

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法 を用いた胃がん悪性度評価と臨床応用に関する 基礎的検討

入 江 秀 明

広島大学原爆放射能医学研究所・病態治療部門 (腫瘍外科)
(主任: 峠 哲哉教授)
受付 平成7年11月6日
受理 平成7年12月15日

FISH 法によるヒト胃がんの悪性度評価およびその臨床への応用を目的として、胃生検標本59例の第1, 7, 11, 17番染色体数的異常, および Dual-color FISH 法による sm 胃がん切除例20例の第17番染色体とp53遺伝子の数的異常を同時に解析し, 以下の結果を得た。

1. 胃生検標本に対して FISH 法が可能であり, 第1, 7, 11, 17番染色体解析では, 胃がんの近傍正常組織には, monosomy および polysomy を示す細胞の割合の増加は認めず, 染色体の数的変化は認めなかった。
2. 第1, 7, 11番染色体における monosomy, および第1, 7, 11, 17番染色体における polysomy を示す細胞の割合は, 正常組織とがん組織の間では有意な差を認め ($p < 0.0005 \sim p < 0.05$), がんの進行に応じて増加する傾向にあり, これらの染色体の数的異常が, がんの発生進展に関与している可能性が示唆された。
3. 手術例31症例と臨床病理学因子との比較検討では, 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 ($p < 0.005 \sim p < 0.05$), 腹膜転移は第1番および11番染色体の aneuploid 症例 (各々 $p < 0.01, p < 0.05$), 静脈浸潤は第17番染色体の polyploid 症例に多く認められた ($p < 0.01$)。このことから特定染色体の数的異常が胃がんの浸潤進展に関与している可能性が示唆された。
4. 核1個につき第17番染色体数に対し, p53 の遺伝子数が少ない場合を欠失 (deletion) と定義した場合, 欠失を示す細胞の割合は, sm 胃がんでコントロールに比較し有意な増加を認め ($p < 0.0005$), さらにリンパ節転移陽性例が陰性例に比較し有意な増加を認めた ($p < 0.005$)。したがって, 胃がん細胞のリンパ節転移には p53 欠失細胞の存在が深く関与している可能性が示唆された。

以上の結果から, 胃生検組織を対象とした第17番染色体, p53 遺伝子および他の遺伝子に対する FISH法解析をすることによる, 1) 前がん病変の悪性度評価, 2) 術前で m, sm 胃がんと診断された症例における悪性度判定, 特にリンパ節転移の有無の術前判定への臨床応用の可能性が示された。

Key words : FISH, Dual-color FISH, Fluorescence in situ hybridization, Gastric cancer, Biopsy

発がんやがんの進展に染色体や遺伝子異常の蓄積が関わっていることが以前から指摘されており, DNA ploidy といったがん細胞レベルの異常と予後の密接な関係が諸臓器で報告されている²⁴。また多くのがん腫でp53遺伝子の異常が報告され^{12,19,34,38}, がんの悪

性度, 予後, 転移との相関が示唆されている^{8,39}。したがってp53 遺伝子の機能を解明することが, 診断・治療のうえでも重要な問題であると考えられる。しかしながら, DNA ploidy や p53 遺伝子の解析はフローサイトメーターやサザンブロット法等の分子生物学的

手法により行われており、これらの方法による解析の対象となるのは腫瘍細胞個々ではなく腫瘍組織全体である。

近年、細胞個々において染色体や遺伝子の数的異常の解析が可能な方法²⁰⁾として Fluorescence in situ hybridization 法 (以下 FISH 法と略す) が開発され、腫瘍細胞の染色体解析の方法として急速に応用されつつある。FISH 法を用い細胞個々の各種染色体と p53 の異常を解析することは、がん細胞に特異的な情報を得るために重要であると考えられる。また p53 遺伝子の存在している第17番染色体と p53 遺伝子の数的異常の同時解析も、発がんおよびがんの進展を理解するうえで、さらには臨床的悪性度を評価する点でも極めて興味深いと考えられる。そこで、本報において、1) 胃がん生検標本に対して FISH 法が可能か否か、2) 胃がんや消化器系腫瘍等の発生進展に関与している可能性が考えられる第123,30), 711,29,30), 114,18,25,27), 177,21,23,30,32,37) 番染色体について、胃がん生検標本で染色体数的異常と進行度に関係があるか否か、3) 胃がん標本で Dual-color FISH 法を用いることにより染色体の異常に加え p53 の数的異常を同時に検出可能か、および 4) sm 胃がん切除標本において第17番染色体と p53 遺伝子の数的異常と病理学因子との間に関係があるかについて解析し、FISH 法による胃がん悪性度評価および臨床応用への可能性について検討した。

材料と方法

1. 材料

1989年2月から1993年10月の間に広島大学医学部附属病院で施行された胃生検組織59例、計 77 病変を染色体数に関する検討の対象とした。その内訳は早期がん24病変、進行がん25病変、正常組織10病変 (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)、がん近傍正常組織18病変である。また第17番染色体および p53 遺伝子相互の数的異常に関する検討 (Dual-color FISH 法) に対しては1988年4月より1991年10月までに広島大学原研腫瘍外科において切除された sm 胃がん切除例20例 (リンパ節転移陽性10例、陰性10例)、コントロールとして胃生検正常組織10病変 (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) を対象とした。

2. 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ビオチン標識プローブ D1Z5, D7Z1, D11Z1,

D17Z1 (Oncor, Inc., USA) および p53 (17p13.1) に対するジゴキシゲニン標識プローブ (Oncor, Inc., USA) の各々を使用した。

3. スライド標本作製法

ホルマリン固定パラフィン包埋組織を 5 μm に薄切した^{6,13)}。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親水させた。0.25%緩衝トリプシン (GIBCO, BRL) で37°C 6~12時間 酵素処理を行い、0.5 μg/ml Propidium iodide (Molecular Probes, Inc., USA) にて核染色を行い、核周囲の蛋白消化の程度が弱い場合には脱水後さらに0.5%ペプシン (SIGMA, USA), 10 μg/ml Proteinase K (SIGMA, USA) 処理を加えた (5分間 37°C)。

4. FISH法

1) セントロメア (第1, 7, 11, 17番染色体数) に関する検討

Pinkel ら²⁰⁾の方法に準じ、FISH 法を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/2xSSC (300 mM sodium chloride and 30 mM sodium citrate) にて pH7.0, 70~75°C, 10分間熱変性後素早く70%エタノール (-20°C) で3分間冷却、上昇エタノール列にて脱水後風乾した。次いで70°Cで熱変性した染色体セントロメアに対するビオチン標識プローブを、スライド上に加え、加湿槽内で37°C, 4~16時間ハイブリダイゼーションを行った。2xSSCにて70°C (pH7.0) 5分間洗浄を行った後、室温にて2xSSCで8分間1回洗浄、PBD [0.5% Triton X (東京化成), 0.5% Tween 20 (和光純薬), 0.5% Nonidet P-40 (SIGMA, USA)/2xSSC] 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 で2分間3回洗浄後、0.8 μg/ml Propidium iodide による核染色を行った。

2) 第17番染色体数およびp53遺伝子数に関する検討 (Dual-color FISH法)

スライド標本に対して1) と同様に上昇エタノール列にて脱水後風乾し、70%ホルムアミド/2xSSCにて70~75°C, 10分間熱変性後、素早く70%エタノール (-20°C) で3分間冷却、上昇エタノール列にて脱水後風乾した。次いで70°Cにて熱変性した第17番染色体セントロメアに対するビオチン標識プローブおよび37°C, 30分間保温しておいたp53に対するジゴキシゲニン標識プローブを同量スライド上に加え、加湿槽内で37°C, 24~48時間ハイブリダイゼーションした。2xSSCで70°C5分間洗浄を行った後、室温で8分間1回洗浄、PBD に5分間浸した後、Texas Red 標識アビジン

(Oncor, Inc., USA) および FITC 標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Oncor, Inc., USA) にて37°C, 20分間発色反応を行った。発色が弱い場合にはビオチン標識プローブは抗アビジン抗体 (Oncor, Inc., USA), Texas Red 標識アビジン (Oncor, Inc., USA) よって各々37°C, 20分間処理し、またジゴキシゲニン標識プローブに対しては抗ヒツジ抗体 (Oncor, Inc., USA), FITC 標識抗ウサギ抗体 (Oncor, Inc., USA) よって各々37°C, 20分間処理し、蛍光を増幅した。ついで PBD で2分間3回洗浄後、0.8 μg/ml 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (SIGMA, USA) にて核染色を行った。

5. 判定法

第1, 7, 11, 17 番染色体数に関しては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生検組織で腫瘍組織が十分ではない場合もあるため50~100個とした。核1個につき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) とし細胞個々についてその核型を評価した。正常組織における各染色体の monosomy あるいは polysomy の細胞の占める割合の最大値 (monosomy: 第1番染色体, 23.5%; 第7番染色体, 24.8%; 第11番染色体, 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、臨床応用を目的とするため、もっとも有意差のある値を1染色体性優位 (monoploid) 症例あるいは多染色体性優位 (polyploid) 症例の cut off 値として設定した。monoploid 症例の cut off 値は、それぞれ第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。polyploid 症例のそれは、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。またその両方が多いものを異染色体性 (aneuploid) 症例とした。第17番染色体およびp53遺伝子数に関しては核1個あたりの FITC (p53) および Texas Red (第17番染色体) のシグナルを同時に算定した。観察細胞数は100~200個とした。この際核1個につき第17番染色体のシグナル数より、p53のシグナル数が少ない場合を欠失 (deletion) と定義した。染色体数の検討と同様に正常組織における monosomy, polysomy の最大値 (monosomy, 19.8%; polysomy, 5.3%) を基準として cut off 値を1染色体性優位 (monoploid) 症例で20%, 多染色体性優位 (polyploid) 症例で6%と設定した。また正

常組織における p53 の減少 (loss), 増加 (gain), あるいは欠失した細胞 (deletion) の占める割合の最大値 (loss, 22.8%; gain, 2.8%; deletion, 21.1%) を基準として cut off 値を p53 減少症例で23%, 増加症例で3%, 欠失症例22%と設定した。また核の変形、重複のあるものは観察細胞から除外した。

有意差の検定にはセントロメア (第1, 7, 11, 17番染色体数) に関する検討では Student's t 検定および χ^2 検定を用い、第17番染色体および p53 遺伝子数に関する検討では Mann-Whitney 検定を用いた。monosomy, polysomy, p53 loss, p53 gain および deletion を示す細胞の割合の平均値に関する表記はすべて mean \pm SD とした。

結 果

1. セントロメア (第1, 7, 11, 17番染色体数) に関する検討

1) 核型分析

第1, 7, 11, 17 番染色体セントロメアに対するプローブを使用し FISH 法を施行した。全症例において明確な FITC のシグナルが確認できた (Fig. 1)。5 μm 切片を作成して材料としたため、正常組織でも monosomy の占める細胞の割合を、第1番、第7番、第11番、第17番染色体の各々で、13.0 \pm 6.5%, 11.8 \pm 5.5%, 10.3 \pm 3.7%, 15.4 \pm 4.8%認めた。polysomy の占める細胞の割合も各々、3.9 \pm 2.6%, 2.6 \pm 2.0%, 2.6 \pm 1.8%, 1.6 \pm 1.4%認めた。1染色体性の占める割合を肉眼的進行度別に比較すると、検討したいずれの染色体においても正常組織とがん近傍正常組織の間には数的に有意な差異は認められなかった (Fig. 2)。しかしながら、第1, 7, 11番染色体においては1染色体性の占める割合は正常組織、早期がん、進行がんと進行に応じて増加する傾向がみられ、正常組織とがん組織の間には有意な差を認めた ($p < 0.05$)。

多染色体性の占める割合を同様に肉眼的進行度別に比較すると (Fig. 2), いずれの染色体においても1染色体性同様に正常組織とがん近傍正常組織の間には有意な差異は認められなかった。しかしながら、検討したすべての染色体において正常組織、早期がん、進行がんと進行に応じて増加する傾向がみられ、正常組織と早期がん、進行がんの間には有意な多染色体性を示す細胞の割合の増加を認めた ($p < 0.0005$ ~ $p < 0.05$)。また第17番染色体においては早期がんと進行がんの間には多染色体性を示す細胞の割合の有意な差を認めた ($p < 0.005$)。

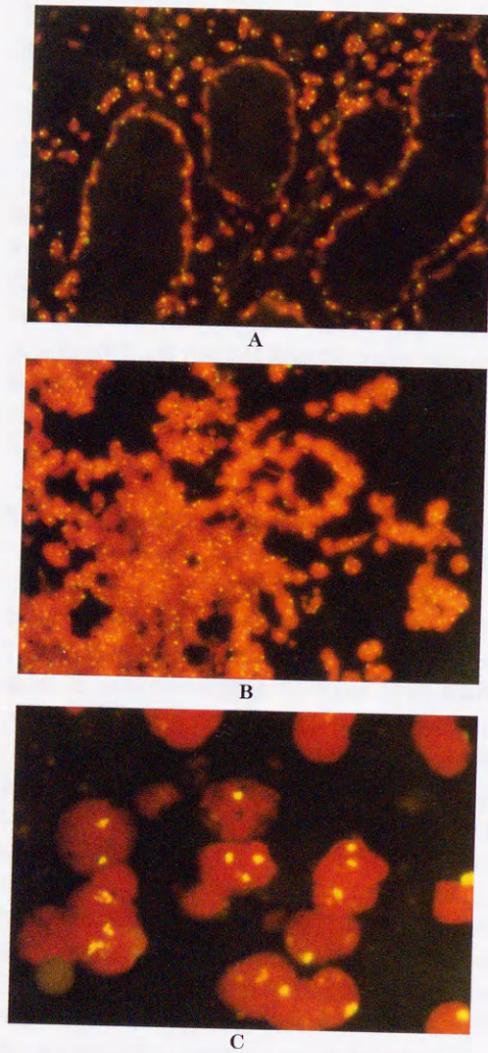


Fig. 1. Example of FISH on paraffin-embedded specimen gastric biopsy using a FITC-labeled centromere-specific probe to chromosome 17. **A;** normal tissue ($\times 160$), **B;** early gastric cancer ($\times 160$), **C;** early gastric cancer ($\times 800$). There are two (disomy) and three (trisomy) signals observed.

2) 臨床病理学因子との関係

セントロメアの数的異常の検討を行った胃がんのうち、切除が行われ臨床病理学的因子との比較検討ができた症例は31症例(早期がん10例、進行がん21例)であった(Table 1)。腹膜播種は6例に認め、第1番お

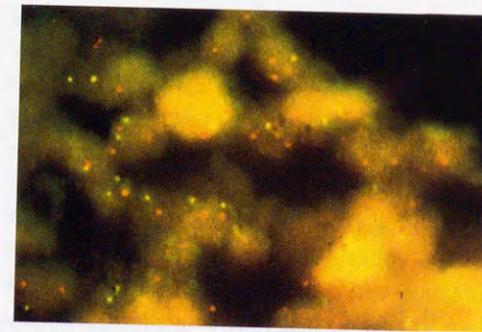


Fig. 3. Example of dual-color FISH on paraffin-embedded specimen gastric cancer biopsy using p53 probe (green) and centromere-specific probe to chromosome 17 (red) ($\times 800$).

Table 1. Relationship between clinico-pathological factors and chromosomal ploidy pattern in 31 gastric cancer cases

factor	No. of cases	difference in ploidy pattern
p		
positive	6	chr 1 aneuploid**
negative	25	chr11 aneuploid*
n		
positive	15	chr 7 polyploid**
negative	16	chr11 polyploid* chr17 polyploid*
ly		
positive	16	chr 7 polyploid*
negative	15	chr11 polyploid* chr17 polyploid***
v		
positive	19	chr17 polyploid**
negative	12	

P, peritoneal dissemination; n, lymphnode metastasis; ly, lymphoductal invasion; v, venous invasion; chr, chromosome; *, p<0.05; **, p<0.01, ***, p<0.005

よび11番染色体の aneuploid 症例に有意に多く(各々 p<0.01, p<0.05), リンパ節転移は15例に認め、第7番, 11番, 17番染色体の polyploid 症例に有意に多かった(各々 p<0.01, p<0.05, p<0.05)。リンパ管浸潤には16例に認め、第7番, 11番, 17番染色体の polyploid 症例に有意に多く(各々 p<0.05, p<0.05, p<0.005), 静脈浸潤は19例に認め、第17番染色体の polyploid 症例に有意に多かった(p<0.01)。また早期がんのみの検討では、P, n, ly, v 各因子とも有意差を認めなかった。

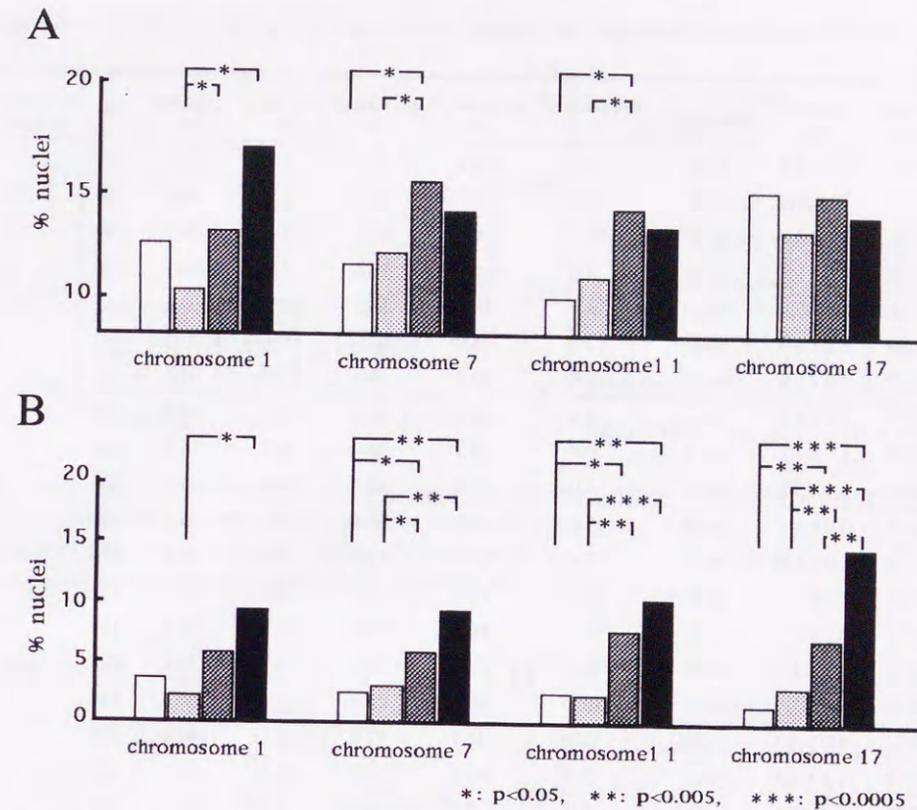


Fig. 2. Frequency distributions of fluorescence signal of chromosome 1, 7, 11 and 17 in normal, adjacent normal, and malignant (early and advanced stage) lesions (**A;** monosomy; **B;** polysomy). □; normal; ▨; adjacent normal; ▩; early stage; ■; advanced stage

2. 第17番染色体およびp53遺伝子数に関する検討 (Dual-color FISH法)

1) 核型分析

Dual-color FISH 法を施行したすべての症例で、細胞個々について第17番染色体と p53 遺伝子の数の増減が同時に確認できた。蛍光顕微鏡下では第17番染色体セントロメアは赤色のシグナル (Texas Red) に、p53 は緑色 (FITC) のシグナルとして認められた (Fig.3)。5 μm 切片を作成して材料としたため、正常組織でも monosomy, polysomy, p53 loss, p53 gain および p53 deletion の占める細胞の割合を、各々 19.3 ± 8.5%, 1.3 ± 2.1%, 7.0 ± 10.3%, 0.5 ± 1.1%, 13.0 ± 8.8% 認めた。Table 2の如く monosomy 症例は20例中1例 (5.0%) のみに認められ、その例の monosomy 細胞の占める割合は20.5%であった。polyploid 症例は20例中17例 (85.0%) に認められ、各症例での polysomy 細胞の占める割合は24.2 ± 8.0%であった。p53

減少症例は20例中19例 (95.0%) に認められ、各症例での p53 の減少した細胞の占める割合は 40.0 ± 10.8%であり、p53 増加症例は20例中13例 (65.0%) に認められ、各症例でのp53の増加した細胞の占める割合は 10.5 ± 5.4%であった。欠失症例は20例中20例 (100.0%) に認められ、各症例での欠失細胞の占める割合は 44.0 ± 12.6%であった。またリンパ節転移の有無別にみると、monosomy 症例は陽性例の10例中1例 (10.0%) のみに認められ、その例の monosomy 細胞の占める割合は20.5%であった。polyploid 症例はリンパ節転移陰性例と陽性例では各々10例中9例 (90.0%), 10例中8例 (80.0%) に認められ、各症例での polysomy 細胞の占める割合は各々23.9 ± 9.5%, 24.8 ± 6.4%であった。p53 減少症例では各々10例中9例 (90.0%), 10例中10例 (100.0%) に認められ、各症例でのp53の減少した細胞の占める割合は各々32.3 ± 7.6%, 46.8 ± 8.5%であり、p53 増加症例は各々10例

Table 2. Relationship between pathological factors and chromosome 17 and p53 gene in gastric cancer with sm invasion.

case No.	sex/age (yr)	tumor size	pathology ^a	monosomy ^b %	polysomy ^c %	p53 loss ^d %	p53 gain ^e %	deletion ^f %	N ^g	lymphnode ^h metastasis
1	M/60	3.7×2.2	well	3.5	31.6	61.4	1.8	68.4	114	
2	M/55	10×6.0	well	7.3	20.3	55.1	7.3	58.0	138	
3	M/71	5.0×3.0	well	15.1	0	35.8	0	30.2	106	
4	M/77	2.3×1.8	por	9.0	16.0	49.5	3.2	54.8	176	
5	F/74	1.0×0.5	por	20.5	18.0	37.9	3.7	40.4	161	n+
6	M/80	2.2×2.0	mod	12.0	4.0	56.0	0	60.0	101	
7	M/77	4.0×2.9	well	3.6	29.1	46.8	7.1	56.7	141	
8	M/71	3.2×2.8	por	12.4	21.6	43.3	2.1	48.5	175	
9	F/82	1.2×1.2	mod	9.8	30.1	39.8	6.5	55.3	123	
10	M/51	2.4×2.8	mod	7.0	31.3	42.1	10.3	52.8	150	
11	M/75	3.0×1.5	mod	17.8	19.8	41.6	2.0	44.6	101	
12	F/74	2.0×1.0	well	7.8	11.7	47.6	0	46.6	103	
13	F/76	1.3×1.1	por	15.9	17.4	29.0	13.0	27.5	138	
14	F/54	3.2×2.2	por	16.3	18.5	32.6	15.2	27.2	124	
15	M/52	1.8×1.7	well	12.2	17.1	24.4	9.76	24.4	123	n-
16	M/80	2.0×1.4	mod	10.2	30.5	28.8	11.9	35.6	118	
17	M/55	2.0×0.9	mod	12.4	31.4	27.6	18.1	41.0	105	
18	M/65	4.1×2.3	mod	3.3	42.1	15.7	21.5	33.7	121	
19	M/76	6.0×5.8	por	3.9	2.94	33.3	1.96	34.3	102	
20	M/46	6.5×6.0	por	7.5	26.2	26.2	11.2	39.3	107	

a: well, well differentiated tubular adenocarcinoma; mod: moderately differentiated tubular adenocarcinoma; por, poorly differentiated tubular adenocarcinoma

b: the fraction of nuclei having 1 centromeric signal of chromosome 17 per nucleus

c: the fraction of nuclei having greater than 2 centromeric signals of chromosome 17 per nucleus

d: the fraction of nuclei having 0 or 1 p53 signal per nucleus

e: the fraction of nuclei having greater than 2 p53 signal per nucleus

f: the fraction of nuclei having less p53 signals than that of centromere of chromosome 17 per nucleus

g: total number of nuclei scored per tumor

h: n+; lymphnode metastasis positive, n-, lymphnode metastasis negative

中7例 (70.0%), 10例中6例 (60.0%) に認められ, 各症例でのp53の増加した細胞の占める割合は14.4±4.2%, 各々6.3±2.6%であった。欠失症例は各々10例中10例 (100.0%), 10例中10例 (100.0%) に認められ, 各症例での欠失細胞の占める割合は各々35.4±7.5%, 52.5±10.7%であった。polyploid 症例, p53 減少症例, p53 欠失症例が高頻度に認められた。同一症例内で浸潤先進部, 中心部, 辺縁部での比較検討を行ったところ, 各部位は同様な傾向を示し有意な差は認めなかった。

次に第17番染色体セントロメアの数的異常と病理学因子とくにリンパ節転移との関係を比較検討したとこ

ろ (Fig. 4), 各症例毎の monosomy を示す細胞の割合はコントロール, リンパ節転移陰性例, 陽性例の間に有意な差を認めなかった。polysomy を示す細胞の割合はsm胃がんではコントロールと比較し, 有意な増加を認めたが (リンパ節転移陰性例: $p<0.0005$, 陽性例: $p<0.0005$), リンパ節転移陰性例と陽性例の間に有意な差は認められなかった。p53 の数的異常とリンパ節転移との関係をみると (Fig. 5), 各症例毎のp53 のシグナル数が1個以下の細胞 (p53 loss) の割合は, sm胃がんではコントロールと比較し, 有意な増加を認め (リンパ節転移陰性例: $p<0.01$, 陽性例: $p<0.0005$), さらにリンパ節転移陽性例では陰性例と比較し, 有意

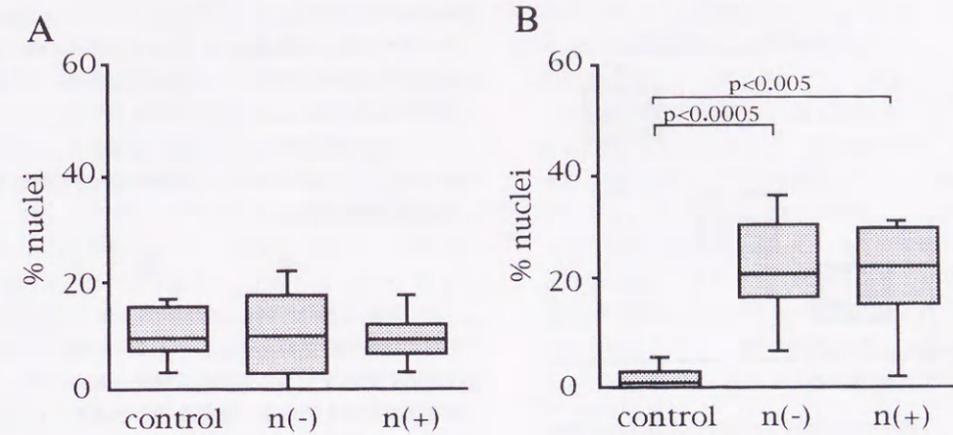


Fig. 4. Frequency distributions of fluorescence signal in controls and gastric cancers with sm invasion (n (-); lymphnode metastasis negative; n(+); lymphnode metastasis positive).

A; monosomy (cells with 1 centromeric signal of chromosome 17)

B; polysomy (cells with 3 or more centromeric signals of chromosome 17)

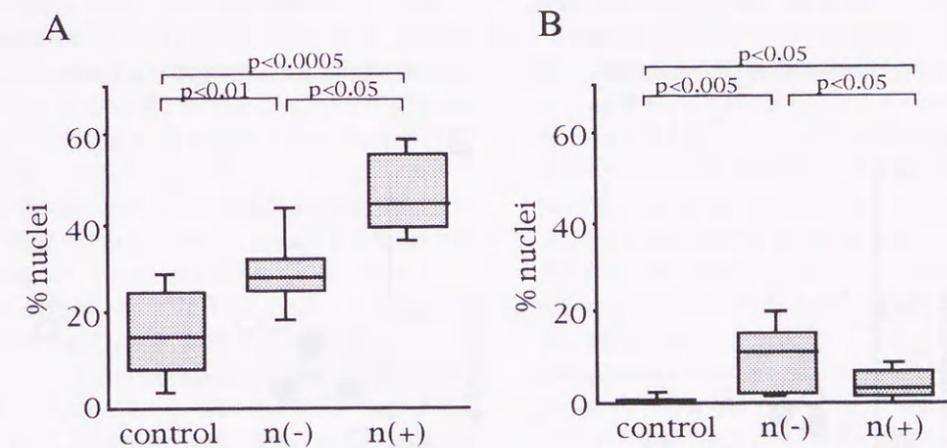


Fig. 5. Frequency distributions of fluorescence signal in controls and gastric cancers with sm invasion (n(-); lymphnode metastasis negative; n(+); lymphnode metastasis positive).

A; p53 loss (cells with 0 or 1 signal of p53)

B; p53 gain (cells with 3 or more signals of p53)

な増加を認めた ($p<0.05$)。p53のシグナル数が3個以上の核(p53 gain)の割合では, リンパ節転移陰性例がコントロールに比較し ($p<0.005$), またリンパ節転移陰性例が陽性例に比較し ($p<0.05$), 有意な増加を認めた。p53のシグナル数が第17番染色体セントロメアの数より少ない場合を欠失と定義し, 症例毎に欠失細胞の割合とリンパ節転移との関係をみると (Fig. 6),

欠失細胞の割合は sm 胃がんではコントロールと比較し, 有意な増加を認め (リンパ節転移陰性例: $p<0.0005$, 陽性例: $p<0.0005$), さらにリンパ節転移陽性例が陰性例に比較し, 有意な増加を認めた ($p<0.005$)。

2) 腫瘍径, 組織型およびリンパ節転移との検討
p53の欠失細胞の割合とその他病理学的因子との関

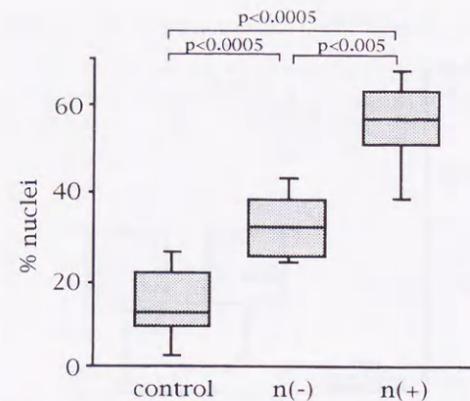


Fig. 6. Frequency distributions of fluorescence signal of deletion of p53 in controls and gastric cancers with sm invasion. Deletion was defined as when p53 signals was less than 17 centromeric signals (n (-); lymphonode metastasis negative : n(+); lymphonode metastasis positive).

係をリンパ節転移陰性例と陽性例との間で比較検討した (Fig. 7)。腫瘍の最大径と組織型(組織学的所見により高分化、中分化および低分化腺がん)に分類し、乳頭

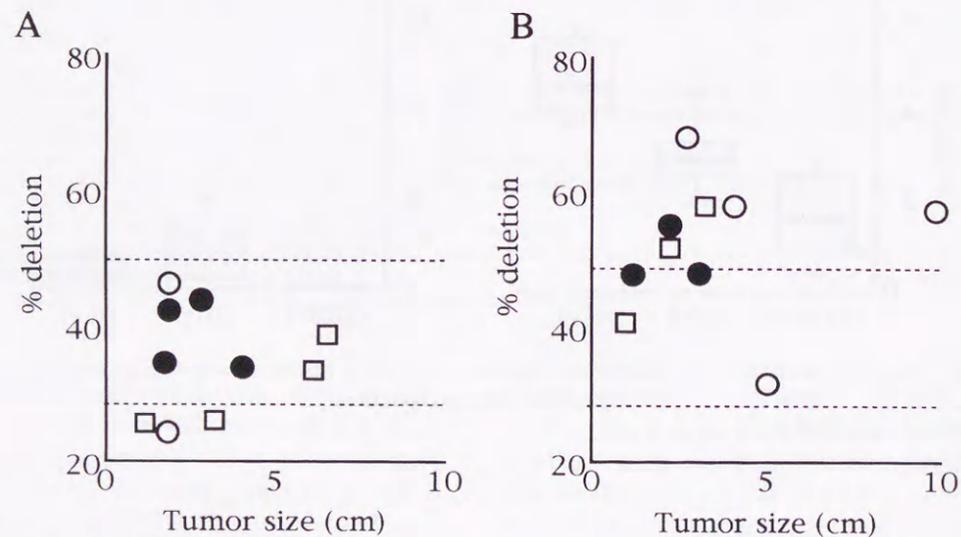


Fig. 7. Comparison of p53 deletion, tumor size, and histological type with lymphonode metastasis (%deletion; the fraction of nuclei having less p53 signals than 17 centromeric signals). ○; well, well differentiated tubuler adenocarcinoma; ●; mod, moderately differentiated tubuler adenocarcinoma; □; por, poorly differentiated tubuler adenocarcinoma

A; lymphonode metastasis negative

B; lymphonode metastasis positive

-----: upper line, 50%; lower line, 30%

腺がんは高分化腺がん、印環細胞がんは低分化腺がんの一型とした)との関係について検討したところ、腫瘍の最大径と組織型ではリンパ節転移陰性例と陽性例の間に差を認めなかった。ところが欠失の割合をみるとリンパ節転移陰性例に50%以上の欠失を示す症例は認めず、リンパ節転移陽性例ではp53の欠失が30%以下の症例は認められなかった。

考 察

固形腫瘍において染色体を解析することは分子生物学的手法を用いてがん遺伝子・がん抑制遺伝子の発現の有無を検査することと同様に発がんおよびがんの進展を理解する上で非常に重要なことと考えられる。ところが固形腫瘍の場合、組織の大部分は分裂期以外の細胞、すなわち間期細胞であり、分裂期細胞が得られにくく、染色体解析を行う上で最大の問題であった。最近、分裂期だけでなく分裂間期においても染色体や遺伝子の数的異常の解析が可能な方法²⁰⁾として FISH法が開発され、固形腫瘍に対しても急速に応用されつつある。これまで頭頸部がん³³⁾、前立腺がん²⁾、膀胱がん³⁵⁾、乳がん⁶⁾等について FISH法による固形腫瘍の特定染色体異常が報告されている。予後に関して、

Waldman ら³⁵⁾は膀胱がん27例で第7番染色体の多染色体性のある例は有意に予後が不良であったとしている。また発がんに関して、Voravud ら³³⁾は25例の頭頸部扁平上皮がんの第7番染色体、第17番染色体数を解析し、がん近傍の前がん病変からがんに行くと多染色体性の割合が増加したとしている。しかしながら、FISH法を用いた胃がんなどの消化器系腫瘍に対する染色体解析の報告はまだ少ない¹⁾。そこで著者は対象として胃がんを選択し、FISH法を用い、第1, 7, 11, 17番染色体の数的異常について検討を行った。これらの染色体の異常に関して、第1番染色体では胃がんで対立遺伝子の欠失が報告されているほか、第7番染色体でも胃がんで対立遺伝子の欠失^{14,23,30)}が認められており、またその染色体短腕上には EGFR 遺伝子が存在している²⁹⁾。第11番染色体では、横紋筋肉種で 11p²⁵⁾、膀胱がんで 11p⁴⁾および肺がんで 11p²⁷⁾に対立遺伝子の欠失が認められており、その染色体長腕上には cyclinD 遺伝子の存在が報告されている¹⁸⁾。第17番染色体でも胃がんで対立遺伝子の欠失^{23,30)}が認められているほか、直腸がんで 17p³²⁾、肺小細胞がんで 17p³⁷⁾の対立遺伝子の欠失が認められ、その染色体短腕上には p53⁷⁾、長腕上には erbB2 遺伝子の存在が報告されている²¹⁾。したがって、これらの染色体の異常が胃がんの発生進展に関与している可能性が高いと判断し、今回の検討に用いた。

正常粘膜とがん近傍正常粘膜の間の検討では、すべての染色体において1染色体性および多染色体性ともに有意な差は認められなかったことより、第1, 7, 11, 17番染色体に関しては胃がんの近傍正常組織においては数的変化は起きていないことが示唆された。一方、1染色体性の占める割合は第1, 7, 11番染色体に関しては正常粘膜から早期がん、進行がんとの進行に応じてその割合が増加する傾向にあり、正常組織とがん組織の間には有意な差が認められた。多染色体性の占める割合においては第1, 7, 11, 17番すべての染色体に関して正常粘膜から早期がん、進行がんとの進行に応じてその割合が増加する傾向にあり、正常組織とがん組織の間に有意な差が認められた。これらの結果から、染色体の第1, 7, 11, 17番染色体の1染色体性および多染色体性の占める割合の増加が、がんの発生に関与していることが示唆された。また第17番染色体の多染色体性においては早期がんと進行がんの間でも有意な増加を認め、第17番染色体の異常ががんの進展にも深く関わっている可能性が考えられた。

手術の行われた31症例において臨床病理学因子と染色体数的異常との比較検討を行った結果、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 症例が多かった。症例数が少なく組織型も含めた他の因子についての検討が十分にできなかったが、少なくともこれらの結果は特定染色体数の異常が胃がんの浸潤進展と関連している可能性が示唆されたと考えられる。以上から、第17番染色体では多染色体性を示す細胞の増加が早期がんと進行がんの間で唯一有意差を認め、さらにこの染色体の polyploid 症例はリンパ節転移およびリンパ管浸潤の頻度が有意に高いことが示された。

したがって第17番染色体に注目し、より詳細な解析をするために Dual-color FISH法を用い、sm 胃がん20例について第17番染色体短腕上にある p53 遺伝子と染色体数の相互の異常の関連について検討を行った。解析は施行したすべての標本で細胞個々について第17番染色体と p53 遺伝子の数の増減が同時に確認が可能であり、polyploid 症例 (85.0%)、p53減少症例 (95.0%) および p53 欠失症例 (100.0%) が高頻度に認められた。polysomy を示す細胞の割合をコントロールと sm 胃がんとの間で比較検討したところ、両者の間に有意な差を認めなかった。先の胃生検組織(進行胃がんを含む)の染色体数と臨床病理学因子との検討では第17番染色体の polyploid 症例にリンパ節転移を有意に多く認めたのに対し、この sm 胃がんの polysomy の検討ではリンパ節転移陰性例と陽性例の間に有意差を認めなかった。このことより第17番染色体の polysomy は発がんに関与しているがリンパ節転移に関与している可能性は少なく、これに伴っておこる他の因子が関わっている可能性が示唆された。

今回の Dual-color FISH法による p53 遺伝子と第17番染色体の数に関する検討では、各々の核毎に観察すると p53 遺伝子数は0~4個の範囲で、第17番染色体数は1~4個の範囲で算定され、その組合せは多種にわたり認められた。そこで第17番染色体と p53 遺伝子の関連を解析する目的で、核1個につき第17番染色体数に対し、p53の遺伝子数が相対的に少ない場合(第17番染色体の monosomy の場合も含む)を欠失(deletion)と定義し、欠失細胞の占める割合をリンパ節転移の有無に関して比較検討した。その結果、リンパ節転移陽性例での割合は陰性例に比較し有意に増加していた。このことより、胃がん細胞のリンパ節転移には p53 遺伝子数の減少や第17番染色体数の増加だけでは

なく, p53 遺伝子数が第17番染色体数より少ない細胞(欠失)の存在が深く関与している可能性が示唆された。

Dual-color FISH 法による他の報告例として Kallioniemi ら⁹⁾は44例の乳癌の捺印標本を用い, 第17番染色体上に存在する erbB2 および第17番染色体セントロメアに対するプローブを同時に用い, 10例に erbB2 の数の増加を認め, それは免疫組織染色と一致したとしている。また Matsumura ら¹⁵⁾は19例の乳がんに対し p53 と第17番染色体セントロメアに対するプローブを同時に用いた dual-color FISH 法を行い, 乳がんにおける対立遺伝子の欠失の主な機構は染色体の欠失であったとしている。このように, Dual-color FISH 法は点変異は解析できない半面, 特定遺伝子数の増加・減少と ploidy の変化が細胞個々で同時に解析できることが有用である。

がん抑制遺伝子の一つである p53 遺伝子は第17番染色体短腕上に存在し, 11個の exon を有している²²⁾。この遺伝子は393個のアミノ酸を code しており, 生物活性として特定の DNA や蛋白との結合による転写制御が報告されている²⁸⁾。すなわち様々な遺伝子を直接・間接的に制御することにより細胞増殖を抑制していると考えられる^{35,17)}。ヒトの多くの種類のがんで p53 遺伝子の異常が報告されており¹⁶⁾, 臨床的に p53 の異常はがんの悪性度, 予後評価, 転移に相関があるといわれている¹²⁾。胃がんの p53 の異常に関しても多くの報告³⁸⁾がなされており, Martin ら¹⁴⁾および米村ら³⁹⁾はp53蛋白の過剰発現のある例では有意に予後不良であり, 肝・リンパ節転移が有意に多かったとしている。また, p53 遺伝子の点変異の頻度は PCR 法等の方法により解析され, 0-38%と報告されており^{10,26,36)}, 対立遺伝子の欠失, Loss of heterozygosity (LOH) に関してはp53遺伝子を含む17pの LOH は組織型および進行度と関係なく胃がんの60%以上に起きていると報告されている^{23,30)}。さらに, DNA ploidy に関して, Tamura ら³¹⁾は p53 遺伝子の変異のある例はすべて aneuploid であったとしている。本研究では, 胃がん細胞のリンパ節転移には p53 遺伝子数の減少や第17番染色体数の増加だけではなく, p53 遺伝子数が第17番染色体数より少ない細胞の存在(欠失)が深く関与している可能性が示唆された。この原因は不明であるが, 今後第17番染色体機能または第17番染色体上の p53 に関連する特定遺伝子座の解析が必要であると考えられる。

p53 の欠失の現象が早期胃がんでおきていることや欠失の割合が腫瘍径や組織型に関与せず, リンパ節転

移陽性例で有意に増加していることから以下の様な臨床への応用が考えられる。すなわち, 胃生検組織での第17番染色体数セントロメア, p53 遺伝子および他の遺伝子に対する FISH 法解析をすることによる, 1) 前がん病変の悪性度評価, 2) 術前で m, sm 胃がんと診断された症例における悪性度判定, 特にリンパ節転移の有無の術前判定である。

結 語

FISH 法により胃生検標本59例の第1, 7, 11, 17 番染色体数異常を解析し, さらに Dual-color FISH 法により sm 胃がん切除例20例の第17番染色体と p53 遺伝子の数的異常を同時に解析し, 以下の結果を得た。

1. 胃生検標本に対して FISH 法が可能であり, 第1, 7, 11, 17 番染色体解析では胃がんの近傍正常組織では, 染色体の数的変化は認めなかった。
2. 第1, 7, 11 番染色体における monosomy, および第1, 7, 11, 17 番染色体における polysomy を示す細胞の割合は, がんの進行に応じて増加する傾向にあり, 正常組織とがん組織の間では有意な差を認めた。
3. 手術例31症例の検討では, 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, 腹膜転移は第1番および11番染色体の aneuploid 症例, 静脈浸潤は第17番染色体の polyploid 症例に有意に多く認められ, 特定染色体数の異常が胃がんの浸潤進展に関連している可能性が示唆された。
4. p53 の欠失を示す細胞の割合は, sm 胃がんのリンパ節転移陽性例では陰性例に比較し有意な増加を認め, sm 胃がんのリンパ節転移に p53 の欠失が深く関与している可能性が示唆された。
5. 胃生検組織での第17番染色体数セントロメア, p53 遺伝子および他の遺伝子に対する FISH 法解析をすることによる, 1) 前がん病変の悪性度評価, 2) 術前で m, sm 胃がんと診断された症例における悪性度判定, 特にリンパ節転移の有無の術前判定への臨床応用が考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 終始懇篤なるご指導, ご校閲を賜った恩師, 峠 哲哉教授, 並びに適切なご助言を頂いた広島大学原爆放射能医学研究所分子生物部門分子細胞遺伝研究分野, 鎌田七男教授, 田中公夫博士に深甚なる謝意を捧げます。また本研究にあたり終始ご協力, ご助言頂いた平林直樹講師, 教職員および技

術員各位に深く感謝いたします。

本論文の主旨は第8回国際細胞分化学会(広島, 1994), 第46回日本消化器外科学会(福井, 1995), 第54回癌学会(京都, 1995)において発表した。

参 考 文 献

1. 阿部 薫 1995. FISH (fluorescence in situ hybridization) による胃癌染色体数的異常の検索. J. Jpn. Soc. Cancer Ther. 30 : 897-904.
2. Alcaraz, A., Takahashi, S., Brown, J. A., Herath, E. J., Larson-Keller, J. J., Liever, M. M. and Jenkins, R. B. 1994. Aneuploidy and Aneusomy of chromosome 7 detected by fluorescence in situ hybridization are markers of poor prognosis in prostate cancer. Cancer Research 54 : 3998-4002.
3. El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75 : 817-825.
4. Fearon, E. R., Feinberg, A. P., Hamilton, S. H. and Vogelstein, B. 1985. Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in bladder cancer. Nature 318 : 377-380.
5. Fields, S. and Jang, S. K. 1990. Presence of potent transcription activating sequence in the p53 protein. Science 249 : 1046-1049.
6. 平田恵三, 田川 泰, 鹿島清隆, 木戸川秀生, 辻孝, 出口雅浩, 森永真史, 原 信介, 宮下光世, 富田正雄 1995. 乳癌における7番染色体数的異常の解析 — パラフィン切片による FISH —. Cytometry Research 5 : 27-31.
7. Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M. and Croce, C. M. 1986. Localization of the gene for human p53 tumor antigen to Band 17p13. Nature 320 : 84-85.
8. Kakeji, Y., Korenaga, D., Tsujitani, S., Baba, H., Anai, H., Maehara, Y. and Sugimachi, K. 1993. Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. Br. J. Cancer 67 : 589-593.
9. Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Kurisu, W., Thor, A., Chen, L. C., Smith, H. S., Waldman, F. M., Pinkel, D. and Gray, J. W. 1992. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 : 5321-5325.
10. Kim, J. H., Takahashi, T., Chiba, I., Park, J. G., Birrer, M. J., Roh, J. K., De-Lee, H., Kim, J. P., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. 1991. Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. J. Natl. Cancer Inst. 83 : 938-943.
11. Kuniyasu, H., Yasui, W., Yokozaki, H., Akagi, M., Akama, Y., Kitahara, K., Fujii, K. and Tahara, E. 1994. Frequent loss of heterozygosity of the long arm of chromosome 7 is closely associated with progression of human gastric carcinomas. Int. J. Cancer 59 : 597-600.
12. Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. and Griffith, J. 1995. p53 and its 14kDa c-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. Cell 81 : 1013-1020.
13. Macoska, J. A., Trybus, T. M., Sakr, W. A., Wolf, M. C., Benson, P. D., Powell, I. J. and Pontes, J. E. 1994. Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer. Cancer Research 54 : 3824-3830.
14. Martin, H. M., Filipe, M. I., Morris, R. W., Lane, D. P. and Silvestre, F. 1992. p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. Int. J. Cancer 50 : 859-862.
15. Matsumura, K., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O., Chen, L., Smith, H. S., Pinkel, D., Gray, J. and Waldman, F. M. 1992. Deletion of chromosome 17p loci in breast cancer cells detected by fluorescence in situ hybridization. Cancer Res. 52 : 3474-3477.
16. 光富徹哉, 千葉逸朗 1992. 腫瘍抑制遺伝子とその臨床腫瘍学における意義. 蛋白質 核酸 酵素 37 : 1491-1505.
17. Miyashita, T. and Reed, J. C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell 80 : 293-299.
18. Motokura, T., Bloom, T., Kim H. G., Juppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M. and Arnold, A. 1991. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. Nature 350 : 512-515.
19. 村上義則 1992. 肝癌 p53 と RB. 肝胆膵 25 : 1105-1110.
20. Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 2934-2938.
21. Popescu, N. C., King, C. R. and Kraus, M. H. 1989. Localization of human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. Genetics 4 : 362-366.
22. Raycroft, L., Wu, H. Y. and Lozano, G. 1990. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutations of the p53 anti-oncogene. Science 249 : 1049-1051.
23. Sano, T., Tsujino, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Haruma, K., Ito, H., Nakamura, Y.,

- Kajiyama, G. and Tahara, E. 1991. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Research* 51 : 2926-2931.
24. 澤井 猛, 渡部 洋, 池田正典 1995. 卵巣がんにおける DNA ploidy および細胞増殖能と治療効果との関連性. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.* 30 :647-656.
25. Scabble, H. J., Witte D. P., Lampkin, B. C. and Cavenee, W. K. 1987. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature* 318 : 645-647.
26. Seruca, R., David, L., Holm, R., Nesland, J. M., Fangan, B. M., Castedo, S., Sobrinho, S. M. and Borresen, A. L. 1992. p53 mutations in gastric cancer. *Br. J. Cancer* 65 : 708-710.
27. Shiraishi, M., Morinaga, S., Noguchi, M., Shimosato, Y. and Sekiya, T. 1987. Loss of genes on the short arm of chromosome 11 in human lung carcinoma. *Jpn. J. Cancer Research* 78 : 1302-1308.
28. Soussi, T., Caron, F. C. and May, P. 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5 : 945-952.
29. Spurr, N. K., Solomon, E., Jansson, M., Sheer, D., Goodfellow, P. N., Bodmer, W. F. and Vennstrom, B. 1984. Chromosomal localization of the human homologues to the oncogene erb-A and B. *EMBO J.* 3 : 159-164.
30. 田原榮一 1992. ヒト胃癌の発生・増殖・進展 — 分子病理学的アプローチ —. *日本病理学会会誌* 81 : 21-49.
31. Tamura, G., Kihana, T., Nomura, K., Terada, M. Z., Sugimura, T. and Hirohashi, S. 1991. Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer research* 51 : 3056-3058.
32. Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M. and Bos, J. L. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319 : 525-532.
33. Voravud, N., Shin, D. M., Ro, J. Y., Lee, S. J., Hong, K. I. and Hittelman, W. N. 1993. Increased polysomies of chromosome 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis. *Cancer Research* 53 : 2874-2883.
34. Wagata, T., Shibagaki, I., Imamura, M., Shimada, Y., Toguchida, J., Yandell, D. W., Ikenaga, M., Tobe, T. and Ishizaki, K. 1993. Loss of 17p, mutation of the p53 gene, and overexpression of p53 protein in esophageal cell carcinomas. *Cancer Research* 53 : 846-850.
35. Waldman, F. M., Carroll, P. R., Kerschmann, R., Cohen, M. B., Field, F. G. and Mayall, B. H. 1991. Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Research* 51 : 3807-3813.
36. Yamada, Y., Yoshida, T., Hayashi, K., Sekiya, T., Yokota, J., Hirohashi, S., Nakatani, K., Nakano, H., Sugimura, T. and Terada, M. 1991. p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases. *Cancer Research* 51 : 5800-5805.
37. Yokota, J., Wada, M., Shimosato, Y., Terada, M. and Sugimura, T. 1987. 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.
38. Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Kitadai, Y., Nishiyama, K., Todo, H., Ayhan, A., Yasui, W., Ito, H. and Tahara, E. 1992. p53 point mutations in primary human gastric carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119 : 67-70.
39. 米村 豊, 伏田幸夫, 津川浩一郎, 二宮 致, 加治正英, 宮崎逸夫 1993. 胃癌におけるp53遺伝子異常. *Oncologia* 26 : 417-425.

Clinico-pathological Study of Fluorescence in Situ Hybridization on Assessment of Malignant Potential and its Clinical Application in Gastric Cancer

Hideaki IRIE

Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University
(Director: Prof. Tetsuya TOGE)

The efficacy of fluorescence in situ hybridization (FISH) on alteration of chromosome and p53 gene was evaluated as a potential malignant marker and its clinical application in 59 gastric cancer specimens. The results are the followings:

- 1) Numerical chromosomal aberrations in gastric biopsy specimens could be detected with FISH. There was no significant difference concerning the fraction of monosomy and polysomy between normal and adjacent normal tissues in gastric tumor specimens.
- 2) There was a significant difference concerning the fraction of monosomy in chromosome 1, 7, 11 and polysomy (more than 3 copies per cell) in chromosome 1, 7, 11, 17 between normal and tumor tissues. These fractions were significantly increased in tumors with advanced stages according to the TNM classification. These results indicate that the chromosomal numerical aberrations may involve in tumorigenesis and its development.
- 3) Regarding 31 surgical specimens, the significant high incidences of lymph node metastasis and lympho-vascular invasion were observed in polyploid tumors in chromosome 7, 11 and 17. The significant high incidence of venous invasion was observed in polyploid tumors in chromosome 17. The significant high incidence of peritoneal dissemination was observed in aneuploid tumors in chromosome 1 and 11. These results suggest that the specific numerical aberrations of chromosomes may involve in invasion and development of gastric tumors.
- 4) Using dual-color fluorescence in situ hybridization in 20 early gastric cancers, a significant increase of the fraction of p53 deleted cells was observed in gastric cancer with sm invasion than that of normal tissues. More importantly, a significant increase of the fraction of p53 deletion was observed in lymph node positive gastric cancers with sm invasion. This finding suggests that lymph node metastasis may be associated with the deletion of p53 gene in early gastric cancer.
- 5) Based on these results, dual-color FISH analysis with gastric biopsy specimens seems an effective method which could predict malignant potential of premalignant lesion, and that of gastric cancers with m and sm invasion before operation, especially concerning lymph node metastasis.