

Intratumor heretogeneity of centromere numerical abnormality in multiple primary gastric cancers:Application of fluorescence in situ hybridization with intermittent microwave irradiation on paraffin-embedded tissue

著者	小林 恵子
雑誌名	浜松医科大学学報. 学位授与記録
巻	19
ページ	71-73
発行年	2002-03-26
URL	http://hdl.handle.net/10271/1222

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 369号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	小林 恵子		
論文題目	<p>Intratumor heretogeneity of centromere numerical abnormality in multiple primary gastric cancers : Application of fluorescence <i>in situ</i> hybridization with intermittent microwave irradiation on paraffin-embedded tissue (多発性家族性胃がんにおける散発性胃がんとの染色体の不安性の相違についての検討ーパラフィン切片における間欠的電子レンジ照射を用いた染色体特異性プローブによる FISH の応用ー)</p>		

博士(医学) 小林 恵子

論文題目

Intratumor heretogeneity of centromere numerical abnormality in multiple primary gastric cancers: Application of fluorescence *in situ* hybridization with intermittent microwave irradiation on paraffin-embedded tissue (多発性家族性胃がんにおける発散性胃がんとの染色体の不安性の相違についての検討 - パラフィン切片における間欠的電子レンジ照射を用いた染色体特異性プローブによる FISH の応用 -)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ヒトの腫瘍の遺伝的不安定性についてその機構や存否について長年にわたり議論が続いている。FISH法は、細胞レベルで遺伝子の発現やコピー数を同定するのに有用である。胃がんにおいては、散発性の例をもちい、第17番染色体や、第8番染色体を中心に染色体の数的異常の解析が行われてきた。最近、Kitayamaらにより、凍結標本であるが、ほぼ全染色体セントロメアを検出して染色体の数的異常の解析し、胃がんの進行段階による数的異常が報告された。さらに、以前は明瞭なシグナルを得ることが困難であったパラフィン切片に対し、間欠的にマイクロ波を照射することで良好な成績が得られたとする報告もあらわれた[Kitayama et al, *Laboratory Investigation*, 80, 779-781 (2000)]。

今回はこの手法をはじめて実際の過去の病理検体応用として、多発性かつ家族性の胃がんにおける染色体の数的異常を、散発性胃がんとの相違を比較しながら検討をおこなった。

〔方法〕

改良 FISH 法は、Kitayama らのプロトコールに従った。病理標本(6 μ mのパラフィン切片)に間欠的にマイクロ波を照射処理した後に、Cy3、Cy5で標識した Centromere Enumeration Probe (CEP) (Vysis 社)を用いてハイブリダイゼーションを行い、染色体の数的異常について検討した。解析対象は、胃がん大腸がん集積家系に属し、過去に数回の大腸がんの手術既往のある患者に生じた多発性胃がん組織(計4箇所)を用いた。また、この症例は、4箇所のがん組織のうち3箇所で、腫瘍内の組織学的不均一性をみとめた。この組織学的に異なる部分も含めて合計7箇所の腫瘍において染色体の数を計測した。評価法は、正常粘膜組織を含めて合計8箇所で、100ないし200個の細胞につき、核1個当たりの蛍光シグナル数をカウントし、ある異常シグナル数(1もしくは3以上)をもつ細胞が20%をこえた場合、異常ありと判定した。正常対照の粘膜組織では80%以上の細胞で核1個あたり2個のシグナルであることを確認した。

〔結果〕

本症例のがん組織4箇所のうち3箇所は、腫瘍内の組織学的不均一性をみとめた。この同一病巣内組織型の違いによる染色体数的異常について着目をしたところ、同一病巣内に、tubular adenocarcinoma, well differentiated type (tub1)と、tubular adenocarcinoma, moderately differentiated type (tub2)を有しているものでは、組織型が tub2の部分で、第11、18番染色体のシグナル数増加(いずれも trisomy)、第10、16番染色体のシグナル数減少(monosomy)の変化が認められた。がんの深達度による染色体数的異常については、深達度の早期より第3、4、17、18番染色体のシグナル数増加(いずれも trisomy)、第16番染色体のシグナル数減少(monosomy)を認めた。

〔結論〕

FISH法は、検体の細胞形態学的診断と同時に染色体数異常の分析が行える利点により、適応が広がっている。今回の研究に用いた改良FISH法では、従来シグナルの得にくいパラフィン切片標本も良好なシグナルを得ること可能となり、病理標本における染色体の数的異常の解析などさらに適応が広がると考えている。

以前の報告で、散発性胃がんにおいては、がんが進行しても変化の少なかった第3、18番染色体でも、本症例のような家族性多発性胃がん症例では早期の段階から数的異常を生じていることを見いだした。この知見が、本症例の組織像(たとえば、一部乳頭状であったこと)、家族性、多発性といった特徴と関連がある可能性があり、特徴的な染色体不安定性と考えられた。

論文審査の結果の要旨

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法はDNAのコピー数を調べるのに確実な手法であるが、最も一般的に普及しているホルマリン固定パラフィン包埋標本においては、必要な蛍光信号を得るのが困難であるという欠点があった。腫瘍のプロイディをDNAの量から調べる方法も広く行われているが、わずかなDNAの変化を染色量の変化として検出するのは信頼性が低く、FISH法の改善が望まれていた。この要請に答えるものとして、申請者らはマイクロ波照射をFISHに組み合わせる手法を開発した。本研究で申請者は、この手法を家族性多発性胃がん患者の初期がん組織に実際に応用し、セントロメアの数的異常を調べ、それぞれの組織型や組織不均一性との関係を調べた。

〔方法〕

大腸や直腸に多数のがんを生じて5回の手術を受け、その後に胃がんにもなった51歳の男性から摘出した4箇所のがん組織を、ホルマリン固定後にパラフィン包埋し、厚さ6 μ mの切片標本とした。切片の脱パラフィン後、マイクロ波による加熱の過程を加えた。4個の組織のうち3個には組織内不均一性が見られたので、組織型ごとに分けて標本を計7個とし、それらの染色体数異常を対応させて調べた。正常部の胃組織およびリンパ組織を対照標本とした。染色体10、11、16、それに18番のセントロメア検出プローブ(市販)を用いて、脱パラフィンした切片の染色を行った。間欠的なマイクロ波照射をすることで、プローブが染色体DNAと交雑する反応を促進した。核内のセントロメアの存在を蛍光輝点の信号として捉え、その数を2人の観察者によって独立に計数評価した。DNAをゲル上に展開して、18個の異なるマイクロサテライトのプローブを用いてバンドを検出し、ヌクレオチド・レベルでの微小な変異も平行して調べた。

〔結果〕

正常標本では、用いた全ての染色体特異性プローブについて2個のセントロメア信号を出す細胞が80%以上を占めた。これに対してがん組織では、大きな数的異常が認められた。組織型が異なるところでは、染色体別の数的異常を持つものの組が異なっていた。粘膜下への深達度との対応では、初期の組織から第3、4、17、18番染色体のシグナル数が増加し3コピー数になっているものが多く、第16番染色体のシグナル数は1コピーに減少していた。組織型が管状I型の部分では、18番の染色体は正常であったが、10番と16番でシグナル数の減少(monosomy)がみとめられた。組織型が管状II型の部分で、第11と第

18番染色体のシグナル数の増加(いずれも trisomy)、第10,16番染色体のシグナル数減少(monosomy)の変化が認められた。マイクロサテライトを調べたところ、すべてのがん組織片において、1ヌクレオチドまたは2ヌクレオチドの変異が2箇所以上にみとめられた。

[考察]

本法はHE染色によって通常の組織形態学的診断を行ったその同じ標本について、染色体の数的異常を対応させて調べられる利点があり、これを、家族性多発性がんの患者の組織に応用した結果、これまで調べられなかった染色体不安定性に関する基本的なデータが得られた。

審査委員会は、マイクロ波処理をしたパラフィン切片でのFISH法のもつ利点を症例に応用し、頻発するがんにも脳まされる実際の患者の遺伝子の不安定性に関する基礎データを得たことを評価した。また、同一がん組織の中にも染色体数の異常パターンに異なるものが混在することを初めて示した点の評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) マイクロ波法はパラフィン以外の包埋材の切片に対して応用できるか
- 2) マイクロ波照射で背景蛍光は抑えられるか
- 3) 交雑反応の際のマイクロ波照射の効果を42度以下に抑える理由
- 4) 蛍光シグナルのカットオフ値の決定になぜリンパ球を使ったのか
- 5) 腫瘍の特徴である核の不均一性は蛍光シグナルの計数精度に影響を与えないか
- 6) がん組織の分化の程度を決めるのにどのような形態上の特徴を用いたか
- 7) 蛍光シグナルを計測する組織の範囲をどのように決めたか
- 8) 複数の計測者による蛍光シグナルの計数のばらつきはどのくらいだったか
- 9) セントロメア・シグナルの欠失をその染色体の欠失と解釈する根拠
- 10) 正常な体細胞を用いた遺伝子診断は可能であったか
- 11) 本症例の腫瘍の元は単クローン性か多クローン性か
- 12) 本症例の腫瘍はリンチの分類では何型か

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 寺川 進
副査 橋本 賢二 副査 小林 隆夫