特集

マイクロディセクション法を
利用した疾患の遺伝子研究順天堂医学 46(4)
p. 416~422 (2001)マイクロディセクション法と
遺伝子診断**

Tissue microdissection and molecular diagnosis

野口 雅之*

MASAYUKI NOGUCHI

悪性腫瘍の診断に染色体の欠失や特定の遺伝子異常所見を用いる際は正確に腫瘍細胞のみを解析することが重要である。つまり悪性度の指標を正確に求めるのであれば、解析したい部位に存在する腫瘍細胞を正しく採取して、その遺伝子異常を解析することが求められるからである。この目的を可能にするような組織マイクロディセクション法の技術が実用化されつつある。レーザー光を利用した組織マイクロディセクション法を中心に特定の細胞群を採取する方法論とこれを利用した分子病理学について解説した。

具体例として組織マイクロディセクション法を利用した遺伝子診断の例を4つあげた。

(1) 再発肺癌の遺伝子診断を細胞診材料を用いて行った。胸水細胞診材料中の異型細胞におけるp53遺伝子やras遺伝子の点突然変異をPCR-SSCP法で解析することによって再発をより早期に発見できることを示した。(2) 臓器に複数の癌病巣が存在するとき、その起源が多中心性発生か転移性かを明確に鑑別することは、その臓器癌の発癌過程を理解し、組織発生を解明するために重要である。前立腺癌を例にとりて組織マイクロディセクション法を利用した解析を示した。(3) 卵巣内膜性嚢胞と内膜癌や明細胞癌との関係をPTEN遺伝子領域の染色体欠失と点突然変異を解析することによって検討した。その結果PTEN遺伝子の不活化が卵巣内膜癌や明細胞癌の発癌のごく初期に起こっていることを示し、卵巣内膜性嚢胞からこれらの癌へ進展する連続的な多段階発癌機構が存在することを示した。(4) 消化管リンパ腫の遺伝子診断(ミクロの遺伝子診断の限界)を示した。リンパ濾胞の芽中心をマイクロディセクション法にて解析すると個々の芽中心について平均2.4から2.5個の再構成バンドが認められることを示した。この結果は胃生検や大腸の生検でMALT typeのリンパ腫を診断する際には注意が必要であることを示している。

キーワード：レーザー光、クローン性、再発肺癌、前立腺癌、卵巣子宮内膜性嚢胞

Key words : laser, clonality, recurrent lung cancer, prostate cancer, ovarian endometriotic cyst

はじめに

*筑波大学基礎医学系病理学

Department of Pathology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

**第293回順天堂医学会学術集会〔Sept. 21, 2000 開催〕
〔Jan. 19, 2001 原稿受領〕

診断学上、遺伝子解析は家族性大腸腺腫症や遺伝性非ポリポーシス大腸癌などの家族性腫瘍においては最も重要な検査であるが、その他、癌の悪性度診断・多発癌・再発癌の診断等にも応用され

つつある。しかし、一般に悪性腫瘍の診断に染色体の欠失や特定の遺伝子異常所見を用いる際は、胚細胞点突然変異解析などのように患者のいかなる部分の組織を対象にして遺伝子解析してもよい場合と異なり、正確に腫瘍細胞のみを解析することが重要である。なぜなら腫瘍組織は腫瘍細胞の他にも多くの間質細胞（血管内皮細胞・線維芽細胞など）を含んでいるからである。

発癌とは遺伝子学的に多段階に発生する事象であり、癌部と前癌病変部・原発巣と転移巣、そして癌の内部においても、腫瘍細胞はモノクローナルな集団とはいえない。固形癌においては分化度の異なる病変が共存していることはよく認められることであるが、遺伝子学的にこれら分化度が異なる腫瘍細胞群は異なった細胞集団であることが証明される例もある。つまり悪性度の指標を正確に求めるのであれば、解析したい部位に存在する腫瘍細胞を正しく採取して、その遺伝子異常を解析することが必要である。

近年上記の目的を可能にするような組織マイクロダイセクション法の技術が実用化されつつある。以下、レーザー光を利用した組織マイクロダ

イセクション法を中心に特定の細胞群を採取する方法論とこれを利用した分子病理学について解説する。

組織マイクロダイセクション法の比較

マイクロダイセクションの方法は針・楊枝など、あるいはマイクロマニピュレーターを用いたマニュアル操作による方法とレーザー光を用いて切除するマイクロダイセクション法の2群に大別される。

後者の方法論によるPixcell™ system（以下LCM）、Arcturus Engineering, Inc.（<http://www.arctur.com>）とP.A.L.M.™ Laser-Microscope-Systems（以下PALM）、P.A.L.M. GmbH（<http://www.PALM-Mikrolaser.com>）が代表的である。LCMとPALMはともにレーザーを用いているが、その原理は異なっており、LCMでは標本に直接転写フィルムを接触させ、レーザー光を照射するとその照射部のみがフィルムに転写される。一方、PALMは細胞または目的部分の周囲を破壊切断することで目的部を得る方法である。

表-1 レーザー光を利用した組織マイクロダイセクション法の比較

	LCM	PALM
レーザー光源	炭酸ガスパルスレーザー	窒素パルスレーザー
波長	10 μm	337 nm
レーザーのファークス径	7.5 μm 以上	0.1 μm 以下
切削方法	局所的な加熱による融解転写	高密度光子による非加熱破壊
サンプルの前処置	通常の薄切標本で可能	薄切標本を特殊なフィルムに載せて染色の後に反転して切削するためやや煩雑である。
レーザーの照射	単発照射をくり返すため採取細胞数が多いときには効率が悪い。	目的の細胞集団の周りを切断するため集塊が取りやすい。
操作性	モニタ画面の移動は通常通りステージで行う。 トリガー使用	モニタ画面の移動はパソコン上で行う。 フットスイッチ使用
細胞の採取	転写フィルムを直接バッファーに接触させるためロスが少ない。	採取部をPCRチューブのキャップ内に飛ばすため紛失の危険がある。
価格	比較的安価	比較的高価

各方法の特徴を表-1にまとめた。いずれの方法でも、検体からDNA・RNA・タンパクの抽出が可能であるが、もちろん検体の保存状態や標本の作成方法の違いによって採取できる核酸・タンパクの変性度は異なっている。針・楊枝などを用いたマイクロダイセクションは簡便で安価であるが正確性に劣る。マイクロマニピュレーターを用いた方法は細胞1個を採取することが可能で正確な方法だが手技に熟練を要し、また検体採取までに時間がかかるため、特にRNAの採取には不適当である。LCMは簡便だが特殊な転写フィルムを購入する必要がある。PALMはLCM同様正確だが前処理が煩雑であり、標本作製にやや熟練を要す。

しかしいずれの方法を選択するかについては、得た検体でどのような遺伝子解析を行うかが最も大事な要件となる。Loss of heterozygosity (LOH) をPCR-LOH法により確認する場合には目的の細胞群が検体の7割以上を占める必要があるが、PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法などを用いて突然変異のスクリーニングをする場合にはPCR-LOH解析ほどの正確さは要求されない。一方、RT-PCR法を用いた遺伝子発現の解析には10個程度の細胞数でもよいから正確な材料採取が必要だが、cDNAライブラリーを作る場合にはsingle cellを採取できる正確さと1000個以上の細胞数を採取できる簡便さを兼ね備えている必要がある。特にRNAやタンパクを検体とする場合にはDNAより迅速な施行を要求されるため、手技が簡便であるものが好まれる。このように、採取した検体を何に應用するかによってマイクロダイセクションの方法は選択されるべきであろう¹⁾²⁾。

マイクロダイセクション法を利用した 病理診断の実例や分子病理学的解析例

1. 再発癌の遺伝子診断³⁾

同時性あるいは異時性の多発癌の遺伝子診断が可能であるとすれば再発癌の遺伝子診断も同様な

方法論で可能である。特に今後遺伝子治療や陽子線治療などの新しい治療法が効果を示すようになればなるほど第2次癌の診断とともに再発癌をできるだけ早く確診することは患者の予後を改善するために重要である。そこで胸水からの細胞診材料を利用して肺癌の再発の遺伝子診断を試みた。肺癌はしばしば悪性胸水として再発する。この再発診断を少数の胸水中の癌細胞から確診できれば、再発に対する治療をより早く開始できる。そこで細胞診材料を利用した遺伝子解析を癌の再発の早期診断に応用する可能性を検討した。用いた症例は16例の肺癌切除後悪性胸水で再発した例である。この中には2例の多重癌も含まれている。

用いた方法は前述したPCR-SSCP法とDNAシーケンス法を組み合わせる癌抑制遺伝子であるp53と癌遺伝子であるK-rasの突然変異を解析しこれをマーカーにして切除材料の異常と再発細胞診のそれとを比較した(図-1)。p53のSSCP解析にはexon 4 5 6 7 8の各exonを、K-rasの解析にはexon 1を用いた。切除材料についてはホルマリン固定後パラフィン包埋ブロックの薄切標本から、細胞診材料については診断に用いた細胞診材料のカバーガラスをはがして乾燥させた標本から、組織細胞マイクロダイセクション法にて腫瘍

図-1 手術切除検体と同一の再発細胞診検体を用いたK-rasとp53遺伝子のPCR-SSCP解析

矢頭に異常バンドを認める。N：正常組織、Ts：手術的に切除した腫瘍、Tc：再発腫瘍細胞（細胞診材料）、Tc1：再発腫瘍細胞（single cell）。（文献 3）より引用）

細胞と診断された異型細胞を採取してここからDNAを抽出し、これらを解析に用いた。得られた異常バンドについては核酸の塩基配列も決定した。まず手術的に切除された原発癌について解析するとp53遺伝子については6つの異常バンドが、K-ras遺伝子については1つの異常バンドが検出された。p53遺伝子のexon 7の異常が4例に、exon 4と5の異常が2例に、exon 7とK-ras遺伝子のexon 1の異常をとともに持つ症例が1例見つかった。

一方、細胞診材料から採取されたDNAを用いた解析では合計5つの異常バンドが検出され、これらは手術材料で検出された異常バンドのうちの5つと同じサイズのものであった。これらの異常バンドが手術材料から得られた異常バンドと同じ核酸塩基配列を有することを確認するためにその塩基配列を解析した。5つのバンドのうち4つはミスセンス変異であり、1つはサイレント変異であった。これらの変異は手術材料・細胞診材料で一致した。しかしながら、手術材料で検出された2症例で見つかったp53遺伝子のexon 4と7の異常は細胞診材料では検出できなかった。以上の結果より、解析した16例のうち4例については遺伝子学的にも再発であることが確認できた。細胞診で同じ異常を見つけられなかった2症例については胸水中に出現した細胞が別の癌であった可能性、原発部の腫瘍が遺伝子学的にヘテロが集団でたまたまp53遺伝子異常を持たない成分が再発してきた可能性、細胞診材料での診断がoverdiagnosisであった可能性などが考えられる。

以上のような不一致例の正しい解釈は多くの症例にこの診断法を応用していくうちに明らかになってくると考えられる。いずれにしても細胞診材料は腫瘍の再発診断には日常的に用いる重要な形態診断であり、かつアルコール固定であるので核酸の保存が良くホルマリン固定した組織材料より遺伝子解析に適しているという利点がある。原発例の遺伝子解析が十分になされていれば細胞診材料で同じ遺伝子異常を確認することによって再発の遺伝子診断が可能であることを示した。

2. 前立腺癌は多発し易い癌なのか腺内転移し易い癌なのか⁴⁾

臓器に複数の癌病巣が存在するとき、その起源が多中心性発生か転移性を明確に鑑別することは、その臓器癌の発癌過程を理解し、組織発生を解明するために重要である。組織マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析をするといままで解釈がまちまちであった事象がより正確に評価できるようにもなる。たとえば前立腺癌はそのほとんどが腺癌であり、前立腺癌の特徴の一つとして切除材料を用いた病理学的観察をすると同一腺内に複数の腫瘍結節を認めることが多いことがあげられる。組織マイクロダイセクション法を用いてこれら多結節腫瘍からそれぞれ腫瘍細胞を分離して採取することが可能になってきた。試みに採取された少数の癌細胞からDNAを抽出して前立腺癌で報告の多い染色体欠失のパターンを比較検討することによってこれら多結節腫瘍が多中心性の癌なのか、一つの前立腺癌の腺内転移なのかを解析してみた。前立腺癌では種々の染色体が欠失していることが報告されているが、中でも3p・7q・8p・10q・16p・17q・18qなどに頻度が高い。そこで25症例の全摘された前立腺腫瘍組織から63の異なった組織型を示す場所を選んで、組織マイクロダイセクション法により腫瘍細胞のみを採取した。

調べた染色体の部位は3p (D3S647・D3S1228)・7q (D7S522)・8p (D8S137・NEFL)・10q (D10S190)の6箇所である。検索した染色体部位のいずれかに欠失を認めた症例は10例あり、そのうち8例は同一腺内の組織型の異なる部位でその染色体欠失のパターンが異なっていることがわかった(図・2)。異なる組織型を示す結節ごとに染色体の欠失のパターンが異なること、また解析症例の中には通常悪性度がより高いと考えられる低分化部に染色体欠失が認めないのに、高分化や中分化部に認める症例もあった。この事実は腺内転移によって染色体の欠失が加算されたとも考えにくい。むしろ組織型によって欠失のパターンが異なることは、それぞれの欠失が異なったク

B : biopsy specimen, S : resected specimen,
N : non-tumorous region, W : well differentiated,
M : moderately differentiated, cap : capsular invasion,
P : poorly differentiated

図-2 前立腺癌のLOH解析

手術材料にはヘテロな組織型が認められ、LOHのパターンが異なる。(文献 4)より引用)

図-3 卵巣子宮内膜嚢胞に見出されたPTEN遺伝子領域のLOHとPCR-SSCP解析で見つかった異常バンド

T : 卵巣子宮内膜嚢胞, N : 正常子宮内膜。

(文献 5)より引用)

ローンから構成されていることを示していると解釈される。以上より前立腺癌にしばしば認められる同一腺内の多結節病変は一つの腫瘍の転移ではなく、むしろ多中心性の多発腫瘍と解釈すべきであることがわかる。

この事実はこれから近い将来にそれぞれの染色体欠失の生物学的意味づけが明らかになってきて、この知見を利用した遺伝子診断が実用化されたとしても腫瘍のごく一部しか採取しない針生検材料の遺伝子解析では腫瘍全体の遺伝子学的悪性度を正しく評価することは難しいことも示唆している。事実、前述した症例の針生検例では、検体の組織型は低分化腺癌でNEFLの欠失が認められるが、欠失を持たない高分化腺癌は採取されてい

ないので、この存在は生検では診断できていない。

3. 卵巣内膜性嚢胞は内膜癌や明細胞癌の前癌病変を言えるか⁵⁾

チョコレート嚢胞は卵巣明細胞腺癌・類内膜腺癌の約3割と共存し、またチョコレート嚢胞の管理中に癌化する確率も0.7~1.0%あると言われている。一方、婦人科腫瘍においては子宮内膜癌・卵巣類内膜腺癌で癌抑制遺伝子PTENに約40%と高頻度の突然変異を認めることが知られている。そこで卵巣類内膜腺癌の前癌病変と考えられるチョコレート嚢胞における異所性内膜のPTEN遺伝子異常を組織マイクロダイセクション法を利用して検討した。

チョコレート嚢胞は間質を伴った異所性内膜を内腔に有するが内膜は一層であり、この異所性内膜細胞を正確に採取するためにLCMを用いた。LCMで採取した8細胞相当から抽出したDNAを用いて、D10S541・D10S215・D10S608のPTEN遺伝子領域の3カ所のマイクロサテライト多型を利用してPCR-LOH法にて10番染色体長腕のPTEN領域の染色体欠失を解析した(図-3)。また、PTEN遺伝子の突然変異についてはPCR-SSCP法にて認められたシフトしたバンドからPCR産物を抽出し、これに対してクローニングシーケンス法を行いその核酸塩基配列を決定した。用いた症例は20例の卵巣内膜癌、24例の卵巣明細胞癌、そして34例のチョコレート嚢胞である。10q23.3領域のLOHは卵巣内膜癌で42.1%に、明細胞癌で27.3%に見つかったが、チョコレート嚢胞でも56.5%という高率にLOHが発見された。PTEN遺伝子の点突然変異も卵巣内膜癌で20.0%に、明細胞癌で8.3%にそれぞれ見つかったが、チョコレート嚢胞でも20.6%の症例に点突然変異が認められた。これらの結果はPTEN遺伝子の不活化が卵巣内膜癌や明細胞癌の発癌のごく初期に起こっていることを示し、卵巣内膜性嚢胞からこれらの癌へ進展する連続的な多段階発癌機構が存在することを示している。

図-4 反応性リンパ節の芽中心から組織マイクロダイセクション法にて標本を採取する
(文献 6) より引用)

4. 消化管リンパ腫の遺伝子診断 (ミクロの遺伝子診断の限界)⁶⁾

マイクロダイセクションを用いた解析の利点は少数細胞を用いた解析が可能であることにあるが、注意すべき点もある。たとえば、われわれはB細胞性の悪性リンパ腫の補助診断としてイムノグロブリン遺伝子の重鎖の再構成の有無を用いるが、微小検体に対してPCR反応を用いた解析を行うと偽陽性の結果を得ることがある。試みにリンパ濾胞の芽中心をマイクロダイセクション法にて多数採取して2つのプライマーセットでsemi-nested PCRを行いイムノグロブリン重鎖の再構成を検索してみると28個の芽中心を解析して67から71の再構成バンドを認めた (図-4, -5)。つまりその結果はスメアパターンを示さず、個々の芽中心について平均2.4から2.5個の再構成バンドが認められることになる。実際シングルバンドとして認める芽中心は28個中4から5個 (16%) 存在していることがわかった。

この結果は胃生検や大腸の生検でMALT typeのリンパ腫を診断する際には注意が必要であるこ

図-5 図-4で得られたDNAをテンプレートにしたイムノグロブリン重鎖のnested-PCR解析
A: プライマーとしてFR3Aを用いた場合, B: プライマーとしてFR2Aを用いた場合, M: サイズマーカー, 数字は図-4の部位に対応する, 9: リンパ節すべてから採取したDNA. (文献 6) より引用)

とを示している。形態学的に明らかに慢性胃炎、あるいは非特異性大腸炎と診断されたそれぞれ19例・25例の生検材料を材料としてイムノグロブリン重鎖の再構成を上記のnested PCR法を用いて検索するとそれぞれ3例 (21.1%・16%) にシングルバンドを検出した。このように微小材料を用いた検索をする際は偽陽性を見ている可能性があることを念頭にいれて注意深い検討が必要である。

おわりに

組織マイクロダイセクション法の原理を示し、これを用いた病理学的解析をいくつか紹介した。病変組織全体から抽出した核酸を用いた遺伝子解析が、いわばマクロの遺伝子解析とするなら、組織マイクロダイセクション法を用いた遺伝子解析はミクロの遺伝子解析といえることができる。形態学的知見と分子生物学的知見とを有機的に結びつけた病理診断を行えばより疾患の本質にせまる診断がなされるのは明らかであり、組織マイクロダイセクション法を利用したミクロの分子病理学的重要性がますます増してきた。

文 献

- 1) 佐藤奈加子, 青柳靖之, 野口雅之: Laser assisted microdissection 法を中心とした組織局所の遺伝子診断. 病理と臨床, 2000; **18**: 624~627.
- 2) 瀧本泰彦, 野口雅之: 多重癌・再発癌の遺伝子診断. 病理と臨床, 2000; **18**: 666~671.
- 3) Dai Y, Morishita Y, Mase K, *et al.*: Application of the p53 and K-ras gene mutation patterns for cytologic diagnosis of recurrent lung carcinomas. Combined analysis with microdissection and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphysm. Cancer (Cancer Cytopathol), 2000; **90**: 258~263.
- 4) Takimoto Y, Shimazui T, Akaza H, *et al.*: Genetic heterogeneity of surgically resected prostate carcinomas and their biopsy specimens is related to their histologic differentiation. Cancer, 2001; **91**: 362~370.
- 5) Sato N, Tsunoda H, Nishida M, *et al.*: Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: Possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. Cancer Res, 2000; **60**: 7052~7056.
- 6) Iijima T, Inadome Y, Noguchi M: Clonal proliferation of B lymphocytes in the germinal centers of human reactive lymph nodes: Possibility of overdiagnosis of B cell clonal proliferation. Diagn Mol Pathol, 2000; **9**: 132~136.