

大腸腫瘍性病変の K-ras codon 12 の点突然変異

山形 誠 一

①

大腸腫瘍性病変の K-ras codon 12 の点突然変異

山形 誠 一

緒言

大腸癌の発癌過程における adenoma-carcinoma sequence¹⁻⁵⁾は広く認められているが、1987年以降、Vogelstein ら⁶⁻⁸⁾によって分子生物学的な解析がなされてきた。そしてこれまでに、APC, K-ras, P53, DCC, MCC, HNPCC gene⁶⁻¹⁸⁾らの多数の遺伝子異常が発見され、これらの異常の蓄積により、大腸癌の発癌、発育、進展がなされると推測されるに至っている。

これらの解析において、K-ras 遺伝子変異は発癌過程の比較的早期に起こるとさわれてきた。しかし、浸潤癌における変異頻度が高度異型腺腫に比較して低率であることから、このモデルとは異なる、K-ras 遺伝子変異を伴わない発癌経路の存在も想定されている^{7,19)}。特に、表面平坦～陥凹型の早期癌において K-ras 変異が全く認められないという報告がなされるに至り²⁰⁾、通常の隆起型病変における adenoma-carcinoma sequence とは異なる発癌経路の存在が強く示唆されるようになった。

flat adenoma は1984年、武藤らの報告²¹⁾以来、通常の polypoid adenoma に比較して癌化率が高率であること、粘膜筋板が薄いことから容易に粘膜下浸潤を起こすと考えられること、また、近年の大腸内視鏡の進歩により以前より多数発見されるようになったことから、重要な前癌病変として注目を集めてきた²²⁻²⁷⁾。しかし、これまでに前癌病変として分子生物学的な解析のなされた対象は、全て polypoid adenoma であり、flat adenoma における解析はほとんどなされていない。

そこで、本研究では flat adenoma, polypoid adenoma そして、浸潤癌について

での *K-ras* codon12の点突然変異を解析し、主に形態学的な側面との比較検討から、大腸癌発生の経路について考察を加えた。

対象と方法

東京大学第一外科、徳洲会岸和田病院、三楽病院において、外科手術あるいは内視鏡的に切除された264病巣（248症例）を対象とした。その内訳は、polypoid adenoma 95病巣、flat adenoma 62病巣、浸潤癌101病巣（sm 癌 39病巣、pm 癌 33病巣、ss 以上の癌 29病巣）、これらの病巣と別に、潰瘍性大腸炎に合併した癌6病巣である。Familial adenomatous polyposis (FAP) の症例は含まれていない。また、control として大腸正常粘膜10例（大腸癌切除標本口側断端）を用いた。いずれもホルマリン固定後パラフィン包埋され、6カ月～15年間保管されたブロックを使用した。

病理組織学的検索

各ブロックから3 μ mのH.E.染色切片を作成し、WHOの異型度判定基準²⁸⁾に基づいて、mild atypia, moderate atypia, severe atypia, invasive carcinomaに分類した。flat adenomaは断面において、病巣の粘膜高が正常粘膜の2倍を超えないものとし²⁶⁾、さらにその形態を大腸癌取扱規約²⁹⁾に準じて、IIa (n=27), IIb (n=17), IIc (n=8), IIc+IIa (n=7), IIb+IIa (n=3), に分類した。flat adenomaに属しないadenomaをpolypoid adenomaとし、やはり断面よりIp (long stalk), Isp (short stalk), Is (broad base, sessile)に分類した。断面による判定が難しい病巣については、内視鏡所見を参考にした (Fig.1, 2)。

sm 癌および pm 癌については、隆起型病変を Type I とし (Type I: sm 癌16、pm 癌9)、その他の潰瘍型、平坦型 (1例) を発育形態により下田らの分類³⁰⁾に準じて、Polypoid growth 群 (PG 群: sm 癌4、pm 癌11) と Non-polypoid growth 群 (NPG 群: sm 癌17、pm 癌13) に分類した (Fig. 3)。sm 癌の2例 (IIa, IIa+Is) は分類困難群とした。ss 以上の進行癌については、発育形態の判定が難しいため隆起型 (Type I) と潰瘍型にのみ分類した。

以上の形態分類と *K-ras* 変異の関連性について検討した。

DNA 抽出

5~10 μ m の隣接切片から鏡検下に病巣を確認しながら、adenoma においては最も異型の強い部分を、浸潤癌においては浸潤部を中心に腫瘍細胞が密に増殖している部分を、約10mm² 切り出した。それぞれの標本には10⁴~10⁵の細胞が含まれ、その80%以上が組織学的に異型細胞と考えられた。切り出した標本は、脱パラフィン後、Proteinase K により消化し、phenol-chloroform 抽出、ethanol 沈殿により DNA を抽出精製した³¹⁾。抽出した DNA の1/10量を使用して、*K-ras* 変異を解析した (Fig. 4)。

K-ras codon 12の解析

比較的感度の高いとされる 2 step の PCR-RFLP 法 (polymerase chain

reaction-restriction fragment length polymorphism)³²⁾を用いた。まず、codon 11に1塩基置換を有する変異 primer により PCR を行うことで、wild type の codon 12に対して、制限酵素 *Mva*I の認識配列を導入した。この際 codon 12に変異がある allele には、*Mva*I の認識配列は導入されない。一回目の PCR の産物を *Mva*I で処理し、再び PCR を行うことで mutant を選択的に増幅し、その産物を *Mva*I で処理、8%polyacrylamide gel による電気泳動の移動度の差により *K-ras* codon 12の点突然変異の有無を解析した。それぞれの反応には negative control として、DNA を入れない検体と正常 DNA (正常胆嚢より抽出) を含め、contamination 及び、制限酵素の消化不良による false positive のないことを確認した (Fig. 5, 6, 7)。

さらに、変異陽性とされた大腸癌の2検体について最終産物を polyacrylamide gel より切り出して DNA fragment を精製し、pCR II に組み込み、cloning の後、dideoxy 法によりsequencing を行い *K-ras* codon 12の変異を確認した。

Titration experiment

2-step-PCR-RFLP の感度を検定するため、Gly→Ser の変異を有する肺癌の cell line A549³³⁾から抽出した DNA を正常 DNA により希釈して検討した。

大腸進行癌における *K-ras* mutation の heterogeneity の検討

大腸進行癌の病巣内における部位による heterogeneity を調べる目的で、浸潤

部において変異陽性の11病変、変異陰性の4病変それぞれについて辺縁部2~5箇所から DNA を抽出し、K-ras codon12 の変異を解析した。

結果

(1) 基礎的検討

Titration experiment の結果、2-step-PCR-RFLP の sensitivity は1/100 (100倍の wild type の中の mutant allele を検出できる) であった。control の正常粘膜は全て変異陰性であった。sm 癌で変異陽性と判定された2病巣について、PCR 産物を cloning の後、sequencing を行ったところ、Gly→Asp、Gly→Val への変異が確認された (Fig. 8, 9)。

(2) polypoid adenoma と flat adenoma の比較検討 (Table 1, 2)

polypoid adenoma における *K-ras* codon 12の点突然変異は67% (65/95) に認められたのに対して、flat adenoma においては21% (13/62) にしか認められなかった ($P < 0.01$, χ^2 test)。これを、各異型別でみたところ、それぞれの異型度において flat adenoma の *K-ras* 変異は polypoid adenoma に比べて有意に低率であった (mild atypia, severe atypia : $P < 0.01$, moderate atypia : $P < 0.05$)。大きさにより、5mm 以下、6~10mm、11~20mm、21mm 以上の4群に分けて比較しても、それぞれの群において polypoid adenoma の *K-ras* 変異頻度は flat adenoma よりも高率であった (5mm 以下、6~10mm : $P < 0.05$, 11~20mm : $P < 0.01$)。polypoid adenoma は、mild atypia でも60% (25/42)、5mm 以下の小さなものでも57% (8/14) に *K-ras* 変異が認められ、

異型度、大きさが増すに連れてさらに高率となる傾向が認められたが、統計学的に有意差は認められなかった。polypoid adenoma のなかで、severe atypia あるいは20mm 以上の villous / tubulo-villous adenoma には、そのほとんどに変異が認められた (9/9、11/12)。しかし、villous / tubulo-villous adenoma と tubular adenoma の間で *K-ras* 変異頻度に差は認められなかった。なお、flat adenoma は全て tubular adenoma で、villous pattern を示すものはなかった。

(3) 形態と *K-ras* 変異頻度との関係

i) adenoma について (Table 3)

adenoma の形態との関係では、polypoid adenoma の lp、lsp、ls の各形態間に *K-ras* 変異頻度の差は認められなかった。一方、flat adenoma では、隆起を示す IIa と IIb+IIa 型腺腫においては10/30 (33%) と、平坦、陥凹型の IIIb、IIc 型腺腫 (2/25 : 8%) に比べて高率であった ($P < 0.05$)。

ii) 浸潤癌について (Table 4, 5)

浸潤癌における *K-ras* 変異頻度は、sm 癌33%、pm 癌45%、ss 以上の癌で62%であった。sm 癌の各発育形態における *K-ras* 変異の頻度は、Type I 56% (9/16)、PG 群 50% (2/4)、NPG 群 6% (1/17)と、Type I と NPG 群の間で著明な差がみられた ($P < 0.01$)。pm 癌においても、Type I で7/9 (78%) と高頻度に *K-ras* 変異がみられたのに対して、NPG 群では23% (3/13) と低率であり ($P < 0.05$)、PG 群では45% (5/11) であった。ss 以上の進行癌では隆起型の2例と潰

痛型の59% (16/27) に変異が認められた。

(4) K-ras 変異の heterogeneity について (Fig. 10, Table 6)

進行癌における K-ras 変異の heterogeneity を調べたところ、変異陽性例11病変の内、5病変では解析した部位全てに、2病変で3/5、3/4に変異が見られたのに対して、4病変では腫瘍の深部でのみ変異が認められた。heterogeneity を認めた4病変はいずれも4 cm 以上の腫瘍であった。また、浸潤部における変異陰性例4例は、辺縁部においても K-ras 変異は検出されなかった。

(5) 潰瘍性大腸炎癌化例における K-ras 変異について (Table 7, Fig. 11)

潰瘍性大腸炎に合併した癌6病巣の内、K-ras 変異が認められたのは1病巣のみであった。この1病巣は他の病巣と異なり肉眼型が1型の隆起型で、組織学的には villous pattern の高分化腺癌であった。

考察

1987年の Forrester ら、Boss らの報告^{6,8)}以来、多数の研究者により大腸の polypoid adenoma の *K-ras* 変異について検討がなされ、polypoid adenoma の大きさ、異型度が増加するときに *K-ras* 変異が関与すると推測されてきた^{6-10,19}。これに対して、今回の我々の検討では、5 mm 以下の小さな adenoma あるいは、低異型度の adenoma においてもすでに約60%と高率に *K-ras* 変異を認め、大きさ、異型度の増加に伴い変異頻度が漸増する傾向が見られた。McLellan ら³⁵⁾も1 cm 以下の adenoma でも72%に、低異型度の adenoma でも68%に、Fujimori ら³⁶⁾も低異型度の adenoma の50%に *K-ras* 変異が認められたとしている。このように、研究者により *K-ras* 変異の検出率にばらつきがみられることの第一の原因としては、各研究で用いられた *K-ras* 変異検出方法の感度の差をあげることができる。我々は小さな病巣から抽出した少量の DNA から確実に、しかも高感度で変異を検出できることから 2-step-PCR-RFLP 法を用いた。本法の感度はおよそ100倍数の wild type allele の中の mutant を検出できるものであり、従来用いられてきた PCR-ASO (allele specific oligonucleotide hybridization assay)^{36,37)}、1-step-PCR-RFLP¹⁹⁾、PCR-direct sequence³⁸⁾ に比べておよそ5~10倍高感度である。このことと、従来の報告および今回の結果をあわせて考えると、小さな adenoma、低異型度の adenoma には従来の方法では検出し難い少数の mutant が存在し、大きさ、異型度の上昇につれて adenoma の中での割合が増加するのではないかと推測された。また、同一病巣内での *K-ras*

変異の heterogeneity の存在も、K-ras 変異検出率のばらつきの第二の原因かもしれない。我々は polypoid adenoma における最も異型度の高い部分から選択的に DNA を抽出したが、Soh ら³⁴⁾によると、おなじ polypoid adenoma 内でも異型度の異なる領域で K-ras 変異に差が見られ、heterogeneity の存在が示唆されている。大腸腺腫では、異なる異型度の腺管が複雑に混在することが稀ではないことは光顯的にも明らかであるので、病巣のどの部位を測定したかということが K-ras 変異の有無に影響する可能性は十分に考えられる。

polypoid adenoma をさらに組織型により、tubular adenoma と tubulo-villous / villous adenoma に分類したが K-ras 変異頻度における差は認められなかった。組織型による比較は Vogelstein ら⁷⁾、McLellan ら³⁵⁾により報告されている。Vogelstein らは tubular adenoma においては4%と tubulo-villous / villous adenoma における44% / 45%に比べて変異頻度が低いことを報告しているが、tubular adenoma のほとんどが FAP に伴う異型度の低い小さなものであり単純に比較できないと考えられる。一方、MacLellan らは大きさ、異型度を含めた解析で組織型は K-ras 変異と関連性は認められないとしている。今回の我々の検討においても McLellan らとおなじ傾向がみられたが、villous pattern の腫瘍のうち手術適応となる大きな (4 cm 以上) villous tumor では、90%に K-ras codon 12の変異がみられた。大腸腫瘍の K-ras 変異の12~26%をしめる^{7,35,38)} codon13 について解析していないことを考慮すれば、villous tumor の殆ど全てに K-ras 変異がみられると言ってよいと思われる。従来より K-ras 変異頻度が低

率であるとされている潰瘍性大腸炎の癌化例³⁹⁻⁴¹⁾についての今回の検討でも、6例中唯一の *K-ras* 変異陽性例は villous pattern の腫瘍であり、villous tumor が発育する上で *K-ras* 変異は重要な役割を果たしているものと考えられる。

polypoid adenoma が腸管の内腔方向への増殖を特徴とする垂直発育型⁽⁴²⁾とすれば、それと対照的に側方向、あるいは深部への増殖をしめす水平発育型が flat adenoma および flat adenocarcinoma らの表面型病変である。polypoid adenoma に高率に *K-ras* 変異が認められたのに対して、flat adenoma における *K-ras* 変異は21%と有意に低率であった。しかもこの傾向は病変の大きさ、組織学的異型度と関連を認めなかった。最近、Minamoto⁽⁴³⁾ にも43例の表面型病変 (flat adenoma: 31例, intramucosal carcinoma: 6例, sm 癌: 6例) について *K-ras* 変異頻度は16%と低率で、大きさ、異型度と関連性はないと報告している。このことから、*K-ras* 変異が低率であることは flat adenoma の遺伝子レベルにおける特徴であると考えられる。

flat adenoma の中でも IIa, IIb+IIa といった隆起のあるものでは33%とやや変異頻度が高く、IIb, IIc の平坦陥凹型では8%と極めて低率であった。flat adenoma with severe atypia とした intramucosal carcinoma に限って検討しても、変異を認めたのは IIa, IIb+IIa 計3病変中1病変であり、IIb (4病変)、IIc (1病変)、IIc+IIa (1病変) に変異はみられなかった。この結果は、13病変の IIb 病変 (high grade dysplasia) に *K-ras* 変異が全く認められなかったという Fujimori らの報告⁽³⁶⁾と合致する。以上のごとく、大腸腺腫において polypoid

adenoma、IIa、IIb+IIa、IIb、IIcと隆起傾向が減少するに従って、K-ras 変異頻度が低下し、K-ras 変異と発育形態には密接な関連性が認められた。Lynch ら²⁵⁾ は flat adenoma は小さな polypoid adenoma の初期像に過ぎないと推測している。K-ras 変異の観点からみると、変異頻度がやや高い、IIa、IIb+IIa の中にはそのようなものが含まれている可能性が否定できないが、K-ras 変異がほとんど見られない IIb、IIc は polypoid adenoma とは異なる範疇の病変であると考えられる。

sm 癌における K-ras 変異頻度は、Type I : 57%、NPG 群 : 6%と著しい差が認められた。NPG 群の大腸癌はその形態から表面型病変由来であることが推測されているが、K-ras 変異頻度の上からも、NPG-sm 癌と polypoid adenoma とはかけ離れており、adenoma-carcinoma sequence においては flat adenoma とりわけ IIb、IIc 由来であることが推測される。ここで、*de novo* 型発癌^{30,44-46)}について触れる必要がある。adenoma-carcinoma sequence が、adenoma (mild, moderate atypia) → intramucosal carcinoma → sm 癌の pathway であるのに対して、*de novo* 型発癌は正常粘膜 → intramucosal carcinoma → sm 癌の pathway である。大腸癌においてどちらがより重要であるかという論争は、現在においても結論は出されていない。個々の大腸癌において、adenoma 由来であるか *de novo* 型発癌であるかの議論は、腺腫の遺残の有無によってなされており、両者の pathway における遺伝子変化上の差異は未だ発見されていない。癌巢に伴う異型の弱い腺管をいかに診断するかは、病理学者によっても意見が分かれる点であるが⁴⁷⁾、IIb、IIc の flat type の intramucosal carcinoma に腺腫内癌は少な

く *de novo* 型発癌の根拠とされている^{48,49}。今回われわれが検討した NPG-sm 癌がどちらの pathway をたどったものであるにせよ、flat type とりわけIb, IIc の intramucosal carcinoma (= flat adenoma with severe atypia) から進展してきたことは、K-ras 変異の上からも確かであろう。さらにさかのぼって、mild, moderate atypia の flat adenoma 由来であるか否かを解明するためには、flat adenoma あるいは *de novo* 型発癌に特異的な遺伝子変化の発見が必要である。ここではむしろ、平坦陥凹型病変かつ K-ras 変異の関与が小さい pathway があるということを認識する事がもっとも重要であろう。

Type I の sm 癌は、K-ras 変異頻度が高率であり polypoid adenoma 由来と考えられた。sm 癌全体の K-ras 変異頻度は33%となったが、これは、一般の sm 癌における NPG-sm 癌の頻度 (20-40%)^{30,45} に比し、本研究での NPG-sm 癌の頻度 (17/39=44%) が高かったために、実際の値より低く見積もられていると考えられる。なお、NPG-sm 癌は PG-sm 癌に比べて size が小さかったが、これは小さいうちに sm 浸潤を起こすという特性を反映しているものと考えられる。

pm 癌における K-ras 変異頻度は45%であり、従来の報告 (27-68%)^{6-9, 11, 19, 34, 35, 38} と同様の結果であった。このなかで、Type I の K-ras 変異は78%と高率で、Type I の sm 癌からの進展が想定された。これに対して NPG 群における K-ras 変異は23%と有意に低率であった。このことから、NPG-pm 癌の多くは平坦陥凹型病変の pathway をたどってきた事が推測される。しかし、NPG-sm 癌の K-ras 変異率6%に比べると17%の上昇がみられることから、一部は PG-sm 癌由来である、

あるいは NPG-pm 癌へと進展する際に K-ras 変異を獲得した、といった可能性も考えられる。PG-pm 癌、PG-sm 癌の K-ras 変異は約半数に認められたが、K-ras 変異からこれらの由来を推定することは困難である。形態からは、Ila、Is がその候補としてあげられ K-ras 変異率とも矛盾しないが、さらに別のマーカーが必要と考えられる。ss 以上の潰瘍型進行癌においては59%と比較的高率に変異が検出された。下田ら³⁰⁾は、進行癌の78%が NPG 型であり *de novo* 型発癌であるとしたが、K-ras 変異の関与が小さい平坦陥凹型病変の pathway が主体であれば、進行癌の K-ras 変異頻度はかなり低くなると考えられ今回の結果とは合致しない。隆起型から潰瘍型への形態変化が pm 晩期におこるという病理組織学的推論と^{5,50)} ss 以上の進行癌では周堤のくずれなど形態の変化が著しく PG 群と NPG 群との判定がしばしば困難であることを考え合わせると、NPG 型とされる ss 以上の進行癌の中に PG 型由来のものがかなり含まれているのではないかと推定される。

heterogeneity の存在については三つの解釈が可能であろう。第一の解釈は、腫瘍の発育後期に K-ras 変異を獲得したとするもの。第二の解釈は、もともと K-ras 変異陽性の腫瘍に K-ras 変異陰性の腫瘍細胞が発生し置き換えて行ったとするもの。第三の解釈は adenoma の時期から存在した K-ras 変異の heterogeneity がそのまま保持されているとするものである。この点について明らかにするために、NPG 型進行癌を中心に K-ras 変異の heterogeneity について検討した。その結果、11病変の K-ras 変異陽性進行癌の内、4病変において腫瘍の1部分、特に深部にしか変異が見られないという heterogeneity が認められた。

また、浸潤部で変異の見られなかった病変は他の部分でも変異は認められなかった。この結果は、腫瘍が深部へ浸潤していく過程において *K-ras* 変異を獲得した可能性を示唆していると考えられた。また、*K-ras* 変異が無秩序な細胞増殖に関連しているという研究報告⁵¹⁾があることを考え合わせると、heterogeneity の存在については第一の解釈が最も妥当と思われる。一方、7病変においては腫瘍の広範囲に *K-ras* 変異が認められ、比較的早期に変異を獲得した可能性が強いと考えられた。

潰瘍性大腸炎の癌化例における *K-ras* 変異は、通常の大腸癌に比べて頻度が低い(8~24%)ことが従来より報告されているが³⁹⁻⁴¹⁾、我々の検討においても6症例中 polypoid growth を示す villous tumor の1例のみに変異を認め、non-polypoid growth の5例には変異を認めなかった。一般に潰瘍性大腸炎の癌化例は通常の大腸癌と異なり、肉眼形態が取扱規約の3、4、5型といった non-polypoid growth を示す浸潤型が多いことが知られているが^{52,53)}、遺伝子変化においても隆起型腺腫を介した発癌経路と異なる事が考えられた。その一方で、*K-ras* 変異を認めた villous tumor の1例は、潰瘍性大腸炎の癌化例における Vogelstein モデルの発癌経路の存在を示唆しているのかもしれない。これまでの潰瘍性大腸炎の癌化例における *K-ras* 変異についての報告では腫瘍の形態については触れられておらず、今後の検討が待ち望まれる。

大腸腫瘍は *K-ras* codon 12の変異がよく見られるとされてきたが、そのなかにも、とくに変異頻度が高率である villous tumor, polypoid adenoma, Type I の sm, pm 癌、変異頻度が低率である NPG-sm 癌、IIB, IIC 型腺腫、潰瘍性大

腸炎癌化例などさまざまなタイプがあり一様ではない。また、腫瘍内における *K-ras* 変異の heterogeneity の存在は問題をさらに複雑にしている。adenoma-carcinoma sequence と *de novo* 型発癌の論争は、時代ともに、flat adenoma、IIb、IIc 病変の発見をへて変遷してきた⁵⁴⁾。我々は *K-ras* codon12 の点突然変異をマーカーとして一つの解釈を試みたが、今後この方面の分子生物学的研究の進歩により、*de novo* 型発癌と IIb、IIc 型 adenoma の遺伝子変化の差異、新たな重要な遺伝子異常の発見などによりさらに解明が進むと考えられる。

まとめ

非遺伝性大腸腫瘍263病巣 (flat adenoma 62, polypoid adenoma 95, 浸潤癌100, 潰瘍性大腸炎癌化例 6) の切除標本パラフィン包埋ブロックより DNA を抽出し、2-step-PCR-RFLP 法により K-ras codon12 における点突然変異について解析し以下の結果を得た。

- 1) polypoid adenoma において67% (65/95) に K-ras 変異が認められたのに対して、flat adenoma においては21% (13/62) と有意に低率であった。
polypoid adenoma のうち、villous tumor の K-ras 変異頻度は90%と極めて高率であった。
- 2) flat adenoma のなかでも平坦・陥凹型 (IIb, IIc type) の K-ras 変異は8%と、IIa, IIb+IIa type の33%に比して低率であった。
- 3) sm 癌、pm 癌の K-ras 変異頻度は、Type I : (sm 癌 : 57%, pm 癌 : 78%)、polypoid growth 群 : (sm 癌 : 50%, pm 癌 : 45%)、non-polypoid growth 群 : (sm 癌 : 6%, pm 癌 : 23%)、と Type I とNPG群の間に差が認められた。
- 4) ss 以上の進行癌においては62%に K-ras 変異を認めた。
- 5) K-ras 変異陽性の進行癌11例について、腫瘍内の3~6箇所 の K-ras 変異を調べたところ、4例においては腫瘍の深部にしか変異がみられない heterogeneity を認めた。
- 6) 潰瘍性大腸炎の癌化例6例のうち K-ras 変異を認めたのは、villous type

の隆起型病変1例のみであった。

結論

K-ras 変異に関して大腸腫瘍は一様ではなく、villous tumor, polypoid adenoma, Type I 浸潤癌において変異頻度が高率であるのに対して、NPG-sm / pm 癌、IIB、IIC 型腺腫、潰瘍性大腸炎癌化例では変異頻度が低率であることが明らかになった。また、同一腫瘍内で、K-ras 変異の heterogeneity が存在する場があることも示唆された。大腸癌の発癌過程としては、Vogelstein らの提唱した K-ras 変異が密接に関与する polypoid adenoma を介する経路とは別に、K-ras 変異を伴わない平坦・陥凹型病変を介する経路が存在すると考えられた。

文献

- (1) Grinnell, R., Lane, N. Benign and malignant adenomatous polyps and papillary adenomas of the colon and rectum. An analysis of 1856 tumors in 1335 patients. *Int. Abst. Surg.*, 106, 519-538 (1958)
- (2) Morson, B. C. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc. R. Soc. Med.*, 67, 451-457 (1974)
- (3) Muto, T., Bussey, H. J. R., Morson, B. C. The evolution of cancer of colon and rectum. *Cancer*, 36, 2251-2270 (1975)
- (4) Enterline, H. In *Current Topics in Pathology* 63, B. C. Morson, Ed., Springer-Verlag, Berlin, pp 95-141 (1976)
- (5) 横山 善文, 丸山 雅一, 佐々木 喬敏, 伊藤 誠, 竹内 俊彦. 大腸癌の発育・進展に関する臨床病理学的検討. *胃と腸*, 20, 867-876 (1985)
- (6) Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W. E., Perucho, M. Detection of high incidence of *K-ras* oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature*, 327, 298-303 (1987)
- (7) Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. M., Bos, J. L. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Eng. J. Med.*, 319, 525-532 (1988)
- (8) Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J., Voglstein, B. Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327, 293-297 (1987)
- (9) Burmer, G. C., Loeb, L. Mutations in the *KRAS2* oncogene during progressive stage of human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2403-2407 (1989)

- (10) Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in human colorectal cancers. *Science*, 247, 49-56 (1990)
- (11) Fearon, E. R., Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767 (1990)
- (12) Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hamilton, S. R., Hedge, P., Markham, A., Carlson, M., Joslyn, G., Groden, J., White, R., Miki, Y., Nishisho, I., Nakamura, Y. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colon cancers. *Science*, 251, 1366-1370 (1991)
- (13) Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., McKecnie, D., Finniear, R., Markham, A., Groffen, J., Bogusuki, M. S., Altshul, S. F., Horii, A., Ando, H., Miyoshi, W., Miki, Y., Nishisho, I., Nakamura, Y. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253, 661-665 (1991)
- (14) Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., Hedge, P., Markham, A., Krush, A. J., Peterson, G., Hamilton, S. R., Nilbert, M. C., Levy, D. B., Bryan, T. M., Preisinger, A. C., Smith, K. J., Su, L.-K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. Mutations in 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253, 665-669 (1991)
- (15) Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C. C. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53 (1991)

- (16) Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., Kolodner, R. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75, 1027-1038 (1993)
- (17) Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleishmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D., Venter, J. C., Hamilton, S. R., Petersen, G. M., Watson, P., Lynch, H. T., Peltomäki, P., Mecklin, J. P., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263, 1625-1629 (1994)
- (18) Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M., Erabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., Tannergard, P., Bollag, R. J., Godwin, A. R., Ward, D. C., Nordenskjöld, M., Fishel, R., Kolodner, R., Liskay, R. M. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368, 258-261 (1994)
- (19) Ando, M., Maruyama, M., Oto, M., Takemura, K., Endo, M., Yuasa, Y. Higher frequency of point mutations in the c-K-ras 2 gene in human colorectal adenomas with severe atypia than in carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 245-249 (1991)
- (20) 藤盛孝博, 長廻祐, 里中和廣, 平山大介, 原田益盛, 村谷明久, 田畑知己, 北沢 荘平, 池原英雄, 前田盛. *ras* 遺伝子異常からみた表面型早期大腸癌の特異性. *胃と腸*, 27, 111-117 (1992)
- (21) 武藤徹一郎, 上谷潤二郎, 澤田俊夫, 小西文雄, 杉原健一, 久保田芳郎, 安達実樹, 阿川千一郎, 斉藤幸夫, Tanprayoon, T., 森岡恭彦. 大腸の小さな扁平隆

- 起性病変(small "flat elevation")の臨床組織学的検討. 胃と腸, 19, 1359-1364 (1984)
- (22) Adachi, M., Muto, T., Morioka, Y., Ikenaga, T., Hara, M. Flat adenoma and flat mucosal carcinoma (IIB Type) - a new precursor of colorectal carcinoma? *Dis Colon Rectum*, 31, 236-243 (1988)
- (23) Adachi, M., Muto, T., Okinaga, K., Morioka, Y. Clinicopathologic features of flat adenoma. *Dis. Colon Rectum*, 34, 981-986 (1991)
- (24) Muto, T., Kamiya, J., Sawada, T., Konishi, F., Sugihara, K., Kubota, Y., Adachi, M., Agawa, S., Saito, Y., Morioka, Y., Tanparyoon, T. Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. *Dis Colon Rectum*, 28, 847-851 (1985)
- (25) Lynch, H. T., Smyrck, T. C., Watson, P., Lanspa, S., Lynch, P. M., Jenkins, J., Rouse, J., Cavalieri, J., Howard, L., Lynch, J. Hereditary flat adenoma syndrome: a variant of familial adenomatous polyposis? *Dis Colon Rectum*, 35, 411-421 (1992)
- (26) Wolber, R. A., Owen, D. A. Flat adenoma of the colon. *Hum Pathol*, 22, 70-74 (1991)
- (27) Lanspa, S. J., Rouse, J., Smyrk, T., Watson, P., Jenkins, J. X., Lynch, H. T. Epidemiologic Characteristics of the flat adenoma of Muto. *Dis. Colon Rectum*, 35, 543-546 (1992)
- (28) Morson, B. C., Sobin, L. H. Histological typing of intestinal tumors, World Health Organisation: Genova, 1976, Vol. 15.
- (29) 大腸癌取り扱い規約 (第5版) : 大腸癌研究会編, 金原出版, 東京 (1994)
- (30) Shimoda, T., Ikegami, M., Fujisaki, J., Matsui, T., Aizawa, S., Ishizawa, E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer*, 64, 1138-1146 (1989)

- (31) Goelz, S. E., Hamilton, S. R., Vogelstein, B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 118-126 (1985)
- (32) Levi, S., Urbano-Ispizua, A., Gill, R., Thomas, D. M., Gilbertson, J., Foster, C., Marshall, C. J. Multiple *K-ras* codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res.*, 51, 3497-3502 (1991)
- (33) Valenzuela, D. M., Groffen, J. Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of *K-ras* oncogene. *Nucleic Acids Res.*, 14, 843-852 (1986)
- (34) Soh, K., Yanagisawa, A., Hiratsuka, H., Sugano, H. Variation in *K-ras* codon 12 point mutation rate with histological atypia within individual colorectal tumors. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 388-393 (1993)
- (35) McLellan, E., Owen, R., Stepniewska, K., Sheffield, J., Lemoine, N. High frequency of *K-ras* mutations in sporadic colorectal adenomas. *Gut*, 34, 392-396 (1993)
- (36) Fujimori, T., Satonaka, K., Yamamura, Y., Kou, N., Maeda, S. Non-involvement of *ras* mutations in flat colorectal adenomas and carcinomas. *Int. J. Cancer*, 57, 51-55 (1994)
- (37) Smit, V. T. H. B. M., Boot, A. J. M., Smits, A. M. M., Fleuren, G. J., Cornelisse, C. J., Bos, J. L. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinoma. *Nucleic Acids Res.*, 16, 7773-7782 (1988)
- (38) Finkelstein, S. D., Sayegh, R., Christensen, S., Swalsky, P. A. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer*, 71, 3827-3838 (1993)

- (39) Burmer, G. C., Levine, D. S., Kulander, B. G., Haggitt, R. C., Rubin, C. E., Rabinovitch, P. S. C-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology*, 99, 416-420 (1990)
- (40) Meltzer, S. J., Mane, S. M., Wood, P. K., Resau, J. H., Newkirk, C., Terzakis, J. A., Korelitz, B. I., Weinstein, W. M., Needleman, S. W. Activation of C-Ki-ras in human gastrointestinal dysplasias determined by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Cancer Res.*, 50, 3627-3630 (1990)
- (41) Bell, S., Kelly, S., Hoyle, J., Lewis, F., Taylor, G., Thompson, H., Dixon, M., Quirke, P. c-Ki-ras gene mutations in dysplasia and carcinoma complicating ulcerative colitis. *Br. J. Cancer*, 64, 174-178 (1991)
- (42) 長廻敏. 小さな表面型(II型)大腸上皮性腫瘍. *胃と腸*, 25, 864-867 (1990)
- (43) Minamoto, T., Sawaguchi, K., Mai, M., Yamashita, N., Sugimura, T., Esumi, H. Infrequent K-ras activation in superficial-type (flat) colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 54, 2841-2844 (1994)
- (44) Spratt, J. S., Jr Ackermann, L. V. Small primary adenocarcinoma of the colon and rectum. *JAMA*, 179, 337-346 (1962)
- (45) Bedenne, L., Faivre, J., Boutron, M. C., Piard, F., Cauvin, J. M., Hillon, P. Adenoma-carcinoma sequence or "de novo" carcinogenesis? *Cancer*, 69, 883-888 (1992)
- (46) Kuramoto, S., Oohara, T. Minute cancers arising *de novo* in the human large intestine. *Cancer*, 61, 829-834 (1988)
- (47) 特集: 大腸腺腫と癌. *胃と腸*, 24, 284-307 (1989)
- (48) Kuramoto, S., Oohara, T. Flat early cancers of the large intestine.

Cancer, 64, 950-955 (1989)

- (49) 倉本秋, 大原毅. 表面型腫瘍の発育, 進展 II. 癌. 表面型大腸腫瘍の臨床 (長廻 誌, 加藤洋, 大島博 編), 142-150 東京医学社 東京, 1994
- (50) 工藤進英, 武藤輝一, 山本睦生, 下田聡, 畠山勝義, 小山真, 須田武保, 曾我淳, 富沢峰雄. 大腸の腺腫と早期癌の形態推移. 胃と腸, 20, 903-910 (1985)
- (51) Shirasawa, S., Furuse, M., Yokoyama, N., Sasazuki, T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated *Ki-ras*. Science, 260, 85-88 (1993)
- (52) 馬場正三, 倉橋隆之. 本邦における報告例の解析 (特集 潰瘍性大腸炎に合併した大腸癌). 日本大腸肛門病会誌, 43, 1272-1279 (1990)
- (53) 佐藤知行, 小西文雄, 金澤暁太郎, 田中昌宏, 鴨志田敏郎. 潰瘍性大腸炎に合併した直腸癌の1例ならびに本邦における潰瘍性大腸炎癌化例の検討. 日本大腸肛門病会誌, 45, 868-878 (1992)
- (54) 武藤徹一郎. 大腸ポリープ・ポリポース, 医学書院, 東京, 1993

Table 1. Frequencies of K-ras codon 12 mutations relative to histological grade of atypia in colorectal tumors.

Histology	Grade of atypia			Total	
	mild	moderate	severe		
Polypoid adenoma	tubular	22/35	17/24	11/16	50/75(67%)
	tubulo-villous, villous	3/7	2/4	9/9	14/20(70%)
	total	25/42(60%) ^{a)}	19/28(68%) ^{b)}	20/25(80%) ^{c)}	64/95(67%) ^{a)}
Flat adenoma	tubular	9/40(23%)	3/13(23%)	1/9(11%)	13/62(21%)

a) $P < 0.01$ by χ^2 test, b) $P < 0.05$ by Fisher's test, c) $P < 0.01$ by Fisher's test

Table 2. Correlation between size of adenomas and *K-ras* codon 12 mutations.

Histology	Size of adenoma				Total
	≤5 mm	6-10 mm	11-20 mm	21- mm	
Polypoid adenoma					
tubular	7/13	22/32	18/26	3/4	50/75
tubulo-villous, villous	1/1	-	2/7	11/12	14/20
total	8/14(57%) ^{a)}	22/32(69%) ^{a)}	20/33 ^{b)}	14/16	64/95
Flat adenoma					
tubular	7/37(19%)	5/16(31%)	1/7	0/2	13/62

a) $P < 0.05$ by χ^2 test b) $P < 0.01$ by Fisher's test

Table 3. Morphological type and *K-ras* mutation in adenomas

Morphological type	Frequency of mutation	
Ip	21/29 (72%)	
Isp	16/27 (59%)	
Is	27/39 (69%)	
type IIa	8/27	} 10/30(33%)
type IIb+IIa	2/3	
type IIb	2/17	} 2/25(8%)
type IIc	0/8	
type IIc+IIa	1/7	

P < 0.05
by Fisher's test

Table 4. Growth type and K-ras mutation in submucosal invasive cancers

Growth type	Mean size (mm)	Incidence of K-ras mutations
Type I	26.3 ± 11.5	9/16 (56%)
Polypoid growth	22.0 ± 9.1	2/4 (50%)
Non-polypoid growth	13.5 ± 5.3	1/17 (6%)
Unclassified	20.0 ± 5.0	1/2
Total	18.7 ± 10.2	13/39 (33%)

a) $P < 0.01$ by Welch's t test, b) $P < 0.01$ by Student's t test,
 c) $P < 0.01$ by Fisher's test

Table 5. Growth type and *K-ras* mutation in invasive cancers

Growth type	Depth of invasion		
	sm	pm	ss-
Type I	9/16 (56%) a)	7/9 (78%) b)	2/2
Polypoid growth	2/4 (50%)	5/11 (45%)	-
Non-polypoid growth	1/17 (6%)	3/13 (23%)	-
Unclassified	1/2	-	16/27 (59%)
Total	13/39 (33%)	15/33 (45%)	18/29 (62%)

a) $P < 0.01$ by Fisher's test, b) $P < 0.05$ by Fisher's test

Table 6. Intratumoral heterogeneity of *K-ras* mutation in advanced colorectal cancers

Age	Sex	Macroscopic appearance	Size(cm)	location	Depth of invasion	<i>K-ras</i> Heterogeneity ^{a)}
46	F	type2	1.8x1.6	S	pm	0/4
51	F	type2	2.7x2.6	Rb	pm	0/3
73	F	type1	2.9x2.5	S	pm	0/3
76	M	type2	3.6x2.3	R	pm	0/3
27	M	type2	2.2x2.0	Rb	pm	3/5
54	F	type1	2.8x2.2	S	pm	4/4
59	F	type2	2.8x2.2	Ra	ss	5/5
72	M	type2	3.1x2.0	T	ss	5/5
41	M	type2	3.5x3.0	S	ss	5/5
55	F	type2	3.5x3.3	A	ss	5/5
71	F	type2	4.0x4.0	Ra	pm	2/5
28	F	type1	4.5x3.5	Rb	pm	1/5
76	M	type1	4.5x4.0	S	pm	3/4
47	F	type2	5.0x4.0	S	ss	1/4
49	M	type1	7.0x5.6	S	pm	1/6

a) number of the sites positive for mutation / number of the sites examined

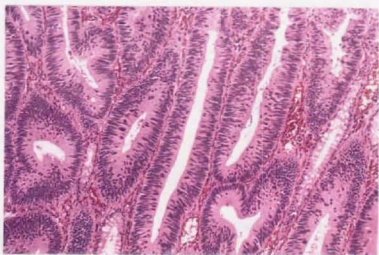
Table 7 *K-ras* mutations in cancers associated with ulcerative colitis

Age	Sex	Macroscopic appearance	Growth type	Size(cm)	location	Depth of invasion	<i>K-ras</i> mutation
49	M	type 5	NPG	1.3x0.8	C	pm	-
68	M	Ila	NPG	3.5x2.5	Rb	se	-
52	M	Ila	NPG	3.0x2.0	Rb	m	-
42	F	type 4	NPG	14.5x5.0	S	sei	-
44	F	type 1 (villous)	PG	7.0x5.8	D	ss	+
40	M	type 4	NPG	16.5x5.5	Rs	ss	-

a



b



c

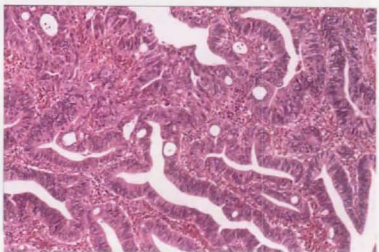
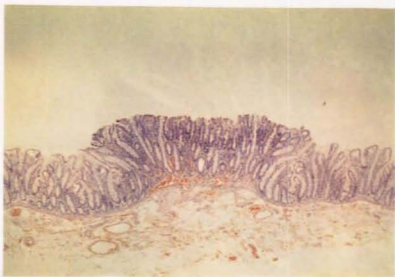
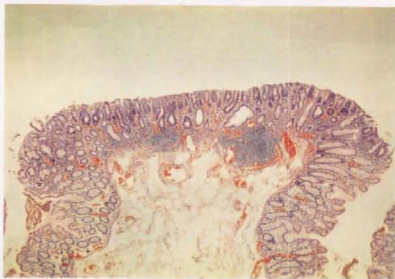


Figure 1. Histological grade of atypia
a: mild atypia
b: moderate atypia
c: severe atypia

a



b



c



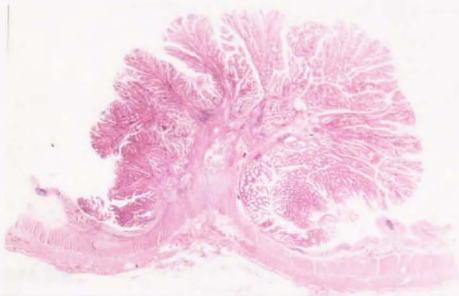
Figure 2. Subgroups of flat adenoma

a: IIa type

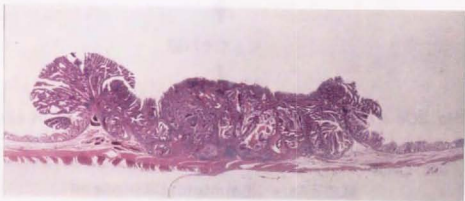
b: IIb type

c: IIc type

a



b



c

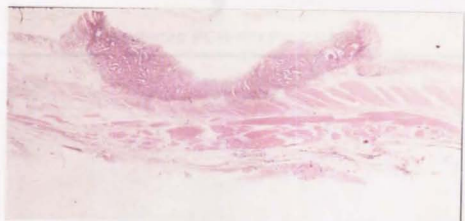


Figure 3. Growth type of invasive cancers

a: Type I

b: Polypoid growth type (PG-type)

c: Non-polypoid growth type (NPG-type)

Figure 4. DNAの抽出

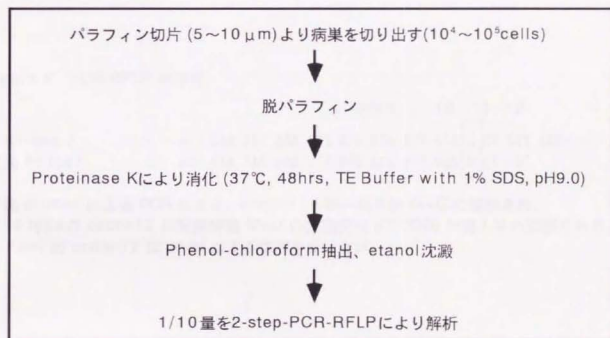
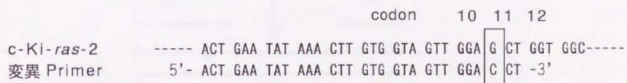
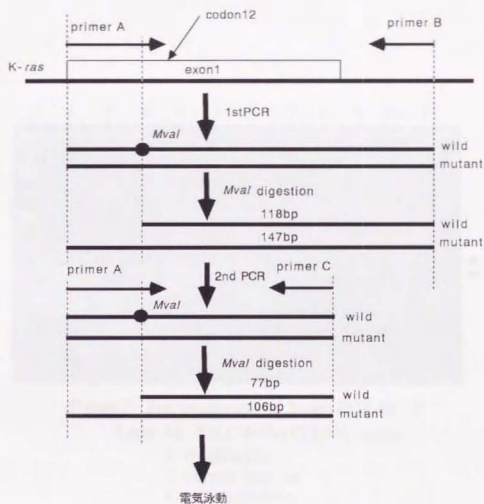


Figure 5. PCR-RFLP の原理



変異 primer による PCR により、codon11の第一塩基が G→C に置換され、wild typeの codon12 は制限酵素 *Mva*I の認識配列 (CCTGG) が導入され切断される。mutant の codon12 は *Mva*I による切断を受けない。

Figure 6. 2-step-PCR-RFLP



PCRの条件: 95°C2min→(95°C1.5min, 55°C1.5min, 72°C1min)x40cycle→72°C5min
 PCR反応液: total 50 μ l, Taq polymerase 1.25u, dNTPs 200 μ M each, MgCl₂ 1.5mM,
 Tris-HCl 10mM, KCl 50mM, primer 12.5pmol each
 primerA(変異primer) 5'ACTGAATATAAACTTGTGGTAGITGGACCT3'
 primerB (reverse) 5'GTCTGCACCAGTAATATGC3'
 primerC (reverse) 5'CTATTGTTGGATCATATTCG3'

primerAとprimerBによるPCRの産物をMvaIにより切断し、PCRの産物の1/100量に対して2nd PCRを施行し、mutantを選択的に増幅する。この際、切断されなかった極一部のwild typeも増幅される。再度MvaIにより消化し電気泳動における移動度の差でK-ras codon12の変異を検出する。

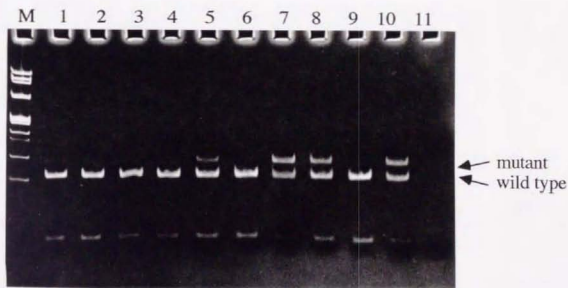


Figure 7. Electrophoresis of 2-step-PCR-RFLP

Lane M: Φ X174/*HaeIII* DNA marker

1: Gallbladder

2: normal mucosa

3,4: flat adenoma

5-7: polypoid adenoma

8-10: advanced cancer

11: H₂O

Lane 5, 7, 8, 10 are positive for *K-ras* mutation

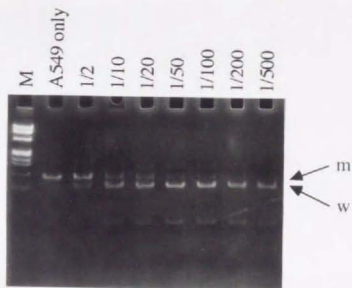


Figure 8. Titration experiment using the 2-step-PCR-RFLP. Genomic DNA from the A549 cell line was diluted with that from normal human gallbladder in the ratios indicated. Arrows (right) indicate the position of mutant (m) and wild-type (w) bands. The mutant band was detected until 1:100 dilution. Lane M: Φ x174/*HaeIII* DNA marker.

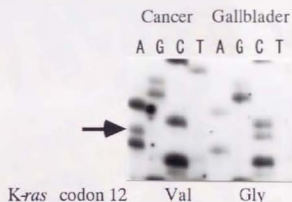


Figure 9. PCR産物のsequencingの結果、正常胆嚢におけるK-ras codon 12のnoncoding strandがACC (Glycine)であったのに対して、2-step-PCR-RFLP陽性のsm癌においては第2塩基(左矢印)にC→Aの変異(Valine)が認められた。

cloning およびsequencing の方法

1. 8% polyacrylamide gel より band を切り出し、crash し DNA fragment を溶出 (0.5M NH₄OAc, 10mM Mg(OAc)₂, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 37 °C, overnight)、phenol-chloroform抽出、ethanol沈澱により精製
2. DNA fragment を pCR II に ligation (DNA 2ng, pCR II 10ng, T₄ligase 350u, 1mM ATP, 60mM Tris-HCl, 6mM MgCl₂, 10mM DTT, total 10 μl, 10°C, overnight)
3. 1/2量にてE. coli. DH5 α 80 μl (10⁷ transformant/μg pMHC3) を transformation (0°C 30min → 42 °C 45 sec → add SOC 900 μl, 37°C 45min → 200 μlを X-Gal, IPTG 加 LB/Ampicillin(50 μg/ml) に plating → 37°C 14hr 培養)
4. 白色 colony を4つずつ pick up しLB/Amp 5mlにて液体培養 (37°C 24hr)
5. 菌液1.5mlより plasmid DNA をアルカリ法により調製 (Rapid pure miniprep (BIO 101, CA, USA) を使用)
6. plasmid DNA 1.5 μg をアルカリ変性後、³²P で5' 末端を標識した primer を用い、dideoxy法により sequencing を施行 (sequencing primer: TCTGAATTAGCTGTATCGTC, DNA polymerase: BcaBEST™ DNA polymerase) (MEGALABEL, BcaBEST™ Dideoxy Sequencing Kit (Takara, Kyoto) を使用)

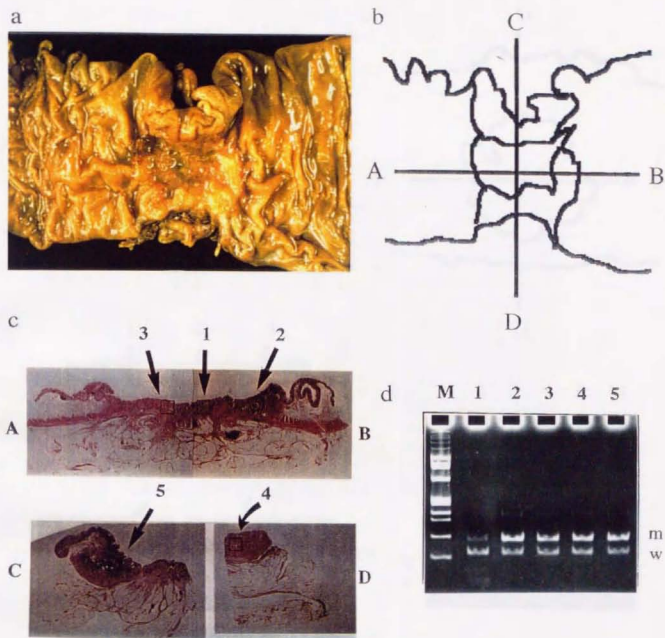


Figure 10-1. Heterogeneity of *K-ras* mutation in advanced cancer (1).

a: Macroscopic appearance of tumor.

b: Cut on the lines A-B and C-D.

c: DNAs were extracted from 5 sites respectively.

d: All 5 samples contained *K-ras* mutation.

In this case, heterogeneity of *K-ras* mutation was not demonstrated.

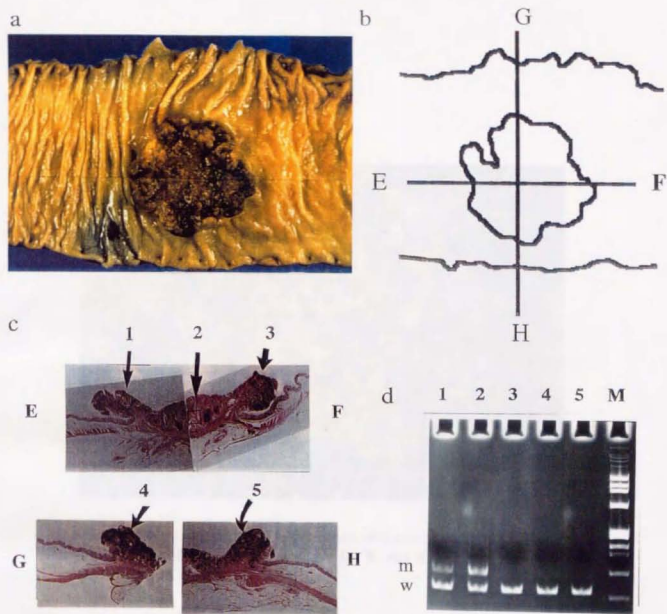


Figure 10-2. Heterogeneity of *K-ras* mutation in advanced cancer (2).

a: Macroscopic appearance of tumor.

b: Cut on the lines E-F and G-H.

c: DNAs were extracted from 5 sites respectively.

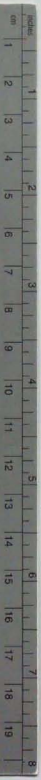
d: Only 2 samples (1 and 2) contained *K-ras* mutation.

In this case, heterogeneity of *K-ras* mutation was observed.



Figure 11. Macroscopic appearance of a cancer complicating ulcerative colitis that was positive for *K-ras* mutation. Villous proliferation was characteristic.





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak

