

S1-3

Fluorescence in situ hybridization (FISH)法を用いた固形癌における癌遺伝子増幅の検索

大井 章史

山梨大学 医学部 病理1

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、FISH法では蛍光色素を標識に用いることによって従来の方法に較べて簡便で高い分解能がえられるようになった。現在ではある種の造血器腫瘍における遺伝子転座の解析や転移乳癌における分子標的療法の適応をきめるための必須の検査となっている。我々は、早期にこの技術に注目して、胃癌におけるP53遺伝子の物理的欠失の証明、c-erbB-2、K-sam、c-metおよびEGFRの遺伝子増幅を明らかにしてきた。EGFR、c-erbB-2、K-samおよびc-metはいずれも、細胞膜上に存在する1型成長因子受容体蛋白をコードする癌原遺伝子で、遺伝子増幅によって癌遺伝子として働くことが明らかになっている。FISH法では増幅遺伝子のコピー数や増幅のタイプを個々の細胞について明らかにできる。従って、この技術を固形癌組織切片に応用することによって固形癌のgenetic heterogeneityとclonal evolutionの過程を追求することが可能であることをしめした。

一方、c-erbB-2蛋白の細胞外ドメインにたいするヒト化モノクローナル抗体 (trasuzumab, 商品名ハーセプチン) が乳癌の治療薬として登場し、その適応を決定するに際しFISH法による遺伝子増幅の証明が必須となっている。我々は乳癌においてc-erbB-2蛋白過剰発現が、c-erbB-2遺伝子の増幅によっておこる事を明確にしたが、全く同様のメカニズムで胃癌の約8%、肺腺癌、大腸癌および胆道癌の2-8%でc-erbB-2の過剰発現がおこることを明らかにし、trasuzumabがこれらの癌の有力な化学療法となり得ることを提唱している。さらに、FISH法を用いて肺癌、胃癌、大腸癌、胆道癌においてEGFRの増幅が細胞膜上での蛋白過剰発現の主な機序である事を明らかにしている。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)、またEGFRの細胞内ドメインのチロシンキナーゼ阻害剤 (ZD1839, Iressa) が開発され、肺癌に対する治療薬として臨床応用されつつあり、これらの分子標的療法の適応と治療効果の判定にFISH法によるこれら癌遺伝子増幅の検討の果たす役割は大きい。

S1-4

分子組織細胞化学による病態解析の実践

小路 武彦

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 発生分化機能再建学講座 動的形態分子解析学分野

様々な病因を解析する上で、病態組織を形成する細胞個々の表現形質の変化を正確に把握することが必要と思われる。即ち、この異常として認識された形態変化を、蛋白質・糖質・脂質・核酸といった生体高分子の物質変化として捉えることが要求されている。殆どすべての生体高分子は酵素蛋白により産生され、またその蛋白発現は直接的に遺伝情報によって制御されていることを考慮すると、細胞単位でのこの遺伝情報の流れとその制御状態の理解がこのような先端的分野において必須であることが明らかである。最終産物としての蛋白発現は免疫組織化学により検討されるが、特に固定を含む組織処理を必ずしも至適条件下で行なえる訳でない臨床試料では、試料間での発現量の正確な比較は困難である。抗原の性状にもよるが、一般的には固定条件によりその抗原性が変化するからである。ここに、転写産物であるmRNAで特定の遺伝子発現を検討する意義がある。細胞単位での特異的mRNAの局在と発現量は、in situ hybridization (ISH) によって検討されるが、特に我々はここ20年に渡って、解像力に優れ且つ簡便な非放射性法の開発と改良に取り組んできた。その結果、合成オリゴDNAプローブを利用することにより、各操作段階での標的分子と検出系の反応の直線性を可能な限り維持しながら、最終的にhorseradish peroxidase等の反応産物として沈着した染色シグナルを画像解析装置により数値化することが可能となった。更に、プロテアーゼ処理を含む種々の前処理条件の至適化には、すべての細胞に存在する28S rRNAをISHでの普遍的陽性対照として利用することを提案し、結果の再現性の確保と高い感度をもたらした。実際、28S rRNAの発現量で他の遺伝子mRNAシグナル量を補正する事により、臨床検体間での結果の比較や多少RNAの保存等に問題のある試料でもかなり適正に解析可能となった。本講演では、臨床検体で有効なISHの応用条件を提示すると共に、更にISH法に続く発展的分子組織細胞化学的手法として開発され、遺伝子特異的転写調節因子の発現解析を可能とするSouthwestern histochemistryの臨床検体への応用例とその有効性についてNF- κ BやE2Fを例にお示ししたい。