

胆道腫瘍における Fluorescence in situ Hybridization 法を中心とした染色体・遺伝子検討とその臨床応用

名古屋市立大学大学院医学研究科

地域医療学寄付講座 助教 宮部勝之

名古屋市立大学大学院医学研究科

消化器・代謝内科学 准教授 中沢貴宏

名古屋市立大学大学院医学研究科

消化器・代謝内科学 助教 内藤 格

[要旨]

近年、膵臓癌・胆管癌での内視鏡的ブラシ細胞診検体を用いた Fluorescence in situ hybridization (FISH)法の有用性が報告されつつある。しかしながら、本法を用いた膵疾患の染色体・遺伝子異常の報告は少ない。我々は胆管細胞診標本を使用した染色体・遺伝子の比較検討を、FISH法を使用して用いて行った。FISH法は精度の高い非常診断方法であるが、今後、正確にFISH法を施行する技術の向上および、より高い精度を追求した次世代のFISHプローブ開発が望まれる。

[目的]

胆道癌は膵癌同様、予後不良な癌であるものの臨床的にも頻度が低く、大規模な研究も少ないのが現状である。胆道癌においても免疫組織化学染色のデータ等から、EGFRが比較的高発現していることが報告されており¹、その他比較的高い頻度で見られる遺伝子異常としては、KRAS、p53、p16等が報告されている²ものの、これらの遺伝子異常と疾患悪性度との関連が十分には解明されていない。また、胆道腫瘍をFISHにて検討した報告は国際的にも少なく、特に国内からの報告は極めて少数である。胆道内視鏡にて採取した細胞診標本にて、膀胱癌診断用に開発された標識プローブであるUrovision®(Abbott Molecular Inc, Des Plaines, IL)を用いてFISH法を行い追加診断したところ、診断の正診率が上がることが報告されたものの、膀胱癌用に作成

された本プローブが胆道腫瘍にとって最も優れた診断プローブであるかどうかの検討が全くなされておらず、また細胞診 FISH 法を国内で実施していない施設が多数である。そこで我々は、FISH 法を細胞診標本を中心に行うことにより、より正確な診断が可能かどうか検討することとした。

[方法]

内視鏡的に胆管ブラシ細胞診を施行した患者に対し、ブラシ細胞診検体に対し、Diff Quick 法にて細胞を確実に採取したことを確認後、アルコール固定を行い、細胞診標本を作製する。その標本を用いて FISH 法を行い、染色体・遺伝子変異を検索・比較することによって、腫瘍発生・進展への関与や細胞診精度への臨床的応用へ向けての検討を行った。

① 染色体数の検討

Urovision FISH probe を使用し、3 番、7 番、17 番染色体の ploidy(主に polysomy) を調べた。

② 遺伝子欠失の検討

今回は、p16、p53、という 2 つの癌抑制遺伝子を、locus specific probe を用いて検討した。

FISH 法の施行方法は、過去の文献³をもとに行った。また、FISH 法における判定も、文献を参考にし、一部改変して判定した。すなわち、合計 50 個の細胞を各症例で計測し、①5 個以上の細胞にて、3 番、7 番、17 番染色体のうち 2 染色体以上にて 3 個以上のシグナルが観察された場合、②10 個以上の細胞にて、少なくとも 1 種類の染色体で 3 個以上のシグナルが観察された場合、を悪性と判定した。

なお、本研究は当院における「ヒト遺伝子解析研究」倫理審査の承認を得ている(第 140 号、膵胆道腫瘍発生および進展に関連する、染色体・遺伝子異常の検討とその臨床的意義)。

[結果]

期間中、FISH が施行できたブラシ細胞診検体は 19 例であった。症例の内訳は、男性 6 例、女性 13 例、年齢は平均 75 歳(38-87 歳)、疾患の内訳は胆管良性狭窄 1 例、中下部胆管癌 8 例、胆嚢癌 4 例、肝門部胆管癌 2 例、胆管腫瘍ではないものの、コントロールとして施行した膵頭部癌 4 例であった。これらのうち、胆嚢癌 1 例、膵頭部癌 1 例、中下部胆管癌 1 例の 3 例を除く 16 例にて FISH の解析が可能であった。

解析で来た症例の中では、1例の中下部胆管癌を除くすべての症例で陽性と判定できた。3番染色体は16例中11例(68.8%)に、7番染色体も11例(68.8%)に、17番染色体は12例(75%)に、p16は8例(50%)に、p53は3例(18.8%)に陽性であった。今回の症例内では、p53プローブを追加することにより診断の補助となった症例はみられず、15例すべての症例でUrovisionのみで判定が行えた。陽性判定ができなかった1例はUrovisionと共にp53プローブも陰性であった。今回の結果からは、感度は100%、特異度は93.8%という精度であった。

<FISH 施行例>

- ① Urovision を使用して FISH を施行した、胆管正常細胞。Green (3番セントロメア)、Red (7番セントロメア)、Aqua (17番セントロメア)、Gold (p16)がそれぞれ2個ずつのシグナルで観察される。(写真1)
- ② Urovision を使用して FISH を施行した。胆嚢癌細胞。細胞によりシグナルのばらつきがあるものの、Green、Red、Aqua、シグナルのいずれか、もしくは2個以上のシグナルが3個以上観察され、またGoldのシグナルが1個に減少しているものもみられる。(写真2)
- ③ p53 プローブを使用して FISH を施行した、正常胆管細胞。Green (17番セントロメア)、Red (p53)がそれぞれ2個ずつのシグナルで観察される。(写真3)
- ④ p53 プローブを使用して FISH を施行した、胆嚢癌細胞。Green (17番セントロメア)が3個以上のシグナルを示し、polysomy となっている一方で、Red (p53)のシグナルが観察されず、homozygous deletion を示している。(写真4)

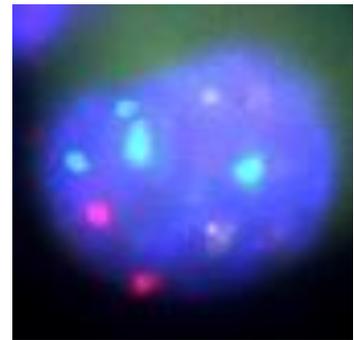


写真1

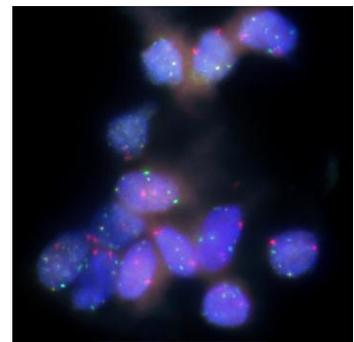


写真2

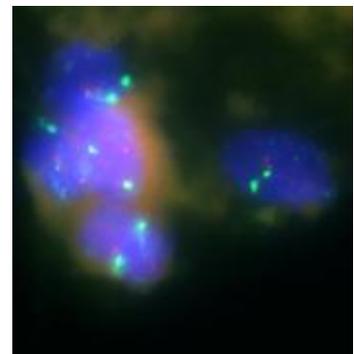


写真3

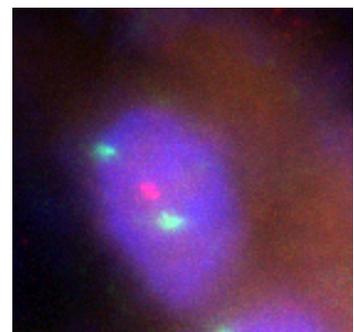


写真4

[考査]

今回の胆道腫瘍における検討では、良性症例が少数であったものの、FISH 法を導入することで、かなりの診断精度を挙げることができた。1 例においては、従来の Urovision を用いた FISH にて陰性であったが、*p53* の FISH でも陰性であり、追加効果を確認することは出来なかった。

課題としては、まず正確に FISH 法を施行する技術の向上である。今回検討で来た標本以外にもアルコール固定による保存を試みたが、実際に FISH 法にて検討できたのは 16 例にとどまった。臨床現場にて正確に補助診断に使用するようにするためには、得られた細胞診標本のほぼ全例で観察可能な FISH 法を施行しなければならず、さらなる技術の向上が望まれる。また、現在の Urovision プローブは 3 個のセントロメアプローブとがん抑制遺伝子の代表である *p16* を組み合わせたものであり、良好な診断精度ではあるものの、特に trisomy 7 は良性胆管上皮でも存在することが報告されており³、より高い精度を追求した次世代の FISH プローブ開発が望まれる。

したがって今後は、特に良性胆道狭窄など良性症例の細胞診を蓄積し、さらなる FISH 法の検討をしていくべきと考える。また、*p53* プローブだけでなく、*HER2* や *SMAD4* といった遺伝子も検討に値するものと考えられ、生検標本も含めて検討していく予定である。

本検討の主題とは異なるが、我々のグループの研究にて、膵癌、慢性膵炎、正常膵管上皮のホルマリン固定パラフィン包埋標本にて、codon 72 と SNP309 という 2 か所の single-nucleotide polymorphism (SNP) を調べたところ、codon 72 における Pro/Pro ジェノタイプが膵癌標本にて有意に多数であり、また SNP 309 の G/G ジェノタイプを持つ膵癌が他のジェノタイプに比べ予後不良であることをつきとめ、本助成金より英文添削費用を出させていただいた。お礼を申し上げますとともに、ご報告させていただく。

[結語]

FISH 法を用いた染色体・遺伝子異常の検出は、悪性細胞検出診断を補助する有用な手法となり得る。しかしながら FISH 法施行の技術のさらなる向上が必要であるとともに、現在のプローブでは擬陽性の細胞も存在するため、今後、より精度の高い FISH プローブの開発が期待される。

[文献]

1. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, et al: Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*;98(2):418-25. 2008.
2. Marsh Rde W, Alonzo M, Bajaj S, et al: Comprehensive review of the diagnosis and treatment of biliary tract cancer 2012. Part I: diagnosis-clinical staging and pathology. *J Surg Oncol*;106(3):332-8. 2012.
3. Kipp BR, Stadheim LM, Halling SA, et al.: A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures. *Am J Gastroenterol*;9(9):1675-81.2004.
4. Levy MJ, Oberg TN, Campion MB, et al: Comparison of methods to detect neoplasia in patients undergoing endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. *Gastroenterology*;142(5):1112-21.2012.
5. Hori Y, Miyabe K, Yoshida M, et al: Impact of TP53 codon 72 and MDM2 SNP 309 polymorphisms in pancreatic ductal adenocarcinoma. *PLoS One*;10(3):e0118829. doi: 10.1371/journal.pone.0118829. eCollection 2015.