Detection of gene amplification in solid carcinomas by fluorescence in situ hybridization (FISH)

金沢大学十全医学会雑誌　第114巻　第4号　142－143（2006）

【研究報告】

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いた固形癌における遺伝子増幅の検討-分子標的療法を視野にいれて

Detection of gene amplification in solid carcinomas by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

金沢大学大学院医学系研究科分子細胞病理学
(旧講座名：病理学第一)

大　井　章　史

Ⅰ．緒言

In situ hybridizationは染色体，細胞あるいは組織上で特定の核酸の検出を行なう方法であり，抽出した核酸を膜に写し取って検出をおこなうblot hybridizationと区別される．従来の*in situ* hybridizationでは放射性同位元素で標識したプローブと写真乳剤を用いたオートラジオグラフィが用いられてきたが，露出に数週間が必要なこと，標的と乳剤の距離および放射線の飛程のために分解能が悪いこと，また放射性同位元素を取り扱う上での煩雑さが問題であった．Fluoresence *in situ* hybridization (FISH) 法では放射性同位元素に替わって蛍光色素を標識に用いる為，これらの短所がなくなったばかりでなく，異なった蛍光色素で標識された複数のプローブをもちいた多色FISHも可能となった．FISH法による染色体転座の検索は白血病やリンパ腫の診断に使われており，c-*erb*B-2 (*HER2/neu*) 遺伝子の増幅の検索は転移乳癌における抗HER2ヒト化モノクローナル抗体 (traszumab, Herceptin) の適応をきめるための必須の検査となっている．

Ⅱ．FISH法でみる癌遺伝子の増幅

哺乳動物では，高度増幅した遺伝子はhomogeneously staining region (HSR) やdouble minute chromosomes (DMs) に存在することが知られている．分裂間期の核のFISH像を観察すると，HSRを有する細胞核ではシグナルが一個ないしは数個の凝集となって見え，DMを有する細胞核ではシグナルが核にほぼ均等に分散されて認められる．(図1) 癌組織から単離した細胞核や，組織切片を用いたFISHでも凝集シグナルや多数の分散したシグナルが分裂間期核に認められることが多く，我々は「HSR型」,「DM型」と呼んでいる.[1] (図2)

Ⅲ．固形癌の遺伝子的多様性

パラフィン包埋組織を使ったFISHの利点は，組織像や免疫染色と対応させ，個々の細胞レベルの遺伝子の変化を検索できることである．(図3) 固形癌では，癌の成長に伴って，染色体の多倍体化，転座，欠失，及び増幅などの大きな細胞遺伝学的な変化が起こる．このなかのいくつかはホルマリン固定パラフィン包埋切片を使ったFISH法で検出可能であり，癌細胞クローンの染色体マーカーになると考えられる．言うまでもなく，癌細胞は癌細胞から生まれるのであり，この染色体マーカーは代々子孫に受け継がれていく．癌のprogressionの過程では，新しい染色体異常を持ったクローンが次々と生まれて，様々な選択がかかるなかで，増殖に有利であれば，その異常をもったクローンは優勢となってくると考えられる．固形癌では組織内で細胞の移動はかなり制限を受けると思われるので，完成した癌組織のところどころに癌の進化の過程，言い替えればclonal expansion の跡をたどることができると予想される．FISHは腫瘍組織像に新しい解釈を与え，腫瘍診断学に大いに役立つと考えられる.[2]

Ⅳ．FISH法の臨床応用

c-*erb*B-2は別名*HER2/neu*とも呼ばれ，細胞膜上のHER2蛋白をコードしている．このHER2蛋白は，次に述べるepidermal growth factor receptor (EGFR, 別名HER1) や，HER3, HER4蛋白とともに成長因子受容体型チロシンキナーゼ (growth factor receptor tyrosine kinase, GFRTK) のEGFR familyに属している．HER2蛋白に結合するgrowth factor は詳らかにされていないが，legandが結合するとhomodimerを形成するか，他のEGFR family蛋白とheterodimerを形成する．Dimerの形成がおこると，HER2のチロシンキナーゼが自己リン酸化によって活性化され，キナーゼの連鎖的活性化によるシグナル伝達が核に及ぶ．c-erbB-2遺伝子の増幅は細胞膜上でのHER2蛋白の過剰発現を通じて細胞の自律的増殖もたらす，この意味でc-erbB-2遺伝子は遺伝子増幅によって癌遺伝子として働くのである．乳癌の20－30％でこのHER2蛋白の過剰発現すなわちc-*erb*B-2遺伝子増幅があることが知られていたが，1990年にHER2蛋白の細胞外ドメインに対するヒト化モノクローナル抗体 (trasuzumab, Herceptin) が開発され乳癌の治療に用いられるようになった．正確なメカニズムは不明ながらも，trasuzumabの効果が見られる乳癌はHER2蛋白の過剰発現のあることは異論は無い．しかしながら，免疫染色で直接発現している蛋白を見る方法と，FISH法で遺伝子増幅を調べ間接的に蛋白の過剰発現を知る方法のいずれが，trasuzumab治療の対象を選択する方法として適当か議論があった．Sensitivity, specificity, 簡便さ，経済性，客観性等の点からの議論の末，今日では，免疫染色でスクリーニングを行い，偽陽性（一から3＋の4段階評価のうち2＋）症例についてFISH法で検討を行なう事が推奨されている．我々はFISH法を使って，乳癌[3,4]以外にも胃癌，[5]肺癌，[6]大腸癌，[7]胆道癌[8]でc-*erb*B-2の増幅を調べた結果それぞれ，7.1％，1.1％，3.3％，6.3％に明らかな遺伝子増幅を認め，ほぼ全例で蛋白の過剰発現をみている．すなわち，これらの癌ではc-*erb*B-2遺伝子の高度増幅は，多量のHER2蛋白の細胞膜上での発現を起こしていると考えられる．本邦では胃癌患者の死亡数は乳癌患者の約5.7倍であり，trasuzumabが乳癌と同様にc-*erb*B-2の遺伝子増

幅のある胃癌に有効であれば，はるかにおおくの治療対象があることになる.[5] ぜひとも解明がまたれる分野である.

EGFR蛋白はHER2の同様にGFRTKの一つであり，EGFをリガンドとする．*EGFR*遺伝子は7p12にあり，この増幅と蛋白過剰発現は脳の神経芽腫に30－50％の高頻度にみられる．各種の癌におけるEGFR蛋白の発現を調べた報告は多いがHER2と同様に報告者によってその頻度に著しい差がみられる．一方，FISH法で*EGFR*の遺伝子増幅を見た研究は著しく少ない．我々は胃癌，[5] 肺癌，[9] 大腸癌，[7] 胆道癌，[8] 食道癌[10]についてFISH法によるEGFRの増幅を調べた結果それぞれ，1.7％，

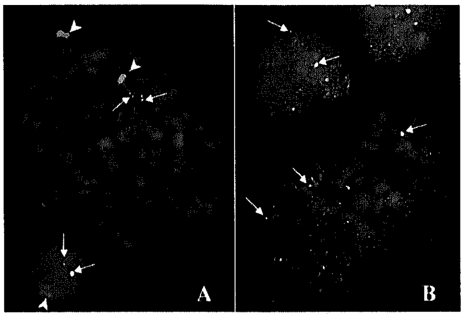

図1．K-sam遺伝子プローブ（赤色蛍光）（矢頭）とセントロメア10（緑色）（矢印）を用いた2色FISH．A: 胃癌培養細胞株KATOIIIのHSRはKsam遺伝子プローブで標識されており、間期核ではシグナルの凝集となってあらわれる．B: 胃癌培養細胞株SNU16の染色体外に散らばったDMにKsamが証明され，間期核では均等に分散した数十のシグナルが認められる．

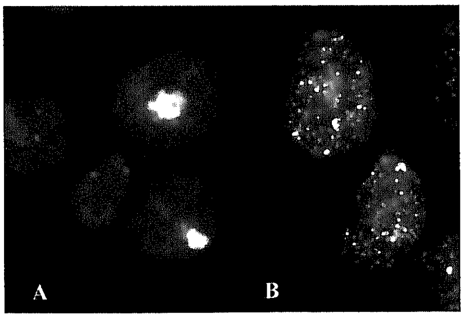

図2．A: 大腸癌にみられた*EGFR*遺伝子の「DM型」増幅。B: 食道癌にみられた*EGFR*遺伝子の「HSR型」増幅。

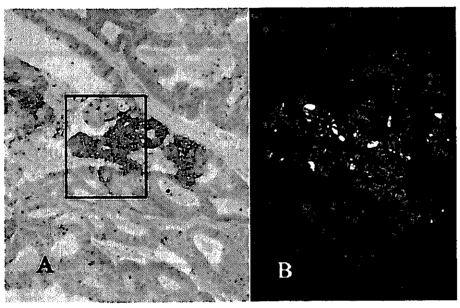

図3．大腸癌連続切片を用いたEGFR蛋白の免疫染色（A）とEGFR遺伝子のFISH法による検索（Aで四角に囲んだ部分に相等する）（B）．遺伝子増幅と蛋白過剰発現のある癌細胞は一致していいる．

21.4%，4.5％，5.3％，11.7%に明らかな遺伝子増幅を認め，全例に高度の蛋白の過剰発現を細胞膜上に確認している．しかし，蛋白の過剰発現は約2倍頻度が高く，遺伝子増幅を伴わずにEGFRの蛋白過剰発現がおこる場合もあると考えられる．EGFR蛋白の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体（IMC-C225, cetuximab）は大腸癌の治療薬として2004年に米国で承認を受けている．EGFR蛋白の過剰発現の有無や，特に*EGFR*遺伝子の増幅を伴った高度の蛋白発現とcetuximab治療効果に差が無いか是非とも検索すべきであろう.[11]

トポイソメラーゼⅡα（トポⅡα）はDNAの複製に際して，二重鎖を切断，鎖通過，再結合を行なう酵素で，アントラサイクリン系制癌剤の標的物質である．トポⅡα遺伝子（TO2A）は17番染色体17q21-22にあり17q12-21のc-*erb*B-2遺伝子と近接して存在している．c-*erb*B-2の増幅を認める乳癌では，アントラサイクリン系薬剤の感受性が高いこと，[12] TO2Aの遺伝子増幅が大部分c-*erb*B-2の増幅にともなっておこることから，c-*erb*B-2と同時に増幅したTO2A遺伝子がアントラサイクリンの感受性を高めていると考えられている．Jaervinenらは，[12] FISHによる，TOP2Aとc-*erb*B-2遺伝子の同時増幅と，ウェスタンブロットでみたトポⅡα過剰発現は相関することを報告しており，我々の結果も同様であった．しかしながら，我々の結果では，TOP2A増幅と免疫染色でみたトポⅡα標識率には相関は無かった．トポⅡαはDNAの複製の重要な酵素であり，厳重な転写や翻訳段階の制御を受けていると考えられる，従ってc-*erb*B-2やEGFRと異なり遺伝子増幅が直ちに，免疫染色で明確になる程度にこの酵素の発現をもたらさないことは理解できる．しかし，免疫染色とウェスタンブロットの結果の相違の原因は不明である．乳癌におけるアントラサイクリン系薬剤の感受性のマーカーとしていずれを選択すべきかは今後の研究による．

Ⅵ．展望

Trasuzumabによる分子標的療法が始まり多くの臨床データーが蓄積されつつある．我々はtrasuzumabが乳癌の肝転移巣に奏功した症例で，c-*erb*B-2増幅の無い癌細胞のクローナルな増殖がおこったことをFISHを施行し確認している．[13] FISH法による癌クローンの多様性の検索は，治療効果の判定にも応用されclonal heterogeneityを視野にいれたよりきめ細かなtailored therapyに貢献できると考えている．

文　　献

1） Hara T et al. Lab Invest 1998, 78: 1143-1153.
2） Ooi A et al. Lab Invest 1998, 78: 345-351.
3） Kobayashi M et al. Hum Pathol 2002, 33: 21-28.
4） Kunitomo K et al.. Pathol Int 2002, 52: 451-457.
5） Takehana T et al., Int J Cancer 2002, 98: 833-837.
6） Hirashima N et al., Mod Pathol 2001, 14: 556-562.
7） Ooi A, et al. Mod Pathol 2004, 17: 895-904.
8） Nakazawa K et al. J Pathol 2005, 206: 356-365.
9） Suzuki S et al. Cancer 2005, 103: 1265-1273.
10） Hanawa M et al. Int J Cancer 2006, 118: 1173-1180.
11） Takehana T et al. Clin Gastroenterol Hepatol 2003, 1: 438-445.
12） Jaervinen TA et al. Am J Pathol 2000, 156: 839-847.
13） Kunitomo K et al. Hum Pathol 2004, 35: 379-381