

Fluorescence in situ hybridization 法による胃癌悪性度評価の検討

広島大学原爆放射能医学研究所腫瘍外科

入江 秀明 平林 直樹 西山 正彦 坂本 憲昭
青儀健二郎 金 隆史 峠 哲哉

分裂間期でも染色体解析が可能な fluorescence in situ hybridization 法 (以下, FISH 法) は固形腫瘍に対し有用で, 染色体数的変化の解析は悪性度や予後の重要な情報となると考えられる。今回, 著者らは FISH 法にて消化器系腫瘍材料の染色体分析の有用性を検討した。培養細胞株で第 1, 7, 11, 17 番染色体数を解析後, 胃生検組織 76 病変に適応した。正常から早期, 進行癌と進行に応じて 1 染色体性および多染色体性を示す細胞の割合の増加を認めた。手術例 30 例の病理学因子の検討ではリンパ節転移およびリンパ管浸潤は 7 番, 11 番, 17 番染色体の多染色体位優位症例に, 腹膜転移は 1 番および 11 番染色体の異染色体性症例, 静脈浸潤は 17 番染色体多染色体性優位症例に有意 ($p < 0.01 \sim 0.05$) に認められた。以上より FISH 法にて術前の胃癌悪性度評価が可能であると考えられた。

Key words: fluorescence in situ hybridization, dual-color fluorescence in situ hybridization, fluorescence in situ hybridization, gastric cancer, biopsy

はじめに

分裂期の細胞を得ることが困難なことから, 固形腫瘍の染色体研究は血液系腫瘍¹⁾²⁾に比べ一歩遅れをとってきた。しかしながら近年, 分裂期だけでなく分裂間期においても染色体の数的異常の解析が可能な方法³⁾として fluorescence in situ hybridization 法 (以下, FISH 法と略す) が開発され, 固形腫瘍での検討が急速に進み始めた。

癌患者の ploidy pattern は予後評価の重要な指標としてフローサイトメトリーにより解析されてきたが⁴⁾, FISH 法によりさらに詳細に細胞個々についての各染色体の数的変化をみるのが可能となった。消化器腫瘍培養細胞株で FISH 法による染色体の数的異常の解析が可能であるかを確認し, その臨床応用, すなわち胃生検組織による悪性度評価について検討したので報告する。

材料と方法

1. 培養細胞株

消化器癌組織由来の培養細胞株, KATO III, SH101 (当科にて樹立) (胃癌), Colo201, Colo320DM, WiDr (Japan Cell Bank より供与) (大腸癌) を使用した。

2. 胃生検組織

1988年2月から1993年10月の間に広島大学医学部附属病院で生検された58例を対象とした。早期癌23, 進行癌25, 正常組織10 (年齢, 性別を一致させたもので胃疾患が疑われたが胃内視鏡下生検で正常と判定されたもの), および癌近傍正常組織18の計76病変について検討した。

3. 染色体プローブ

第1番, 第7番, 第11番, 第17番染色体セントロメアに対するピオチン標識プローブ D1Z5, D7Z1, D11Z1, D17Z1 (Oncor, Inc., USA) を使用した。

4. スライド標本作製法

1) 培養細胞

浮遊細胞 (KATO III) はメタノール酢酸 (3:1) にて固定後スライド上に展開した。付着細胞 (SH101, Colo201, Colo320DM, WiDr) はスライド上 (slide chamber 内) で3~4日培養した後, メタノール酢酸にて固定した。

2) 胃生検材料

ホルマリン固定パラフィン包埋組織を5 μ m に薄切した。その後脱パラフィンをキシレン (室温) にて10分間, 3回行った後, 下降エタノール列にて処理水とした。0.25%緩衝トリプシン (GIBCO BRL) で37°C overnight 酵素処理を行い, 必要に応じて脱水後0.5%ペプシン (SIGMA, USA) 処理を加えた (5分間,

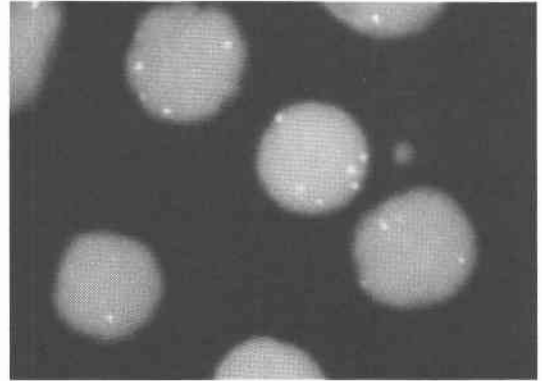
<1996年4月3日受理>別刷請求先: 入江 秀明
〒732 広島市南区霞1-2-3 広島大学原爆放射能医学研究所腫瘍外科

37°C).

5. FISH 法

FISH 法は既法³⁾⁵⁾に従い、以下の要領にて行った。すなわちスライド標本を上昇エタノール列にて脱水後風乾し、70%ホルムアミド/2×SSC (300mM sodium chloride and 30mM sodium citrate)にて70~75°C (培養細胞株：2分30秒間、胃生検材料：10分間) 熱変性後、素早く上昇エタノール列 (-20°C)にて脱水後風乾した。次いで70°Cにて熱変性した染色体セントロメア対するピオチン標識プローブを、スライド上に加え、加温槽内で37°C、4~16時間ハイブリダイゼーションした。その後、ホルムアミド (培養細胞株：60%、胃生検材料：50%)/2×SSCにて後洗浄 (培養細胞株：43°C20分間、胃生検材料：37°C15分)を行った。室温にて2×SSCで洗浄後、PBD [0.5%Triton X (東京化成)、0.5%Tween 20 (和光純薬)、0.5%Nonidet P-40 (SIGMA, USA)/2×SSC]に5分間浸した後、FITC標識アビジンにて発色反応を行った (37°C、5分間)。ついでPBD 2分間3回洗浄後、Propidium iodide (0.8μg/ml)にて核染色を行った。蛍光顕微鏡下に観察し核1個あたりのFITCのシグナルを算定した。観察細胞数に関しては培養細胞株においては100個以上、胃生検組織に関しては生検組織間に細胞数のばらつきがあるため最低60個以上を観察した。1個の核あたり2個のシグナルがあるものを正常の核型である2染色体性 (disomy)、1個のものを1染色体性 (monosomy)、3個以上あるものを多染色体性 (polysomy)としてその核型を評価した。また核の変形、重複のあるものは除外した。培養細胞では monosomy および polysomy の cut off 値をそれぞれ10%、30%と設定した。生検標本では正常組織の各染色体おのおのの最大値 (monosomy：第1番染色体、23.5%；第7番染色体、24.8%；第11番染色体で16.6%；第17番染色体、20.7%、polysomy：第1番染色体、8.7%、第7番染色体、5.8%；第11番染色体6.1%；第17番染色体、4.3%)を基準として monosomy および polysomy の cut off 値を設定した。すなわち monosomy の cut off 値は、第1番染色体で29%、第7番染色体で30%、第11番染色体で20%、第17番染色体で25%とした。polysomy では、第1番染色体で15%、第7番染色体で13%、第11番染色体で13%、第17番染色体で10%とした。観察標本中に monosomy の割合の多いものを1染色体性優位 (monoploid) 症例、polysomy の割合の多いものを多染色体性優位 (polyploid) 症例、またその両方が多

Fig. 1 Example of FISH on cell line KATO III using a FITC-labeled centromere-specific probe to chromosome 17. The nuclei are counterstained with PI. Many fluorescence signals (more than two) are observed in those nuclei, which was defined as polysomy ($\times 800$).



いものを異染色体性 (aneuploid) 症例とした。

有意差の検定には Student's t 検定および χ^2 検定を用いた。

結 果

1. 培養細胞株における染色体解析

SH101, KATO III, Colo201, Colo320DM, WiDr すべての培養細胞株において FISH 法が可能であり、明確な FITC のシグナルを確認できた (**Fig. 1**)。各染色体別に核型を解析すると胃癌細胞では、SH101：第1, 7番染色体1染色体性, 第7, 11, 17番染色体多染色体性, KATO III：第7, 17番染色体多染色体性の細胞が多く、大腸癌細胞では、colo201：第7, 17番染色体1染色体性, 第1, 7, 11, 17番染色体多染色体性, colo320DM：第1, 7, 17番染色体1染色体性, 第7, 11, 17番染色体多染色体性, WiDr：第1, 7, 11, 17番染色体多染色体性の細胞が多かった (**Fig. 2**)。

2. 胃生検組織における染色体解析

1) 核型分析

すべての生検材料において FISH 法による染色体解析が可能であった (**Fig. 3**)。評価可能であった細胞数は62~450個、平均159個であった。FITC のシグナルは培養細胞株に比べやや弱い傾向にあったが、材料の保存状況や採取時の取り扱いによる多少の差異はあるものの孤立したシグナルとして確認することができた。

1染色体性の占める割合を肉眼的進行程度別に比較した (**Fig. 4**)。いずれの染色体においても健常胃およ

Fig. 2 Frequency distributions of fluorescence signal of chromosome 1, 7, 11 and 17 in cell lines SH101, KATO III, colo201, colo320DM, and WiDR.

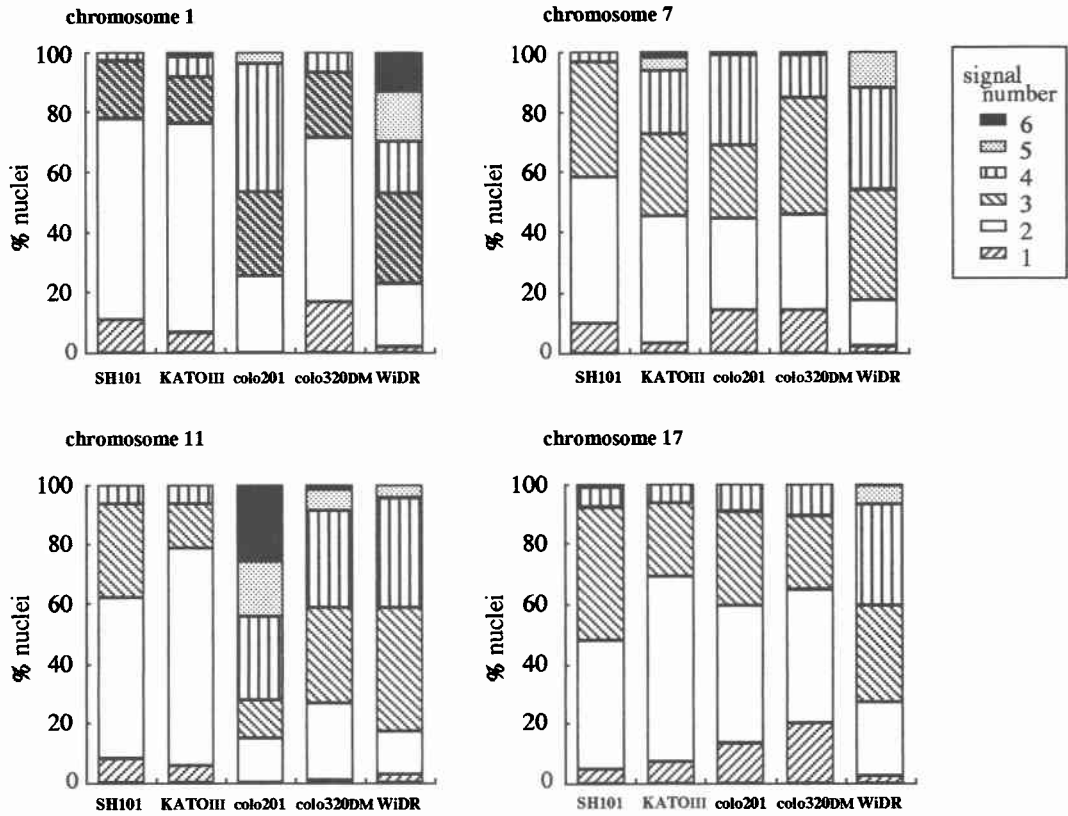
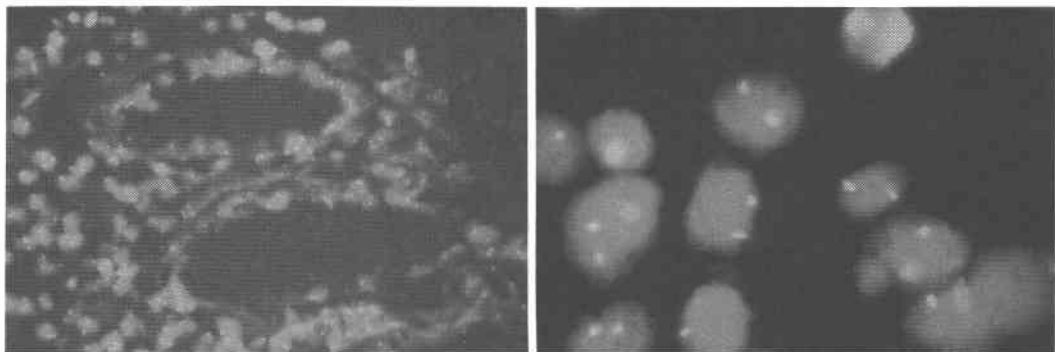


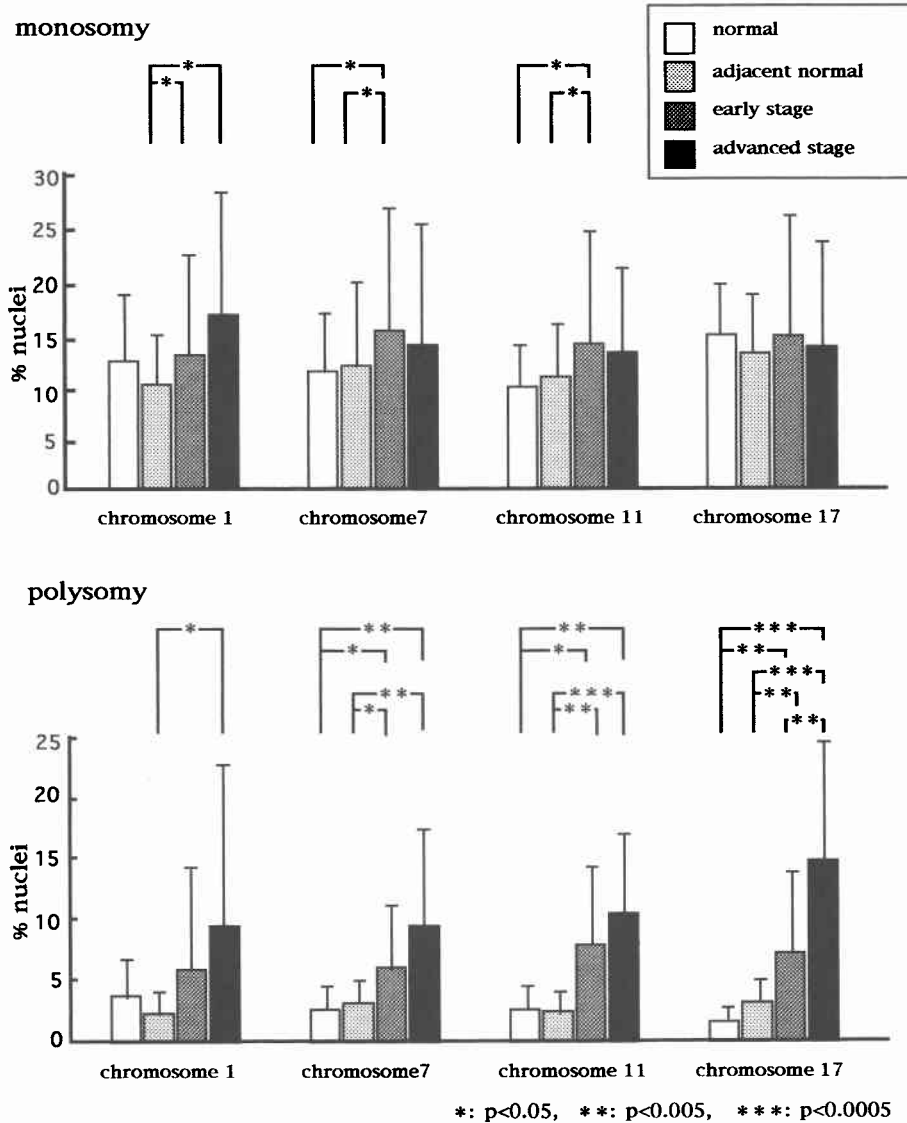
Fig. 3 Example of FISH on paraffin-embedded specimen of gastric cancer biopsy using a FITC-labeled centromere-specific probe to chromosome 17. There are two (disomy) and three (trisomy) signals observed. (left $\times 160$, right $\times 800$)



び癌近傍正常組織ともに正常組織での差は認められなかった。第1番, 第7番, 第11番染色体では癌細胞における1染色体性の占める割合はそれら正常組織に比較し有意に増加していた ($p < 0.05$)。

多染色体性の占める割合も正常組織に関しては1染色体性と同様差は認められなかった。しかしながら正常組織と癌細胞との間には第17番染色体を含めたすべての染色体で有意差を認め、多染色体性と悪性変化の

Fig. 4 Frequency distributions of fluorescence signal of chromosome 1, 7, 11 and 17 in normal, adjacent normal, and malignant (early and advanced stage) lesions. (above : monosomy, below : polysomy)



関連性がうかがわれた ($p < 0.0005 \sim p < 0.05$)。また早期癌，進行癌と，病期進行とともに増加する傾向もみられた。第17番染色体では早期癌と進行癌の間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

2) 臨床病理学因子との関係

今回検討を行った胃癌症例のうち切除が行われ，臨床病理学的因子との比較が行えた症例は30例であった (Table 1)。腹膜播種は6例に認められ，第1番および

第11番染色体の aneuploid 症例が有意に多いことが明らかとなった (おのおの $p = 0.005, 0.0379$)。リンパ節転移 (15例) 症例には，第7番，第11番，第17番染色体の polyloid 症例が有意に多く (おのおの $p = 0.0062, 0.0329, 0.0159$)，リンパ管浸潤陽性例 (16例) でも同様の結果となった (第7番， $p = 0.0372$ ；第11番， $p = 0.0459$ ；第17番， $p = 0.0011$)。静脈浸潤陽性は19例に認め，第17番染色体の polyloid 症例に有意に

Table 1 Relationship between clinicopathological factors and ploidy pattern.

factor	case number	ploidy pattern
patient number	30	
p	positive	◇ chr1 aneuploid** chr11 aneuploid*
	negative	
n	positive	chr7 polyploid** chr11 polyploid* chr17 polyploid*
	negative	
ly	positive	chr7 polyploid* chr11 polyploid* chr17 polyploid***
	negative	
v	positive	chr17 polyploid**
	negative	

◇ chr: chromosome *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005

多かった (p=0.0054).

考 察

今回の検討で、胃癌および大腸癌の染色体の数的異常が FISH 法により検討可能なことが示された。さらに FISH 法による染色体数解析が、胃癌の悪性度診断にも応用可能であることを示唆する結果も得られた。

従来より胃癌などの消化器系腫瘍で aneuploidy を示すものは転移を起こす割合が多く、その予後も不良とされてきた⁴⁾。

しかしながら、それらは主にフローサイトメトリーによる全染色体に関するものであった。細胞一つ一つに対して各染色体の数的異常の詳細な検討が求められ、その方法として FISH 法が目玉された。すでに FISH 法は頭頸部癌⁶⁾、大腸癌⁷⁾、前立腺癌⁸⁾、膀胱癌⁹⁾、乳癌¹⁰⁾などの固形腫瘍の染色体分析に有用と報告されている。Steine ら⁷⁾は25例の Astler-Coller 分類 C の大腸癌において第12番染色体の多染色体性の割合が第17番染色体のものより有意に多く、また1染色体性の割合も第17番染色体では第8、12番染色体に比べ、有意に多いことを報告している。進行期前立腺癌では第7番染色体数の異常が長期生存群に比べ予後不良群に有意に多いとの報告⁸⁾もある。また Voravud ら⁶⁾は25例の頭頸部扁平上皮癌の第7番染色体、第17番染色体数を解析し、癌近傍の前癌病変から癌に進行すると多染色体性の割合が増加するとしている。

われわれの胃癌および大腸癌の培養細胞株を用いた解析でも染色体数的異常が認められ、同一培養細胞株においても染色体から見ると heterogeneity のあることが確認された。癌細胞の染色体不安定性を示唆する所見と考えられ、FISH 法による染色体解析は個々の癌細胞の特性把握に有用であると考えられた。

培養細胞株で染色体分析が可能ことが確認されたため、応用として胃生検材料(ホルマリン固定パラフィン包埋切片)で FISH 法を試みることにした。現在、生検材料に FISH 法を適用した報告は、著者らが検索しえた限りでは、Takahashi ら¹¹⁾の前立腺癌の針生検材料と Frederic らの膀胱癌の生検に対するもの⁹⁾の2報告のみである。生検材料を用いた理由は、1) 生検組織は一般に採取後すぐに固定が行われ、DNA などの抗原の保存が良好であること、2) 得られた細胞数や DNA 量が少ない場合も FISH 法で評価が可能であること、3) 術前情報として染色体異常の程度が確認できること、にある。組織処理の方法として組織片を薄切し、組織構築を保ったまま FISH 法を行う方法と組織片より細胞を単離化し行う2通りの方法が考えられたが、われわれは前者を用いることにした。この方法では HE 染色と対比して検討できるため正常部と異常部の鑑別が容易である。薄切するため細胞が途中で切れてしまう短所があるが、後者では正常細胞と異常細胞が混入する恐れがある。特に胃生検材料では組織全体が癌でないことが多く混入した正常細胞の鑑別が困難となり精度が低下することが懸念される。両者の優劣は明確なものではないが、生検材料という限られた標本ではわれわれの方法が、より精度の高いものと考えている。切片の厚さに関してはすでに報告⁹⁾したように正常組織で最も2染色体性の示す割合が高いことから5μm を選択した。

第1、7、11、17番染色体に関して検討した結果、正常粘膜から早期癌、進行癌と癌の進行に応じて染色体数異常の割合が増加する傾向が認められた。また1染色体性、多染色体性、両者に異常を認める場合すなわち heterogeneity も認められ、癌の発生および進展に第1番、7番、11番および17番染色体数の異常に関連する可能性が示唆された。現在報告されているところでは第1番染色体の異常には進行胃癌の高分化腺癌で1qに50%、低分化腺癌で1pに38%の対立遺伝子の欠失¹²⁾が認められているほか、第7番染色体では進行胃癌の高分化腺癌で7qに39%の対立遺伝子の欠失¹²⁾が認められている。第7番染色体上には EGFR 遺伝子が存在する¹³⁾。11番では横紋筋肉腫の11p15.5-11pter¹⁴⁾、膀胱癌の11p¹⁵⁾および肺癌の11p¹⁶⁾に対立遺伝子の欠失が認められており、その染色体上には cyclinD 遺伝子¹⁷⁾の存在が報告されている。17番染色体では早期胃癌の高分化腺癌で17pに67%、低分化腺癌で60%の対立遺伝子の欠失¹²⁾が認められているほ

か、直腸癌の17p¹⁸⁾、小細胞癌の17p¹⁹⁾に対立遺伝子の欠失が認められ、その染色体上には p53²⁰⁾、erbB2²¹⁾遺伝子が存在する。

今回の検討では各染色体の同一変化は確認できず、染色体数の異常が癌の進行において単に染色体全体の不安定性を示すものなのか、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の増幅欠失などの何か進行における共通のものなのか、また heterogeneity による相互作用があるのかは明らかとはならなかった。しかしながら、手術の行われた30症例での検討では、リンパ節転移およびリンパ管浸潤は第7番、11番、17番染色体の polyploid 症例に有意に多く認められた。また腹膜転移に関しては第1番および11番染色体の aneuploid 症例、静脈浸潤に関しては第17番染色体の polyploid 症例に多く認められた。特定染色体の異常が胃癌の浸潤発展と何らかの関連がある可能性が示唆されたと思われる。

以上より、おのおのの染色体の数的異常が、胃癌の進展や転移と関連していると考えられた。生検組織を用いた検討も可能であったことから、術前の胃癌悪性度評価につながる所見と思われる。

染色体異常の解析が癌の悪性度や予後を示す指標となりえるか否かを確実に証明するためには、さらに症例を増やし臨床病理学因子との関係や特異的染色対座と染色体の関係などを明らかにしなければならない。今後さらに検討を重ねていきたいと考えている。

文 献

- 1) Poddighe PJ, Moesker O, Smeets D et al: Interphase cytogenetics of hematological cancer: Comparison of classical karyotyping and in situ hybridization using a panel of eleven chromosome specific DNA probes. *Cancer Res* 51: 1959—1967, 1991
- 2) Anastasi J, LeBeau MM, Vardiman JW et al: Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe. *Am J Pathol* 136: 131—139, 1990
- 3) Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934—2938, 1986
- 4) Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T et al: Correlation of DNA ploidy and clinical outcome in Borrmann type 4 gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 42: 1—4, 1989
- 5) 平林直樹, 入江秀明, 青儀健二郎ほか: 胃生検組織を用いた FISH 法による染色体異常の検出. *消化器癌* 4: 435—439, 1994
- 6) Narin V, Dong, MS, Jae YR et al: Increased polysomies of chromosome 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. *Cancer Res* 53: 2874—2883, 1993
- 7) Steine MG, Harlow SP, Colombo E et al: Chromosomes 8, 12, and 17 copy number in Astler-Coller stage C colon cancer in relation to proliferative activity and DNA ploidy. *Cancer Res* 53: 681—686, 1993
- 8) Alcaraz A, Takahashi S, Brown JA: Aneuploidy and aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Res* 54: 3998—4002, 1994
- 9) Frederic MW, Peter RC, Russel K et al: Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res* 51: 3807—3813, 1991
- 10) Olli PK, Anne K, Wayne K et al: ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5321—5325, 1992
- 11) Takahashi S, Qian J, Brown JA: Potential markers of prostate cancer aggressiveness detected by fluorescence in situ hybridization in needle biopsies. *Cancer Res* 54: 3574—3579, 1994
- 12) 田原榮一: ヒト胃癌の発生・増殖・進展—分子病理学的アプローチ—. *日病理会誌* 81: 21—49, 1992
- 13) Spurr NK, Solomon E, Jansson M et al: Chromosomal localization of the human homologues to the oncogene erb-A and B. *EMBO J* 3: 159—164, 1984
- 14) Scrabble HJ, Witte DP, Iampkin BC et al: Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature* 318: 645—647, 1987
- 15) Fearon ER, Feinberg AP, Hamilton SH et al: Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. *Nature* 318: 377—380, 1985
- 16) Shiraishi M, Morinaga S, Noguchi M et al: Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in human lung carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 78: 1302—1308, 1987
- 17) Motokura T, Bloom T, Kim HG et al: A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350: 512—515, 1991
- 18) Vogelstein B, Fearou ER, Hamilton SR et al: Genetic alterations during colorectal-tumor

- development. *N Engl J Med* 319 : 525—532, 1988
- 19) Yokota J, Wada M, Shimosato Y et al: Loss of heterozygosity on chromosome 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 9252—9256, 1987
- 20) Isobe M: Localization of the gene for human p53 tumor antigen to Band 17p13. *Nature* 320 : 84—85, 1986
- 21) Popescu NC, King CR, Kraus MH et al: Localization of human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21. *Genetics* 4 : 362—366, 1989

Analysis of Chromosomal Aberration of Gastric Cancer with FISH Technique

Hideaki Irie, Naoki Hirabayashi, Masahiko Nishiyama, Noriaki Sakamoto,

Kenjiro Aogi, Ryuji Kin and Tetsuya Toge

Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and
Medicine Hiroshima University

The efficacy of chromosomal analysis of gastric biopsy specimens was evaluated as a potential malignant marker by the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique which allows chromosomal analysis within interphase cells. Seventy-six gastric biopsy specimens were studied, and the chromosomal numerical aberration was analyzed by using centromere probes specific to chromosomes 1, 7, 11, 17, respectively. The fraction of monosomy and polysomy (more than 3 copies per cell) showed a tendency of an increase in chromosomes 1, 7, 11 and 17 as the clinical stage advanced according to the TNM classification. The relationship between ploidy pattern and clinicopathological factors was investigated in 30 surgical cases. In the patients with polyploid tumors of chromosomes 7, 11, and 17, we found that the incidence of lymph node metastasis and lymph ductal invasion was significantly high (chromosome 7: $p < 0.05$; chromosome 11: $p < 0.05$; chromosome 17: $p < 0.05$). In the patients with aneuploid tumors of chromosomes 1 and 11 we found that the incidence of peritoneal dissemination was significantly high (chromosome 1: $p < 0.01$; chromosome 11: $p < 0.05$). In the patients with polyploid tumors in chromosome 17 we found a statistically significant high incidence of venous invasion ($p < 0.01$). On the basis of these results, FISH analysis seems an effective method which could predict the malignant potential of gastric cancers before surgery.

Reprint requests: Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and
Medicine Hiroshima University
1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734 JAPAN
