

原 著

胃癌におけるChromosomal Instabilityの臨床的意義

内山哲史, 古屋智子¹⁾, 中島正夫, 足立 淳, 内迫博幸, 佐々木功典¹⁾岩国市医療センター医師会病院 外科 岩国市室の木町3丁目6-12 (〒740-0021)
山口大学大学院医学系研究科 分子病理学分野(病理学第二)¹⁾ 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 胃癌, 悪性度, 染色体不安定性, FISH, 予後

和文抄録

癌の治療においては, 個々の症例の悪性度に従った過不足のない治療が行えれば理想的である. 癌の特徴の1つであるchromosomal instability (CIN)が胃癌における悪性度評価の指標として臨床的意義を有するかを検討した. 平成5年12月から平成15年5月までに当科で切除術を施行した胃癌90例を用いた. 年齢は42~89歳(平均68.9歳), 男性67例, 女性23例, 早期癌20例, 進行癌70例であった. 検査材料は摘出標本の1~5箇所から採取した. 7, 11, 17, 18番染色体のセントロメアプローブを用いてfluorescence in situ hybridization (FISH)を行い, 200個の細胞においてそれぞれの染色体数とその染色体数を有する細胞の数を計測し, 染色体のモード値以外の染色体数を有する細胞の割合(variant fraction: VF)を算出することによりCINを評価した. 壁深達度, リンパ節転移, リンパ管侵襲, 静脈侵襲が進むにつれてCINは大きくなる傾向が認められた. CIN1: $VF < 20\%$, CIN2: $20\% \leq VF < 40\%$, CIN3: $40\% \leq VF$ と定義して層別化し, Kaplan-Meier法による生存分析を行った. 7番染色体においてCIN1に比べCIN3で ($p = 0.0385$), 17番染色体においてCIN1に比べCIN3で ($p = 0.0798$), 18番染色体においてCIN1に比べCIN2で ($p = 0.0658$), 及びCIN1に比べCIN3で ($p = 0.00744$), 生存率が有意に低かった. CINの程度が増大するに

つれ予後が不良であった. FISHによるCINは胃癌における悪性度評価の1つの指標として臨床的意義を有すると思われた.

緒 言

胃癌は我が国では罹患率が高く, 又, 進行度は様々であり死亡者も依然として多い. 個々の症例で過不足のない治療を行う為には, それぞれの症例における悪性度の評価が求められる.

癌は遺伝学的に不安定である. genomic instability にはmicrosatellite instability (MSI) と chromosomal instability (CIN) があるが, CINは大部分の癌で認められる¹⁾. この染色体の不安定化は癌の悪性化を誘発する²⁾. 即ち, CINが高度になるにつれて癌の悪性度が高くなることが推測される. 癌では細胞分裂が不安定で, 分裂後の癌細胞の染色体数は正常細胞のように一定(2本)ではなくばらついている. CINは種々の方法で検出することができるが, 手術材料で検討する際にはfluorescence in situ hybridization (FISH)が最も実用的な方法である³⁻⁷⁾.

我々はFISHにより染色体数のバラツキの程度を計測することによりCINを評価した. 臨床病理学的諸因子における進行度毎にCINの大きさを解析し, 臨床的な悪性度とCINの程度との関係について検討した. また, CINと予後との関係についても検討し, 胃癌の悪性度評価の1つの指標としてCINが臨床的意義を有するかを考察した.

材料と方法

材 料：平成5年12月から平成15年5月までに岩国市医療センター医師会病院外科で切除術を施行し、臨床研究（CINの検討等）において摘出標本を使用することについての同意が得られた胃癌症例90例を用いた。年齢は42歳～89歳（平均68.9歳）、男性67例、女性23例であった。早期癌20例、進行癌70例、Stage I 35例、Stage II 14例、Stage III 18例、Stage IV 23例であった。組織型はtub1：5例、tub2：32例、por：33例、pap：8例、sig：8例、muc：4例であった。摘出標本において1～5箇所

の腫瘍組織と対照のため正常組織1箇所を採取し、検査するまで -80°C で保存した。進行癌の場合、検討に用いた組織は腫瘍の表面から5mm角で採取した。

FISH：塗抹標本を作成し100%エタノールで固定後、更にparaformaldehyde/phosphate buffered salineを用いて 4°C で10分間再固定した。染色体7, 11, 17, 18番のセントロメアプローブ（間接法；D7Z1, D11Z1, D17Z1, D18Z1, Oncor, Inc., Gaithersburg, MD, 直接法；CEP7, CEP11, CEP17, CEP18, Vysis IL）を用い、ハイブリダイゼーションは 37°C の孵卵器で約15時間行った。間接法では次いでFITC-avidin（Vector Laboratory, Burlingame, CA）を用いてhybridized probeを免疫染色した。核をpropidium iodide (PI) 又は、4, 6-diamidino, 2-phenylindole dihydrochloride (DAPI II, Abbott) で対比染色し、油浸対物レンズ（ $\times 100$ ）を備えた蛍光顕微鏡（Olympus）により200個の核においてそれぞれのプローブに対するシグナル数を計測した³⁾。

CIN：それぞれの症例で得られた1～5箇所のデータは平均してその症例の結果とした。7, 11, 17, 18番染色体それぞれにおいて、コピー数のモード値以外の染色体コピー数を有する細胞の割合（variant fraction）を算出した^{4, 5, 8)}。CINの評価は、各染色体について細胞間でのシグナル数（染色体のコピー数）のバラツキの程度に基づいて行った。

CINの程度を臨床病理学的諸因子（壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲）⁹⁾と比較した。

またvariant fractionが20%未満の症例をCIN1,

20%以上40%未満の症例をCIN2, 40%以上の症例をCIN3と定義して層別化し、Kaplan-Meier法によりoverall survivalで生存分析を行った^{4, 5)}。経過観察は当院外来通院により行い、また適応症例においては術後補助化学療法を施行した。

統計解析：臨床病理学的諸因子との比較においてはStudent's t testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。生存分析はLog-rank testにより、 $p < 0.10$ を有意差ありとした。

なお、本臨床研究は本院倫理委員会の承認を得て行った。

結 果

正常組織と腫瘍組織の7, 11, 17, 18番染色体における染色体コピー数とそのコピー数を有する細胞の割合をグラフ化し、その典型例を図1に示した。正常組織ではほとんど（94.9%）の細胞でコピー数は2であったが、腫瘍組織ではコピー数は2から5以上までばらついていた。モード値以外の染色体数をもつ細胞の割合が多い（variant fractionが大きい）程染色体数のバラツキが大きい、即ちCINが大きいとした。

variant fractionが20%以上のものをCIN (+) とすると、CIN (+) 症例は染色体7, 11, 17, 18でそれぞれ84%, 79%, 80%, 80%であった。癌の壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲の程度別のCIN (+) 症例数を表1～4に示した。

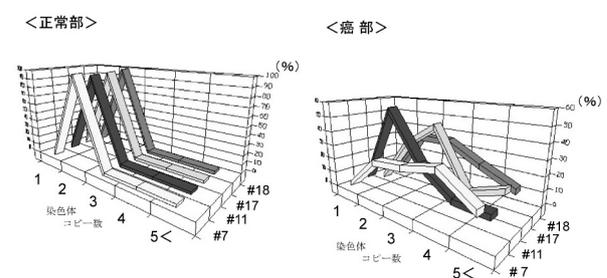


図1 染色体コピー数とその染色体を有する細胞の割合（左：正常部 右：癌部）

正常部では大部分の細胞で染色体コピー数は2である。癌部では染色体コピー数は様々である。

CINと臨床病理学的諸因子との比較：

(1) 壁深達度

壁深達度が深くなるにつれてCINの程度が大きくなる傾向がみられた。染色体7でmとse, smとse, 染色体17でmとmp, mとss, mとse, mとsi, 染色体18でmとss, mとse, mとsiにおいて有意差がみられた(表5)。

(2) リンパ節転移

リンパ節転移との関係についてみると転移が高度になるにつれてCINの程度が大きくなる傾向がみられた。染色体7ではn0とn2, n0とn3, 4において, 染色体18ではn0とn1, n0とn2, n0とn3, 4において有意差が認められた(表6)。

(3) リンパ管侵襲

リンパ管侵襲が高度になるにつれてCINの程度が大きくなる傾向がみられた。染色体7でly0とly3, ly1とly3, ly2とly3において, 染色体18でly0とly1, ly0とly2, ly0とly3において有意差がみられた(表7)。

(4) 静脈侵襲

静脈侵襲が高度になるにつれてCINが大きくなる傾向がみられた。染色体7においてv0とv2, 3間では有意差がみられた(表8)。

利用した染色体4種類では, 染色体7番の細胞間でのコピー数のバラツキが最も臨床病理学的因子と関係していた。

表1 壁深達度とCIN (+) 症例数

	chromosome 7	chromosome 11	chromosome 17	chromosome 18
m	4/7 (57%)	2/7 (29%)	3/8 (38%)	3/8 (38%)
sm	7/12 (58%)	8/12 (67%)	9/12 (75%)	8/12 (67%)
mp	6/7 (86%)	6/7 (86%)	6/7 (86%)	4/7 (57%)
ss	26/28 (93%)	26/29 (90%)	24/28 (86%)	24/27 (89%)
se	23/26 (88%)	22/26 (85%)	22/26 (85%)	22/24 (92%)
si	6/6 (100%)	6/8 (75%)	7/8 (88%)	8/8 (100%)
	72/86 (84%)	70/89 (79%)	71/89 (80%)	69/86 (80%)

表2 リンパ節転移とCIN (+) 症例数

	chromosome 7	chromosome 11	chromosome 17	chromosome 18
n0	23/30 (77%)	22/31 (71%)	21/32 (66%)	22/32 (69%)
n1	23/30 (77%)	26/32 (81%)	27/31 (87%)	23/29 (79%)
n2	19/19 (100%)	16/19 (84%)	17/19 (89%)	17/18 (94%)
n3,4	5/5 (100%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	5/5 (100%)
	70/84 (83%)	68/87 (78%)	69/87 (79%)	67/84 (80%)

表3 リンパ管侵襲とCIN (+) 症例数

	chromosome 7	chromosome 11	chromosome 17	chromosome 18
ly0	15/21 (71%)	13/21 (62%)	14/22 (64%)	14/22 (64%)
ly1	21/25 (84%)	22/26 (85%)	22/25 (88%)	20/23 (87%)
ly2	20/24 (83%)	22/26 (85%)	22/26 (85%)	21/26 (81%)
ly3	16/16 (100%)	13/16 (81%)	14/16 (88%)	15/16 (94%)
	72/86 (84%)	70/89 (79%)	72/89 (81%)	70/87 (80%)

表4 静脈侵襲とCIN (+) 症例数

	chromosome 7	chromosome 11	chromosome 17	chromosome 18
v0	45/57 (79%)	44/58 (76%)	43/58 (74%)	45/57 (79%)
v1	14/16 (88%)	13/17 (76%)	15/17 (88%)	13/16 (81%)
v2,3	13/13 (100%)	13/14 (93%)	13/14 (93%)	11/13 (85%)
	72/86 (84%)	70/89 (79%)	71/89 (80%)	69/86 (80%)

表5 壁深達度とVariant Fraction (%)

	chromosome 7	chromosome 11	chromosome 17	chromosome 18
m	26.4±19.1	21.7±16.9	20.2±8.2	20.6±11.5
sm	29.1±15.4	26.1±12.5	30.9±15.0*	31.9±15.8
mp	40.1±16.6*	38.6±15.5	36.0±14.0**	29.3±15.1**
ss	36.7±13.1	32.3±12.3	34.3±12.4	36.2±12.7**
se	40.1±13.5*	32.9±12.1	34.0±13.1**	38.2±13.5
si	33.0±12.1	31.2±12.7	33.9±12.9*	36.9±11.8*

平均±標準偏差 * p < 0.05 ** p < 0.01

表6 リンパ節転移とVariant Fraction (%)

	chromosome 7	chromosome 11	chromosome 17	chromosome 18
n0	31.6±14.5	28.7±13.6	28.4±13.1	28.1±12.0
n1	35.4±15.8*	33.0±13.9	34.8±17.8	36.2±15.6**
n2	39.8±12.3*	32.9±13.0	34.1±10.9	38.6±12.2**
n3,4	46.0±12.0*	29.5±10.2	38.0±11.0	42.5±12.7*

平均±標準偏差 * p < 0.05 ** p < 0.01

表7 リンパ管侵襲とVariant Fraction (%)

	chromosome 7	chromosome 11	chromosome 17	chromosome 18
ly0	30.8±15.7	28.0±16.3	28.7±13.0	26.4±13.2
ly1	33.6±11.9**	30.8±10.1	33.2±12.7	35.9±11.7*
ly2	35.3±15.4**	31.9±13.5	33.7±14.5	35.4±14.6*
ly3	46.9±11.0*	34.8±13.0	35.4±11.7	41.0±13.4**

平均±標準偏差 * p < 0.05 ** p < 0.01

表8 静脈侵襲とVariant Fraction (%)

	chromosome 7	chromosome 11	chromosome 17	chromosome 18
v0	33.3±15.1	30.1±14.1	31.7±14.1	32.7±14.3
v1	39.0±13.0*	31.7±11.7	33.0±10.5	36.8±13.9
v2,3	43.3±11.6	35.0±10.9	35.9±12.4	37.6±12.6

平均±標準偏差 * p < 0.05

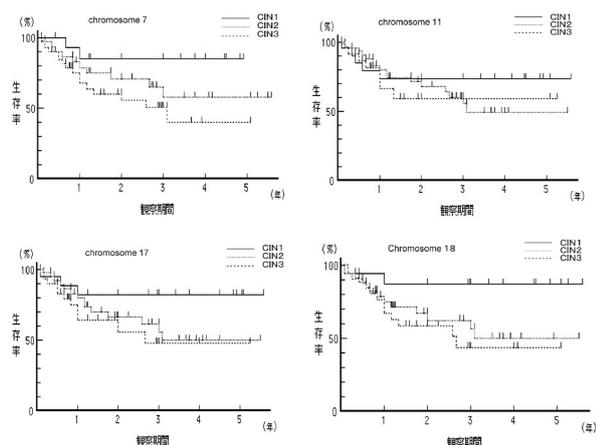


図2 CINの程度別生存曲線

chromosome 7
CIN1 vs. CIN3 : $p=0.0385$
chromosome 17
CIN1 vs. CIN3 : $p=0.0798$
chromosome 18
CIN1 vs. CIN2 : $p=0.0658$
CIN1 vs. CIN3 : $p=0.00744$

生存分析：

Kaplan-Meier法によるCINの程度別生存曲線を図2に示した。染色体7においてCIN1とCIN3で、染色体17においてCIN1とCIN3で、染色体18においてCIN1とCIN2、CIN1とCIN3でCINが大きい程有意に生存率が低かった。

考 察

genetic instabilityは、点突然変異やフレームシフト変異の頻度の増加が認められるmicrosatellite instability (MSI) と染色体の不安定化の頻度の増加が認められるchromosomal instability (CIN) の2つに分類される。大部分の癌においてはCINが認められ、染色体数の増減が認められる^{1, 2)}。

CINはflow cytometry, karyotyping, FISH, comparative genomic hybridization (CGH) 等種々の方法で評価することができる¹⁰⁻¹²⁾ が、ここでは手術による切除材料で評価し易いFISH^{4, 6)} で検討した。7, 11, 17, 18番染色体のセントロメアプローブを用いたFISHでは、染色体数のモード値とモード値からはずれた染色体数を有する細胞数の割合が算定された。各染色体数のモード値は2, 3, 4が多かったが、それぞれのモード値に一致した染色

体数を有する細胞数は少なく、染色体数が細胞間で大きく異なっていることが示された。モード値から外れた染色体数をもつ細胞数の割合 (variant fraction) を計算し、これが大きい程CINが大きいと仮定した^{1, 4, 7, 8)}。

染色体数の異常が生じる機序には種々あるが¹³⁾、細胞周期チェックポイントのうちG2/M期チェックポイントの異常が染色体異数化の原因として注目されている¹⁴⁾。紡錘体や紡錘体極の形成異常が起こった場合、染色体が複製後にまったく分配されずにつきの細胞周期に進んでしまう4倍体 (tetraploid) や不均等な分配による異数体 (aneuploid) が出現する。この為癌遺伝子の発現が過剰になったり、癌抑制遺伝子や増殖制御にかかわる遺伝子が配座している染色体が分配されないなどにより細胞の癌化、悪性化が引き起こされる^{15, 16)}。癌ではその為一層染色体異常が進むことになる。その結果CINが大きい程癌の悪性度は高くなると考えられる。

悪性度の指標としての壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲とCINの程度との関係について検討した。これらの臨床病理学的諸因子が高度になるにつれてCINは大きくなる傾向が認められ、CINが壁深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲の進展と関係していることが推測された。

検討した染色体4種類では、染色体7番の細胞間でのコピー数のバラツキが最も臨床病理学的因子と関係していたが、今回は染色体数のバラツキの面からの検討であり、7番染色体上の特定の遺伝子の異常については想定できない。

FISHによるCINと予後の関係を検討した報告は、肺癌^{7, 17)}、脳腫瘍¹⁸⁾、リンパ腫¹⁹⁾、口腔癌⁴⁾等でみられる。これらでは、CIN (+) の症例の予後がCIN (-) の症例に比べて有意に不良であることが報告されている。我々の胃癌での検討でもCINが大きい程予後不良であった。即ち、CINが癌の進展に伴って大きくなることが明らかとなり、予後マーカーとなりうることを示された。

癌の手術、補助療法、経過観察においては、個々の症例に応じた対応が理想的である。近年適応症例では縮小手術や機能温存手術または拡大手術が積極的に行われている。この為には個々の症例の悪性度評価が重要となる。今回行ったFISHによるCIN評価は通常検査ではないが、簡単に実施でき、悪性度

の指標の1つとすることができる。これを術前に検討すれば、縮小手術または拡大手術において、切除範囲やリンパ節郭清の有無、郭清範囲の決定に役立つ、術後では補助療法の決定や、経過観察方法決定等に役立つと思われる、胃癌の治療において臨床的に意義を有するものと考えられた。

FISHによるCIN評価の有用性をより明確にするためには、更に層別化した検討が必要である²⁰⁾。

結 論

FISHにより計測したCINは癌の進行につれて増大し、又、CINの高度なものの程その予後は不良であった。FISHにより計測したCINは臨床的な悪性度評価に有用と考えられた。

引用文献

- 1) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998 ; **396** : 643-649.
- 2) 高橋孝太. 大規模な染色体改編を促進する分子機構. 久留米医学会雑誌 2005 ; **68** : 261-269.
- 3) Furuya T, Uchiyama T, Murakami T, Adachi A, Kawauchi S, Oga A, Hirano T, Sasaki K. Relationship between Chromosomal Instability and Intratumoral Regional DNA Ploidy Heterogeneity in Primary Gastric Cancers. *Clinical Cancer Research* 2000 ; **6** : 2815-2820.
- 4) Sato H, Uzawa N, Takahashi K, Myo K, Ohyama Y, Amagasa T. Prognostic utility of chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspirates from oral squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* 2010 ; **10** : 182.
- 5) Kawamura K, Moriyama M, Shiba N, Ozaki M, Tanaka T, Nojima T, Fujikawa-Yamamoto K, Ikeda R, Suzuki K. Centrosome Hyperamplification and Chromosomal Instability in Bladder Cancer. *European Urology* 2003 ; **43** : 505-515.
- 6) Miyazaki M, Furuya T, Shiraki A, Sato T, Oga A, Sasaki K. The relationship of DNA ploidy to chromosomal instability in primary human colorectal cancers. *Cancer Res* 1999 ; **59** : 5283-5285.
- 7) Nakamura H, Saji H, Idiris A, Kawasaki N, Hosaka M, Ogata A, Saijo T, Kato H. Chromosomal Instability Detected by Fluorescence in situ Hybridization in Surgical Specimens of Non-Small Cell Lung Cancer Is Associated with Poor Survival. *Clinical Cancer research* 2003 ; **9** : 2294-2299.
- 8) 池本健三, 江口 賢, 古屋智子, 小賀厚徳, 河内茂人, 松山豪泰, 佐々木功典. Multicolor-FISHを用いた尿路上皮癌の診断とgrade分類の基礎的検討. *Cytometry Research* 2011 ; **21** : 65-70.
- 9) 胃癌研究会編. 胃癌取り扱い規約. 改訂第12版. 金原出版. 東京, 1993.
- 10) Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Alleotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989 ; **244** : 207-211.
- 11) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992 ; **258** : 818-821.
- 12) Jass JR, Mukawa K, Goh HS, Love SB, Capellaro D. Clinical importance of DNA content in rectal-cancer measured by flow cytometry. *J Clin Pathol* 1989 ; **42** : 254-259.
- 13) Reshmi SC, Gollin SM. Chromosomal Instability in Oral Cancer Cell. *J Dent Res* 2005 ; **84** : 107-117.
- 14) 寺田泰比古. G2/M期チェックポイント異常と染色体不安定性. 実験医学 1998 ; **16** : 1631-1637.
- 15) 野島 博. 癌の悪性化と細胞周期チェックポイント異常. 最新医学 1997 ; **52** : 49-54.
- 16) 小林泰久, 佐々木泰史, 伊藤文生, 今井浩三. 染色体の不安定性. *GI Research* 1999 ; **7** : 72-73.
- 17) Yoo J, Seo KW, Jang SJ, Oh Y, Shim TS, Kim

- WS, Lee D, Lee S, Choi C. The Relationship between the Presence of Chromosomal Instability and Prognosis of Squamous Cell Carcinoma of the lung : Fluorescence in situ Hybridization Analysis of Parafin-embedded Tissue from 47 Korean Patients. *J Korean Med Sci* 2010 ; 25 : 863-867.
- 18) Nishizaki T, Harada K, Kubota H. Chromosome instability in malignant astrocytic tumors detected by fluorescence in situ hybridization. *J Neuro Oncol* 2002 ; 56 : 159-165.
- 19) Caraway NP, Thomas E, Khanna A, Payne L, Zhang H, Lin E, Keating MJ, Katz RL. Chromosomal abnormalities detected by multicolor fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspirates from patients with small lymphocytic lymphoma are useful for predicting survival. *Cancer* 2008 ; 114 : 315-322.
- 20) 内山哲史, 新庄泰孝, 下田宏二, 足立 淳, 村上卓夫, 佐々木功典. 早期胃癌における Chromosomal Instabilityの検討. *日本外科学会雑誌* 2000 ; 101 : 435.

Clinical Significance of Chromosomal Instability in Gastric Cancer

Tetsuji UCHIYAMA, Tomoko FURUYA¹⁾, Masao NAKAJIMA, Atsushi ADACHI, Hiroyuki UCHISAKO and Kohsuke SASAKI¹⁾

Department of Surgery, Iwakuni Medical Center, 3-6-12 Muronokityou, Iwakuni, Yamaguchi 740-0021, Japan 1) Department of Molecular Pathology (Pathology II), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate clinical significance of chromosomal instability (CIN) in primary gastric cancer. In 90 sporadic gastric carcinomas, we measured numerical aberrations for chromosome 7, 11, 17 and 18 by fluorescence in situ hybridization (FISH) with genomic probes for the centromeres of chromosome. Hybridization signals were counted in 200 interphase nuclei. The modal copy number of each chromosome was determined. The fraction of cells with chromosome numbers that differed from the mode (Variant Fraction : VF) was calculated for each chromosome. The degree of CIN was defined according to the size of VF. The degree of CIN was associated significantly with increased tumor depth, lymphnode metastasis, lymphatic invasion and venous invasion. When the grade of CIN was defined as follows : CIN1 ; $VF < 20\%$ of the cells, CIN2 ; $20\% \leq VF < 40\%$ of the cells, CIN3 ; $40\% \leq VF$, CIN status significantly correlated with overall survival (chromosome 7 : CIN1 vs. CIN3 $p=0.0385$, chromosome 17 : CIN1 vs. CIN3 $p=0.0798$, chromosome 18 : CIN1 vs. CIN2 $p=0.0658$, CIN1 vs. CIN3 $p=0.00744$). Analysis of CIN status may be clinically significant in evaluation of degree of malignancy in patient with gastric cancer.