

子宮頸部腫瘍性病変における3番, 17番染色体の 数的異常と相対的核DNA量の検討

近畿大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 星合 晃教授, 指導: 野田起一郎教授)

野崎 晃一 渡部 洋 池田 正典

Study on Chromosome 3, 17 Aneusomy and Relative DNA Content in Uterine Cervical Neoplasia

Kouichi NOZAKI, Yoh WATANABE and Masanori IKEDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kinki University School of Medicine, Osaka

(Chief: Prof. Hiroshi Hoshiai, Director: Prof. Kiichiro Noda)

概要 子宮頸部腫瘍性病変における3番, 17番染色体の数的異常及び相対的核DNA量の変化について, 正常子宮頸部扁平上皮(NE)10例, 高度異形成(SD)20例, 上皮内癌(CIS)20例, 浸潤癌(IC)20例を対象として fluorescence in situ hybridization (FISH)及び, flow cytometry (FCM)を用いた検討を行い次の成績を得た。

1. 3番染色体 centromere signal 数は, NE ではすべての細胞が2 signalを示したのに対し, SD では36.7%, CIS では64.0%, IC では70.0%の細胞に2 signal以外のsignal数が観察され, 一方17番染色体 centromere signal 数は, NE ではすべての細胞が2 signalを示したのに対し, SD では30.0%, CIS では60.0%, IC では68.7%の細胞に2 signal以外のsignal数が観察された。

2. DNA aneuploidの割合は, SD では60.0%, CIS では70.0%, IC では80.0%であり, DNA ploidy heterogeneity (Dph)の頻度は, SD 83.3%, CIS 14.3%, IC 68.8%とSDにおいても最も高頻度を示し, CISにおいて最も低値を示した。

以上の結果より, 3番, 17番染色体の centromere signalの数的異常及び相対的核DNA量の変化は, 子宮頸癌の発癌過程において早期のSDの段階ですでに発生するeventであると考えられた。

Synopsis We studied the relative DNA content and the intra-tumor DNA heterogeneity by flow cytometry (FCM), and chromosome 3, 17 centromere aneusomy analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH) in patients with uterine cervical neoplasia. Ten patients had severe dysplasia (SD), 20 had carcinoma in situ (CIS) and 20 had large cell non-keratinizing type invasive carcinoma (IC).

We used a surgically resected and paraffin-embedded specimen for the FCM, and a Papanicolaou-stained cytological specimen for the FISH.

Our results showed that:

1. Chromosome 3 centromere aneusomy was 36.7% for SD, 64.0% for CIS and 70.0% for IC while chromosome 17 centromere aneusomy was 30.0% for SD, 60.0% for CIS and 68.7% for IC.

2. The frequency of DNA aneuploid cases in SD was higher than that in SD to IC, but there was a low frequency of intra-tumor DNA heterogeneity.

The abnormality of relative DNA content and the chromosome 3, 17 centromere aneusomy were early events in the carcinogenesis of uterine cervical cancer.

Key words: Fluorescence in situ hybridization (FISH) • DNA ploidy • Cervical cancer

緒 言

子宮頸癌の発癌過程には, 種々の遺伝子異常や

細胞増殖能の異常など, 多くの因子が複合して関与すると考えられている。

すなわち発癌は、細胞レベルにおけるさまざまな特性の変化の集積であると理解され、現在では発癌の mechanism の解明に対する分子細胞生物学的 approach に期待される面が大きい。

蛍光色素を用いた細胞特性の検討は flow cytometry (FCM) の普及により癌細胞の相対的核 DNA 量の測定を中心に展開されてきたが、fluorescence in situ hybridization (FISH) の方法論の確立により間期細胞核における遺伝子異常の視覚化が可能になり、基礎的研究において積極的に応用されている。

そこで今回我々は、正常子宮頸部扁平上皮、高度異形成、上皮内癌、浸潤癌の各病変について、発癌過程において構造異常が指摘されている3番染色体及び、代表的癌抑制遺伝子である p53 が存在する17番染色体について FISH を用いて数的異常の検討を行い、さらに、FCM を用いた相対的核 DNA 量の測定を行い、これら染色体の数的異常ならびに細胞の核 DNA 量の変化と子宮頸部腫瘍性病変の進展との関連性について基礎的な検討を行った。

研究対象と研究方法

1. 検討症例

今回検討を行った症例は、手術摘出標本の病理組織切片より診断された高度異形成 (SD) 20 例、上皮内癌 (CIS) 20 例、浸潤癌 (IC) 20 例、及び子宮筋腫症例より得られた正常子宮頸部扁平上皮 (NE) 10 例の計 70 例である (表 1)。なお、浸潤癌は、背景を統一するために大細胞非角化型癌症例を対象とした。

検討にあたっては各症例により得られた Hematoxylin-Eosin 染色病理組織切片とパパニコウ染色細胞診標本の観察を行い、各病変に対

表 1 検討症例

	症例数	総検討細胞数
NE	10	100
SD	20	60
CIS	20	50
IC	20	150



写真 1 3 番染色体 centromere DNA probe を用いた FISH の 1 例 (SD 症例)

光顕下に細胞診断を行った後、病変に対応する細胞について FISH を行い、signal 数を測定した。

応するパラフィン包埋組織と細胞診標本を 1 症例について各々 3 検体選択し、以下の検討に用いた。

2. 3 番、17 番染色体 centromere DNA probe を用いた FISH

FISH による centromere の数的異常の検討は、あらかじめ光顕下に細胞診断を行い、各病変に対応する細胞について glass cutter を用いてスライドガラス裏面からマーキングした部分に対して以下の手順に従って FISH を行った。

DNA probe は、digoxigenin 標識 chromosome 3 centromere α -satellite DNA probe (D3Z1: oncor) 及び digoxigenin 標識 chromosome 17 centromere α -satellite DNA probe (D17Z1: oncor) を使用した。

検体は、500 μ g/ml protenase K (SIGMA) 37°C 90 分処理による細胞質の除去と、0.1% pepsin (pH 1.5) 37°C 1 分処理による除蛋白を加えた後、37°C 24 時間の hybridization を行った。

centromere DNA probe の染色には抗 digoxigenin fluorescein (Boehringer Mannheim) を用い、一方核 DNA は 0.1 μ g/ml の propidium iodide (P.I: CALBIOCHEM) を用いた。

さらに、anti-fade として 2% p-phenylendiamine (WAKO) を加えた 90% グリセリンにて検体を包埋し、蛍光顕微鏡 (BX-200; OLYMPUS) を用いて IB 励起、FITC/P.I double band pass filter に

表2 パパニコロウ染色細胞診標本を用いた FISH の方法

1. キシレンにてカバーガラスの除去		
2. 再水和(100%, 95%, 80%, 70%エタノール)		
3. 細胞質の除去, 蛋白の除去		
1) 500 μ g/ml protenase K	37°C	90分
2) 0.1% pepsin (pH1.5)	37°C	1分
4. 脱水(70%, 80%, 95%, 100%エタノール)		
5. 検体の変性		
70% formamide/2 $\times$ SCC	70°C	2分
6. DNA probe の変性	75°C	10分
7. Hybridization	37°C	24時間
8. FITC 染色	2.5mg/ml	
9. P.I 染色	0.1 μ g/ml	

より間期核における centromere signal 数を count した(表2). なお, 検討細胞数は NE 100個, SD 60個, CIS 50個, IC 150個であった.

3. DNA ploidy の測定

FCM を用いた DNA ploidy 測定のための検体処理は, 病変部が全体の70%以上を占めるようにあらかじめ検体をトリミングし, Hedley et al.¹⁾の方法に準じて行った.

核 DNA の染色は0.1% Ribonuclease A

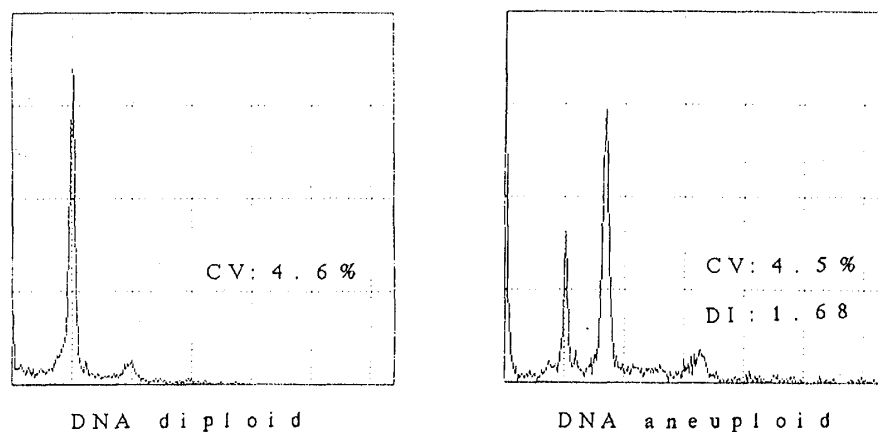
(RNase: SIGMA)処理の後, final concentration 50 μ g/ml の P.I により 4°C18時間の染色を行った.

測定装置は FCS-1型 Flow cell sorter (日本分光)を用い, 励起光は488nm $\cdot$ 500mw のアルゴンダイレーザーとし, P.I からの赤色蛍光を600nm $\pm$ 20nm の band pass filter を通して, 1 検体あたり 3×10^4 個の細胞について相対的核 DNA 量の測定を行った.

4. DNA ploidy 及び DNA heterogeneity の判定

DNA ploidy の判定は, 切片内の正常組織部分を internal standard とし, S, G₂・M 期部分を有した単一の peak のみを認める normal DNA stemline 類似の DNA histogram pattern を DNA diploid (図1左), 2C 領域に設定した internal standard の peak 以外に, 対応する S, G₂・M 期部分を有する独立した peak を認める DNA histogram pattern を DNA aneuploid と判定した(図1右).

また, 同一症例における測定で DNA diploid と DNA aneuploid の双方を認める症例, DNA



CV: coefficient variation

DI: DNA index

図1 DNA ploidy の判定(IC 症例)

DNA diploid(左); 切片内の正常組織部分を internal standard とし, S, G₂・M 期部分を有した単一の peak のみを認める normal DNA stemline 類似の DNA histogram pattern.

DNA aneuploid(右); 2C 領域に設定した internal standard の peak 以外に, 対応する S, G₂・M 期部分を有する独立した peak を認める DNA histogram pattern.

index (DI) の異なる DNA aneuploid を認める症例、及び 1 検体の測定において internal standard の peak 以外に複数の abnormal DNA stemline の peak を認める症例を DNA ploidy heterogeneity (Dph) 陽性症例と判定した。

なお、今回の検討における coefficient variation (CV) は、3.2%~4.5% (mean: 4.2%) であった。

研究成績

1. 子宮頸部病変の進行と 3 番, 17 番染色体 centromere の数的変化

NE においては、検討全細胞で 3 番染色体 centromere は 2 signal を示したが、子宮頸部病変を対象とした検討では、SD 36.7% (22/60), CIS 64.0% (32/50), IC 70.0% (105/150) に、2 signal

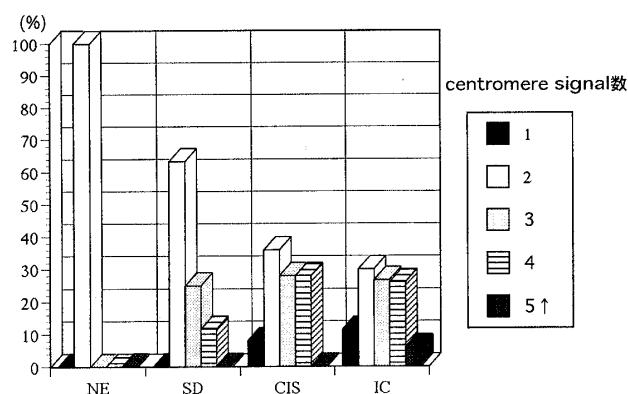


図 2a NE, SD, CIS, IC 各症例における 3 番染色体の centromere signal 数の割合
2 signal 以外の centromere signal 数を示す割合は、病変の進行に従って増加する傾向が認められた。

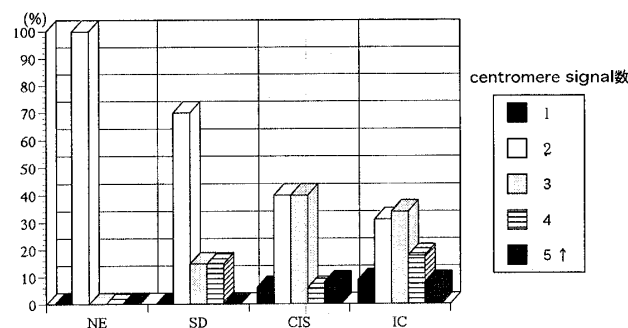


図 2b NE, SD, CIS, IC 各症例における 17 番染色体の centromere signal 数の割合
3 番染色体 centromere signal の検討と同様に、2 signal 以外の signal 数を示す割合は、病変の進行と共に増加する傾向が認められた。

以外の signal 数が観察され、FISH により判定されたこれら 3 番染色体 centromere の数的異常の頻度は、病変が進行するに従って増加する傾向が認められた (図 2a)。

17 番染色体 centromere signal 数は、NE において認められた正常扁平上皮細胞ではすべて 2 signal であったのに対し、SD では 30.0% (18/60), CIS では 60.0% (30/50), IC では 68.7% (103/150) に 2 signal 以外の signal 数を認め、17 番染色体 centromere の数的異常の頻度は 3 番染色体 centromere signal の検討と同様に、病変の進行に伴って増加する傾向が認められた (図 2b)。

また、3 番及び 17 番染色体 centromere monosomy と判定された症例は、NE, SD では 1 例も認められなかったのに対して、3 番染色体では CIS で 8.0% (4/50), IC で 11.3% (17/150) に認められ、

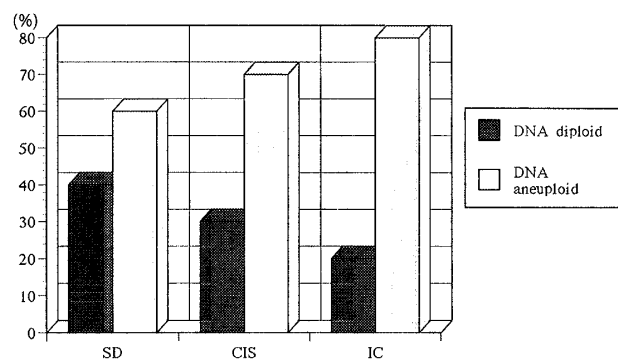


図 3 SD, CIS, IC 各症例における DNA diploid と DNA aneuploid の割合
病変の進行に伴って DNA aneuploid 症例の頻度は増加する傾向が認められた。

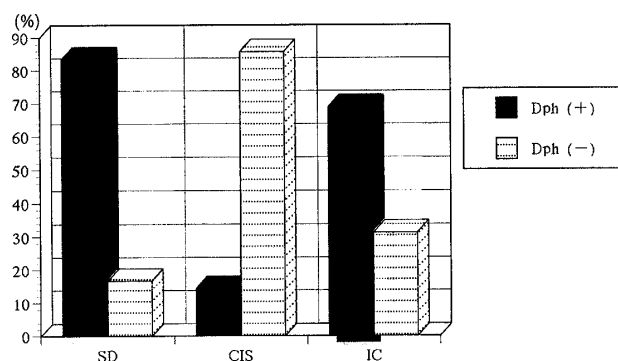


図 4 SD, CIS, IC 各症例における Dph の割合
Dph 陽性症例の頻度は、SD において 83.3% と最も高値を示し、CIS において 14.3% と最も低値を示した。

17 番染色体においては CIS で 6.0% (3/50), IC で 8.7% (13/150) に認められた。

2. 子宮頸部病変の進行と DNA ploidy, Dph

DNA aneuploid の割合は, SD では 60.0% (12/20), CIS では 70.0% (14/20), IC では 80.0% (16/20) となり, 病変が進行するに従って DNA aneuploid 症例は増加する傾向が認められた (図 3)。

また, 全 60 症例中 18 症例が DNA diploid, 42 症例が DNA aneuploid と判定されたが, 今回切片内の正常組織部分を internal standard とした結果, DNA aneuploid と判定された症例はすべて hyper diploid の DNA aneuploid であった。

DI の分布は, SD で 1.77 ± 0.46 , CIS で 1.52 ± 0.63 , IC では 1.48 ± 0.32 であり病変の進行に従って低下する傾向が認められた。

Dph 陽性症例の頻度は, SD において 83.3% (10/12) と最も高値を示し, CIS において 14.3% (2/14) とその頻度は最も低値を示した。また, IC における Dph 陽性症例の頻度は 68.8% (11/16) であった (図 4)。

3. DNA ploidy と 3 番, 17 番染色体 centromere aneusomy の関連

今回検討を行った SD, CIS, IC 計 60 症例における DNA ploidy と 3 番, 17 番染色体 centromere の数的異常の関連についてみると, FCM で DNA diploid と判定された 18 症例中 12 症例 66.7% が 3 番染色体 centromere signal 数が 2 signal 以外を示し, 13 症例 72.2% が 17 番染色体 centromere signal 数が 2 signal 以外を示した。

一方, DNA aneuploid と判定された 42 症例においても 6 症例 14.3% が 3 番染色体 centromere は 2 signal, 14 症例 33.3% が 17 番染色体 centromere は 2 signal であり, DNA ploidy の測定結果と 3 番, 17 番染色体の centromere の数的異常の頻度には一定の関連性を認められなかった (図 5)。

考 案

分子細胞生物学の進歩により, 細胞レベルでの特性の変化が発癌と密接に関連する事実が指摘されており, 遺伝子異常や染色体異常など発癌の mechanism に関する研究が精力的に行われている。

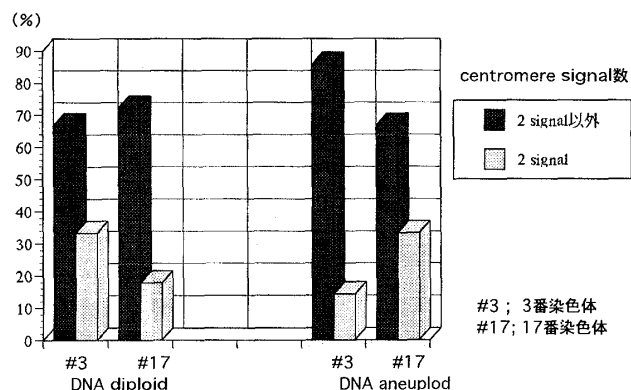


図 5 DNA ploidy と 3 番, 17 番染色体 centromere signal 数との関連

DNA ploidy の測定結果と 3 番, 17 番染色体 centromere signal 数で 2 signal 以外を示す頻度には一定の関連性は認められなかった。

癌細胞の相対的核 DNA 量の変化は, 癌化に伴う代表的な細胞特性の変化であることが確認されており, 特に FCM の出現によってその検討は飛躍的な進歩を来した。

婦人科領域においても FCM によって測定された DNA ploidy が子宮頸部異形成の progression に関連する²⁾ことや, 婦人科癌の予後因子³⁾⁴⁾としての有用性が報告されている。

また, 癌組織内の multiple abnormal DNA stemline の存在についてもすでに FCM による確認がなされており, DNA ploidy と同様に癌の予後因子としての有用性に関する報告⁵⁾や, 癌化学療法の直接効果との関連性⁶⁾についての報告はあるが, 発癌との関連性から Dph を論じた報告は少なく, 発癌の mechanism における Dph の意義についてはいまだ不明である。

癌と染色体異常についての検討は癌細胞の karyotype 解析を用いた報告があり, Atkin et al.⁷⁾は, 48 例の子宮頸癌を対象とした karyotyping から, 子宮頸癌における染色体の構造異常は 1 番染色体に 60%, 17 番染色体に 47%, 11 番染色体に 37%, 3 番染色体に 26% 認められたと報告している。

子宮頸癌の発癌過程と染色体の構造異常については, polymerase chain reaction (PCR) を用いた詳細な検討から, 特に 3 番染色体における構造異

常が指摘されており、さらに代表的な癌抑制遺伝子である p53 が 17p に存在するため 17 番染色体についても構造異常と発癌との関連性が示唆されている。

FISH は、これまで染色体標本を用いた chromosome banding method から検討されてきた染色体異常を、間期細胞核においての確認を可能とした点で画期的な検討方法であり、各種固形癌において FISH を用いた centromere の数的異常が盛んに検討されている。

Segers et al.⁸⁾ は 68 例の CIN 症例の子宮頸部擦過細胞検体を対象に chromosome 1 centromere DNA probe を用いた FISH と image analysis system による核 DNA 量の測定を行い、chromosome 1 polysomy の頻度は、CIN I において $3.8\% \pm 3.5\%$ 、CIN II では $7.5 \pm 9.8\%$ 、CIN III では $28.1\% \pm 23.7\%$ であり、chromosome 1 polysomy の頻度と DI には有意な関連性のないことを報告している。

また、Waldman et al.⁹⁾ は 27 例の膀胱移行上皮癌の細胞検体を対象として、7 番、9 番及び 11 番染色体の centromere DNA probe による FISH を行い、7 番染色体の centromere signal の数的異常が、tumor grade や bromodeoxyuridine を用いて検討された腫瘍増殖能と有意に関連すると述べており、さらに 7 番染色体 centromere の数的異常が膀胱移行上皮癌の予後因子となりうる可能性を示唆している。

しかし、一般に行われている新鮮細胞を用いた FISH では、細胞形態との比較検討が困難であるため、特に発癌や病変の進行との対応の面からの正確な比較検討は不可能であるといわざるを得ない。

そこで我々の検討においては、種々の段階の子宮頸部腫瘍性病変と病変に対応する centromere signal を正確に比較するために事前に細胞診断の可能である細胞診標本を FISH の検体として使用した。

今回の高度異形成、上皮内癌、浸潤癌を対象とした検討の結果、病変の進行と共に abnormal DNA stemline の出現頻度は増加するものの、

Dph の頻度は CIS において明らかに低下する傾向が認められ、SD から CIS への移行には細胞内における abnormal DNA stemline の selection が生じている可能性が示唆された。

また、検討組織における DNA ploidy と 3 番及び 17 番染色体の centromere signal 数の異常の頻度は、病変の進行との関連性からは同様の推移を示すものの、各症例における比較検討では両者に有意な関連性は認められず、FCM によって測定される相対的核 DNA 量の変化は特定の染色体の数的異常のみを示すものではなく、細胞内における DNA 量の異常を総合的に示すものと考えられた。

さらに、3 番及び 17 番染色体 centromere monosomy は CIS、IC 症例のみ認められ、染色体数の減少や centromere を超える chromosomal deletion が、癌化の完成した時点から生じる可能性も示唆された。

以上今回の検討の結果、相対的核 DNA 量の変化及び 3 番、17 番染色体の centromere signal 数の異常は、子宮頸部異形成の時点より高頻度に認められ、子宮頸癌の発癌過程においては早期より生じる event であると考えられた。

さらに癌化に伴う組織内の変化においては、これら早期に生じる細胞特性の変化が、SD から CIS に移行する時点において abnormal DNA stemline の selection を経て細胞の癌化が生じる可能性が推察された。

今後はさらに、子宮頸癌の発癌に伴う染色体の質的变化についての詳細な検討が期待される。

文 献

1. Hedley DW, Friendlar ML, Talor IW. Application of DNA flow cytometry to paraffin embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 1985; 6: 327—333
2. 太田昌克, 池田正典. 子宮頸部異形成の癌化過程における HPV16, 18 型感染と DNA ploidy の意義. *日産婦誌* 1993; 45: 540—546
3. Ikeda M, Watanabe Y, Noda K. Evaluation of DNA ploidy in Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol* 1993; 50: 25—29
4. 渡部 洋, 池田正典. 子宮頸癌の予後因子として

- の DNA ploidy の検討. 日産婦誌 1991 ; 44 : 1127—1134
5. *Hiddemann W, von Bassewitz DB, Kleinemeier H-J.* DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 1986 ; 58 : 258—263
 6. 澤井 猛, 渡部 洋, 池田正典. 卵巣癌における DNA ploidy 及び細胞増殖能と治療効果との関連性. 日産婦誌 1995 ; 30 : 47—56
 7. *Atkin NB, Baker MC, Fox MF.* Chromosome changes in 43 carcinomas of the cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 1990 ; 44 : 229—241
 8. *Segers P, Hansen S, Castelain P, Amy J-J, Sutter PD, Dam PV, Kirsh-Volders M.* Study of numerical aberrations of chromosome 1 by fluorescent in situ hybridization and DNA content by densitometric analysis on (pre) malignant cervical lesions. *Histochem J* 1995 ; 27 : 24—34
 9. *Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Cohen MB, Field FG, Mayall BH.* Centromeric copy number of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Research* 1991 ; 51 : 3807—3813
- (No. 7825 平8・11・18受付)
-