

CGH と in situ cytogenetics による 未分化型胃癌の染色体解析

(課題番号 : 11670174)

平成 11 年度～平成 12 年度科学研究補助金 [基盤研究 (C)(2)]
研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 杉 原 洋 行
(滋賀医科大学医学部・助教授)

滋賀医科大学附属図書館



2000018550

は し が き

研究組織

研究代表者：杉原洋行（滋賀医科大学・医学部・助教授）
（研究協力者：岡田勝治、神谷純広、中村悦子、馬場正道）

研究経費：

平成 11 年度	800 千円
平成 12 年度	1,000 千円
計	1,800 千円

研究発表

(1) 学会誌等

- ・ 杉原洋行 蛍光による DNA の定量的解析：CGH と FISH から in situ cytogenetics へ 電子顕微鏡 34 (Suppl. 2) : 101-104, 1999.11.
- ・ 杉原洋行 FISH による癌ゲノム DNA の定量的解析 日本臨床細胞学会近畿連合会誌 8:27-42, 2000.10
- ・ 杉原洋行 CGH の定量的解析：Interphase karyotyping への試み Cytometry Research 11(1), 2001 (発表予定)
- ・ Okada K, Suighara H, Bamba M, Bamba T, Hattori T, Sequential numerical changes of chromosomes 7 and 18 in diffuse-type stomach cancer cell lines: combined comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization and ploidy analyses. Cancer Genetics and Cytogenetics, 118: 99-107, 2000
- ・ Bamba M, Sugihara H, Kushima R, Okada K, Tsukashita S, Horinouchi M, Hattori T, Time dependent expression of intestinal phenotype in signet ring cell carcinomas of the human stomach. Virchows Arch 438: 49-56, 2001

(2) 口頭発表

- ・ 杉原洋行、 FISH による癌ゲノム DNA の定量的解析 第 25 回日本臨床細胞学会近畿連合会 1999. 9.11.
- ・ 杉原洋行、他、 CGH 解析における G/R 比のダイナミックレンジ 日本組織細胞化学会第 40 回記念学術集会 1999.12.6.

- ・ Okada K, Sugihara H, et al., Copy number analysis of chromosomal regions by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization in diffuse type stomach cancer cell lines. 7th United European Gastroenterology Week, 1999.11.15.
- ・ 岡田勝治、杉原洋行、他、 Diffuse type 胃癌細胞株における DNA ploidy, CGH 法および FISH 法による染色体コピー数解析 第 72 回日本胃癌学会総会、2000.2.18.
- ・ Sugihara H, et al., Dynamic range and over- and underestimations in analyses of chromosomal copy number by comparative genomic hybridization. 5th China-Japan Joint Histochemistry and Cytochemistry Seminar, 2000.5.26.
- ・ 杉原洋行 CGH の定量的解析：Interphase karyotyping への試み. 第 10 回日本サイトメトリ学会総会 2000.8.5.
- ・ Sugihara H, et al., Estimation of absolute copy numbers of chromosomes and chromosomal parts by combined CGH and ploidy analyses. 11th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 2000.9.7.
- ・ 杉原洋行、他、 CGH による G/R 比の定量的解析. 第 59 回日本癌学会総会 2000.10.4.
- ・ 神谷純広、杉原洋行、他、 食道扁平上皮癌の発生、進展における染色体異常の検出：核 DNA 量、FISH 法、CGH 法を用いて. 第 59 回日本癌学会総会 2000.10.4.
- ・ 神谷純広、杉原洋行、他、 食道扁平上皮癌を用いた DNA コピー数異常の腫瘍内多様性の解析. 第 90 回日本病理学会総会 2001.4.7. (発表予定)

(3) 出版物

- ・ 服部隆則 組織細胞化学 1999 (日本組織細胞化学会編)、学際企画、1999.

研究成果

1. 研究の背景、位置づけ：

胃癌は依然としてわが国で最も多い癌にもかかわらず、その発生と進展にかかわる **genetic pathway** の解明は他の腫瘍に比べて遅れている。このような状況に突破口を開くべく、全ゲノムにわたって染色体（部分）の増減をスクリーニングできる **Comparative genomic hybridization (CGH)** が胃癌にも応用され、いくつかの変化が報告され始めた。しかし、これらはほとんど進行癌のデータであり、また CGH のみでは、ゲノムの倍加に続発する非特異的な染色体変化と、進展の初期から変化している重要な特異的变化との区別が困難で、胃癌における初期・早期の染色体変化についてはまだほとんど手つかずの状態である。

筆者はここ数年来、この初期変化を検出するために、早期未分化型胃癌を中心に新鮮凍結組織を収集し、個々の症例のクローン解析を行うとともに **DNA ploidy** を決定し、ゲノムの倍加を経た **DNA-aneuploid** の部位と経ていない **DNA-diploid** の部位で CGH を行ってきた。また、未分化型胃癌由来の細胞株でも CGH を進めてきた。その結果、検索したほとんどの腫瘍が全体として単クローン性であること (Bamba et al., 1998)、7 番染色体長腕の **gain** と 18 番染色体の長腕の **loss** が、進行期の部分や培養株で高率に検出されることを見いだした (Okada et al, 2000)。しかし、原発腫瘍の CGH には、方法論的にかなりの改善の余地があり、CGH の結果を **FISH** で確認することも必要であった。

2. 研究の目的：

- (1) **DNA aneuploidy** を含む進行癌で **DNA-diploid** 成分と **DNA-aneuploid** 成分を分離して別々に CGH を行う症例を増やす。その際、**microdissection** で採取した微量な DNA に対して、**DOP-PCR** による **whole genome amplification** を適用し、CGH 解析に必須である、腫瘍細胞の **enrichment** を行う。
- (2) 個々の腫瘍内から多数箇所のサンプリングを行い、それぞれで **DOP-PCR** **CGH** を行い、結果の共通性とサンプルの **ploidy** をもとにして、染色体変化のプロセスを再構成する方法論を確立する。
- (3) (1)と(2)から、**DNA-diploid** 成分における 7 番、18 番染色体の変化が、初期変化としてどこまで一般的であるのかを明らかにする。
- (4) 7 番染色体の **centromere** および **c-Met** 遺伝子を含む **7q31** の **probe** を使って組織切片に対して **FISH** を行い、**Met** 遺伝子の段階的なコピー数の増加が未分化型胃癌の組織内進展とどのように関係しているかを検討する。18 番染色体については **DPC4** 遺伝子に注目し、同様の検討を行う。このアプローチを我々は **in situ cytogenetics** と呼んでいる。
- (5) 染色体のコピー数の増減が、**messenger RNA** や蛋白の発現に反映してい

るかどうかを確かめることによって、Met や DPC4 が本当にそれぞれの染色体における標的遺伝子であったのかどうかを確かめる。

3. 方法と結果

まず、(5)について、原発腫瘍 10 例について抗 DPC4 抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、当初期待した、正常組織の染色性よりシグナルの低下した部分が見られず、DPC4 の標的遺伝子としての可能性が低くなった。抗 HGF receptor (c-met) 抗体についても、これまでのところ有意なシグナルの増加が検出されていない。

次に(4)について、DPC4 の Exon 1 を認識する PCR の primer set を用いた BAC クローンのスクリーニングを行い、18q のプローブを作成した。それと 18q のセントロメアプローブを用いて、培養細胞および、原発腫瘍より単離した腫瘍細胞核に対して FISH を行ったが、18q のシグナル数がセントロメア数よりも減少していた case が、原発腫瘍ではほとんどなかった。

そこで、原発腫瘍の CGH による染色体変化のスクリーニングのステップ（目的の(3)）に立ち返ることにした。そして、信頼性の高い CGH 解析を行うための、腫瘍 DNA の enrichment の試行錯誤を行った（目的の(1)）。当初、組織切片から、Laser capture microdissection (オリンパス LM-200 を使用)による腫瘍細胞の単離を試みたが、間質細胞や炎症細胞の除去と腫瘍細胞の十分な enrichment は困難を極めた。研究期間中での切片からの腫瘍細胞の単離をあきらめ、単離細胞の suspension を薄くスメアに引いてから腫瘍細胞を capture することも試みたが、スメアではフィルムへの接着が悪く、更なる工夫が必要であることが分かった。

そこで、研究期間中に、初期の染色体変化の CGH による解析のための方法論を確立するために、細胞単離の容易な食道癌を用いて DOP-PCR CGH の基礎的な検討（目的の(2)）を行った。具体的には、腫瘍病巣より採取し DNA ploidy を決定した多数箇所サンプルから、DOP-PCR による微量検体からの全ゲノム増幅、DOP-PCR によるプローブの蛍光標識条件の optimization、DOP-PCR で作成した標識プローブによる CGH を行い、良好な CGH の結果を得ることができた。特にプローブの標識条件を割り出すのにかなりの試行錯誤を要した。CGH の G/R 比の shift distance と ploidy mode から、変化した染色体部分の絶対的コピー数を求め、そのデータをもとに、複数のゲノム変化の時間的前後関係を推定する temporal analysis の方法論は、培養細胞を用いて確立したが、本研究によって、それを in vivo の原発腫瘍の多数箇所から採取したサンプルに応用し、個々の腫瘍に固有の染色体変化の sequence を明らかにすることができた。その内容を以下に具体的に説明する。

CGH の G/R 比の profile が示すのは、一本の染色体の中での相対的なコピー数の増減に過ぎない。染色体の各部分の絶対的なコピー数の変化は、平均コピー数からのシフトと平均コピー数自体の変化とに分けて考えなければならない。CGH でわかるのは、染色体上の各点のコピー数が平均染色体数からどのくらい相対的にシフトしているかである。その平均染色体数に対応する、G/R=1 のラインでの絶対的なコピー数は、ploidy（総染色体数）を染色体の種類の数 23（ハプロイドの染色体数）で割ったものになる。つまり、染色体上の各点の増減を絶対的なコピー数で知るためには、ploidy 解析が必須なのである。その次に、G/R 比のシフトの大きさから何コピーシフトしているのかを決めなければならない。実際の CGH の G/R 比の profile をみると、染色体の部位によって、シフトに大小のあることがわかる。

これまで CGH は、G/R 比が閾値を越えている領域を割り出す、定性的な解析に主として使われ、閾値を大きく超えているのか、ぎりぎりを超えているのかの違いの意味については十分に検討されてこなかった。そもそも CGH で gain や loss の判断ができるのは、CGH の定量性に基いているわけだから、それだけの定量性があれば、シフトの大きさも評価できるはずである。実際、du Manoir らは、YAC プローブを用いた FISH で求めた実際の染色体部分のコピー数と CGH の G/R 比の間に linear な関係があることを示している。私たちも、CGH の G/R 比と ploidy 解析から染色体部分の推定コピー数を求め、painting FISH で直接求めたコピー数との間に高い相関があるかどうか、種々の ploidy を示す培養癌細胞で調べた。その結果、G/R 比と実際のコピー数とは、ploidy を合わせれば、きれいな linear な関係になった。ploidy が大きくなると、1 コピーの重みが相対的に軽くなっていくので、曲線の傾きが緩やかになって行く。

G/R 比のシフトを判定するための閾値は ploidy ごとに設定した。このテーブルの中に培養細胞で求めた実際の G/R 比をプロットすると、理論的閾値を最大値とし、1 コピー分の幅をもたせた範囲内に概ね入ることがわかった。これで、染色体上の各点の G/R 比と ploidy がわかれば、このテーブルを使って絶対的なコピー数を推定できるようになった。ただし、培養細胞のような均一な細胞集団を扱うことが前提である。

以上で、ploidy と CGH の G/R 比から染色体各部分の絶対的なコピー数を推定し、それを同一腫瘍内の複数箇所と比較することによって、比較的初期から変動する染色体部分を同定する方法の枠組みがほぼ決まったので、それを primary の腫瘍に応用してみた。primary の腫瘍では更に次の点に注意しなければならない。まず、間質細胞の混入を補正しなければならない。ploidy も単一ピークとは限らないので、複数の G1 ピークがある場合は、その平均をとることにする。そして、その（平均）ploidy を考慮した閾値で何コピー変化したかを判定

することなどである。これで本当に絶対的コピー数が推定できるのかどうか、次のように検討してみた。まず、2倍体から見られる初期の変化は1コピーの変化でもG/R比は大きなシフトになる。これは近2倍体のMKN-45で確かにならっていた。ゲノムの倍加によって、変化も倍加すれば、この大きなシフトは保たれるはずである。一方、ひとつの腫瘍から多数箇所サンプリングして、それらに共通に見られる変化も初期の変化である。それならば、この共通に見られる変化では、G/R比のシフトが大きくなっているはずである。

一例を示すと、食道癌から3箇所サンプリングをし、それぞれでploidy解析とCGHを行ったところ、3qと11qのgainは3箇所ともに見られたのに対して、1p, 1q, 9qのgainはT3にのみ見られた。この内、共通に見られた3q, 11qのgainは確かに大きなシフトとして見られた。T3でみられたgainのうち、1pは大きなシフト、他は小さなシフトを示し、それぞれゲノムの倍加前、倍加後の変化と考えられた。この症例のaneuploid成分は近3倍体であるので、ゲノムの倍加に引き続いて3極分裂(4→8→3+3+2)などが起こり、haploidの染色体が失われ、また3倍体が2倍体と共存するようになったと考えられる。そのさい、各染色体が同数ずつ減少して3倍体ないし2倍体になれば、CGHのG/R比のprofileに変化はないであろう。

他の腫瘍でも、共通な変化は大きなシフトになるのかどうか更に調べると、3q+, 11q+のgainの場合は共通の変化はだいたい大きなシフトになっていた。しかし、近3倍体のaneuploid部分では、共通のlossの場合でもシフトは小さいことが多かった。また、2倍体のサンプルでも変化が小さなシフトのことがあった。これはサンプル内の腫瘍細胞の一部にのみ見られた変化か、あるいはchromosomal instabilityを示すderivative chromosomeの存在を示唆している。後者は、例えば微小領域から単離した核にセントロメアプローブでFISHを行っても、染色体コピー数の分布が単一モードを示さず、ある範囲内でランダムに選ばれたコピー数となるような場合である。

CGHで検出されるG/R比のパターンは、腫瘍の進展過程で起こった変化そのものでは必ずしもない。倍加後ploidyが3倍体に減少する過程で、変化した染色体が失われることにより、G/R比のシフトの大きさだけから見ると、初期のlossがunderestimateされる可能性がある。逆に、倍加後の1コピーの増加(4→5)でも、平均染色体数が3に減ることによって、平均から2コピーのシフトとなって大きなシフトになることがある。このように、末期のgainがoverestimateされることがある。

CGHだけではこのような問題があるが、多数箇所のサンプリングをし、CGHとploidy解析を行えば、ここに示したような、腫瘍内で起こったであろう変化そのものを推定できることがわかった。この方法は、CGHでスクリーニング

される多くの染色体変化から、本当に重要な初期変化を抽出する際に役立つと考えられる。

本研究で開発したこの方法論を、実際の未分化型胃癌に適応するためには、**microdissection** の更なる技術的開発が必須である。今後この点での **breakthrough** をめざし、努力を重ねる必要がある。