MFH) (44歳, 女性)  
 A: 右大腿後面に発生した軟部腫瘍組織の hypervascularity を示す血管造影とその断面  
 B: 同部位の MFH の病理組織像 (H. E. 染色)

サザンハイブリダイゼーションによる癌遺伝子の増幅・再配列の解析と臨床学的及び病理学的所見の関連について調べた。

癌遺伝子は、マウス線維芽細胞株である NIH/3T3 に腫瘍組織由来の高分子 DNA を移入する DNA トランスフェクション実験により、トランスホーム活性をもつ遺伝子として検出された。活性化した癌遺伝子は、NIH/3T3細胞をトランスホームすることができるが、初代培養細胞をトランスームすることができないことがあり、Weinberg らと Ruley により細胞の癌化には少なくとも2つ以上の複数のステップがあり、2種類以上の癌遺伝子が関与していると指摘されている<sup>19),20)</sup>。またそれらの癌遺伝子の活性化機構として遺伝子産物の質的および量的な変化が重要であるとされている。

今回我々の調べた14症例の骨・軟部腫瘍組織 DNA において、osteosarcoma 2 症例と MFH 1 症例で c-myc 遺伝子、前者の1例に c-raf-1 遺伝子の著明な増幅がみられた。またそれらの遺伝子の再配列はみられなかった。c-myc 遺伝子<sup>21)</sup>は、トリの骨髄細胞腫ウイルス MC29の癌遺伝子と相同な細胞遺伝子である。正常細胞中では細胞周期初期から発現し、細胞の増殖が続く間発現しつづける。myc 遺伝子の導入により初代培養ラット線維芽細胞に永久増殖能を与えることができる。その遺伝子産物は、非特異的な2本鎖DNA結合性を持ち、細胞核内に存在する。ヒトの胃癌、肺癌などの種々の悪性腫瘍細胞株や悪性腫瘍組織において c-myc 遺伝子の増幅が検出されている<sup>5),6),22)</sup>。c-raf-1 遺伝子<sup>23)</sup>はマウス肉腫ウイルス3611の癌遺伝子と相同な細胞癌遺伝子として発見された。その遺伝子産物は、標的蛋白質のセリン・スレオニン残基をリン酸化する蛋白質キナーゼ活性をもつ。myc 遺伝子と一緒に移入すると、培養骨髄細胞にトランスホメーションを引き起こすことができる。c-raf-1 遺伝子は DNA トランスフェクション実験の操作過程において再構成を受け活性化される事が報告されている<sup>12)-14)</sup>が、悪性腫瘍組織における量的な活性化を示した症例の報告はない。本例の増幅した c-raf-1 遺伝子に再配列は見いだせなかった。従って今回初めて c-raf-1 遺伝子の活性化は質的な変化ばかりでなく量的な変化でも起こる可能性が示された。

c-myc 遺伝子の増幅がみられた骨肉腫2症例と MFH 1 症例とも術後早期に肺転移をきたした。一方 c-myc 遺伝子の増幅のみられなかった骨肉腫2症例は術後9年の現在も生存している。今回病理組織学的には、癌遺伝子の活性を伴った症例と伴っていない症例との明確な差異は確認できなかった。しかし c-myc 遺伝子は細胞の分化や増殖に重要な役割を果している遺伝子であり、今回増殖のあった骨肉腫、MFH の症例とも臨床的に悪性度が高いことより、c-myc 遺伝子の増幅と臨床的悪性度の間に相関性がある可能性が示唆された。c-myc 遺伝子の増幅に c-raf-1 遺伝子の増幅を伴った骨肉腫症例は早期肺転移に加え骨転移をきたした。c-myc 遺伝子の増

幅に c-raf-1 遺伝子の増幅が伴うことにより臨床的悪性度がさらに悪化する可能性が考えられる。細胞の癌化には 2 種類以上の癌遺伝子が関与していることが培養細胞を用いた実験で示されているが<sup>(19),20)</sup>、本症例でみられたように複数の癌遺伝子の変化が臨床組織材料にも存在することは興味深い。

癌遺伝子の研究によってヒトの癌細胞の癌化の機序に新しい分野が開けつつあるが、ヒト骨・軟部腫瘍組織においても本研究によって癌遺伝子の関与が強く示唆された。今後さらに癌遺伝子の変化と臨床学的・病理学的所見の確かな関連性を得るために症例数を増やし追求していく必要があると思われる。

## 結 論

1. 骨・軟部腫瘍組織14症例において5種類の

癌遺伝子の変化についてサザンハイブリダイゼーションで調べたところ骨肉腫2症例とMFH 1症例で c-myc 遺伝子、前者の1例で c-raf-1 遺伝子の著明な増幅がみられた。

2. c-myc 遺伝子の増幅のみみられた症例ではすべて悪性度が高く、早期肺転移後死亡した。従って c-myc の増幅と骨肉腫、MFH 症例の臨床的悪性度に相関性がある可能性が示唆された。

3. c-raf-1 遺伝子の活性化が量的な変化(遺伝子の増幅)でも起こる可能性が示された。

稿を終えるに臨み、病理組織の御指導と御校閲を賜った岡山大学附属病院病理部田口孝爾先生に深甚の謝意を表します。(本研究の要旨は第2回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。)

## 文 献

- 1) Channing JD : Cellular oncogenes and human carcinogenesis. *Clin Chem* (1987) **33** (5), 641—646.
- 2) Collins S and Groudine M : Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature* (1982) **298**, 679—681.
- 3) Favera RD, Wong-Staal and Gallo RC : onc gene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL-60 and primary leukemic cells of the same patient. *Nature* (1982) **299**, 61—63.
- 4) Little CD, Nau MM, Carney DN, Gazdar AF and Minna JD : Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* (1983) **306**, 194—196.
- 5) Koda T, Matsushima S, Sasaki A, Danjo Y and Kakinuma M : c-myc gene amplification in primary stomach cancer. *Jpn J Cancer Res (Gann)* (1985) **76**, 551—554.
- 6) Yokota J, Tsunetsugu-Yokota Y, Battifora H, Fevre CL and Cline MJ : Alteration of myc, myb, and ras<sup>Ha</sup> proto-oncogenes in cancers are frequent and show clinical correlation. *Science* (1986) **231**, 261—265.
- 7) Leder P, Battery J, Lenoir G, Moulding C, Marphy W, Potter H, Stewart T and Taub R. : Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* (1983) **222**, 765—767.
- 8) Canaani E, Gale RP, Stein-Saltz D, Berrebi A, Aghai E and Januszewicz E : Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukemia. *Lancet* (1984) **17**, 593—595.
- 9) Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M and Wigler M : Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* (1982) **300**, 762—765.
- 10) Tabin CJ, Bradley SM, Bargman CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR and Chang EH : Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* (1982) **300**, 143—149.
- 11) Reddy EP, Reynolds RK, Santos E and Barbacid M : A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*

- (1982) **300**, 149—152.
- 12) Shimizu K, Nakatsu Y, Sekiguchi M, Hokamura K, Tanaka K, Terada M and Sugimura T : Molecular cloning of an activated human oncogene, homologous to v-raf, from primary stomach cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) **82**, 5641—5645.
  - 13) Fukui M, Yamamoto T, Kawai S, Maruo K and Toyoshima K : Detection of a raf-related and two other transforming DNA sequences in human tumors maintained in nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) **82**, 5954—5958.
  - 14) Ishikawa F, Takaku F, Hayashi K, Nagao M and Sugimura T : Activation of rat c-raf during transfection of hepatocellular carcinoma DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) **83**, 3209—3212.
  - 15) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J : *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York (1982).
  - 16) Southern EM : Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* (1975) **98**, 503—517.
  - 17) Rigby PWJ, Dieckman M, Rhodes C and Berg P : Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* (1977) **113**, 237—251.
  - 18) Asano S and Yamashita T : Analysis of cellular oncogenes in human osteosarcomas transplanted onto nude mice. *J Jpn Orthop Assoc* (1988) **62**, 231—242 (in Japanese).
  - 19) Land H, Parada LF and Weinberg RA : Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* (1983) **222**, 771—778.
  - 20) Ruley HE : Adenovirus early region 1 A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* (1983) **304**, 602—606.
  - 21) Alitalo K, Bishop JM, Smith DH, Chen EY, Colby WW and Levinson AD : Nucleotide sequence of the v-myc oncogene of avian retrovirus MC29. *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) **80**, 100—104.
  - 22) Wong AJ, Ruppert JM, Eggleston J, Hamilton SR, Baylin SB and Vogelstein B : Gene amplification of c-myc and N-myc in small cell carcinoma of the lung. *Science* (1986) **233**, 461—464.
  - 23) Bonner TI, Opperman H, Seeburg P, Kerby SB, Gunnell MA, Youg AC and Rapp UR : The complete coding sequence of the human raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene. *Nucleic Acids Res* (1986) **14**, 1009—1015.

**Analysis of cellular oncogenes in human bone and soft tissue tumors**

**Hiroshi SUMII, Hajime INOUE, Shiro ITO, Gozo TANABE**

**Hideo TAKECHI<sup>1)</sup>, Shogo IKEDA<sup>2)</sup> and Takuzo ODA<sup>2)</sup>**

**Department of Orthopedic Surgery,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**<sup>1)</sup>Rehabilitation Center for Employment Injuries, Kibikogen,**

**Jobogun-Kayocho 716-12, Japan**

**<sup>2)</sup>Department of Biochemistry, Cancer Institute,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. G. Tanabe)**

The amplification and rearrangement of five cellular oncogenes (c-myc, c-K-ras, c-fos, c-raf-1, and N-myc) were studied by Southern hybridization in fourteen human bone and soft tissue tumors obtained at surgery. Amplification of c-myc was detected in the two of four osteosarcomas and one of two malignant fibrous histiocytomas. The c-myc genes in these tissues were amplified 4- to 8-fold in comparison with the placenta DNA. One of these osteosarcomas had 16- to 32-fold amplification of c-raf-1 gene without rearrangement. The clinical course of osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma with the amplified c-myc or c-raf-1 gene showed a rapid malignant progress with lung or bone metastasis. There appears to be a correlation between clinical prognosis and oncogene amplification.