

ゲノム資源を活用した新規間期核FISH法の開発と癌ゲノム異常の包括的解析への応用

●嘉数 直樹

京都府立医科大学衛生学教室（現 保健・予防医学教室）

＜研究の目的と進め方＞

spectral karyotyping (SKY) 法を基盤にして、新規間期核FISH法を確立し、癌の染色体ゲノム異常の包括的解析へ応用する。間期核FISH法は、特定の染色体の数的異常、遺伝子の増幅や欠失、および転座などの構造異常を、分裂中期染色体が得られなくとも検出できる点で有用である。しかし、この方法では一回で解析可能なプローブが1～2種類と限られていた。最近、スペクトル解析でFISHシグナルを捕捉する技術（spectral FISH法）を導入することによって、5種類以上のプローブを同一の間期核上において異なる色調で検出することが可能になった。この技術を活用して、癌の病型に特異的あるいは高頻度に認められる複数の染色体・遺伝子異常を包括的に同定できる解析システムを開発する。spectral FISH法用プローブのリソースは、ゲノム資源としてのBACクローンライブラリーを活用する。

研究の進め方としては、特定の固形腫瘍において、その病型や悪性度に密接に関連して増幅することが知られている5種類程度の癌遺伝子について、腫瘍細胞単位で各々のコピー数を包括的に検出可能にすることから取り組む。

＜研究開始時の研究計画＞

- 1) 癌の代表的な病型ごとに、関連する癌遺伝子を検出できるBACクローンのプローブセットを準備する。
- 2) 1) で準備したプローブを用いて、4種類の蛍光色素を用いて異なる組み合わせになるように直接標識する。これらの標識化合物を混合しプローブとして、蛍光シグナルをスペクトル解析で検出し、各プローブに対応した蛍光色素の組み合わせに特有なスペクトルパターンを識別させて、その遺伝子ごとに指定した固有の疑似カラーで表示できるようにする（spectral FISH法）。初めに、正常間期核においては、各プローブに対応して2コピーずつ検出することが可能か確認する。
- 3) 腫瘍間期核では、異常コピー数が一回の解析で同定することが可能か評価する。

＜研究期間の成果＞

- 1) ゲノム資源としてのBACライブラリーを活用して、固形腫瘍では増幅遺伝子、造血器腫では転座関連遺伝子を中心に、spectral FISH検出用のプローブとなるBACクローンを50以上同定した。
- 2) 初めに、5種類の染色体セントロメアプローブを用いたspectral FISH法によって、正常間期核では2コピーずつ指定した固有の疑似カラーで検出することができた。また、遺伝子プローブについても、B細胞性リンパ腫におけるIgH遺伝子とその代表的な転座相手遺伝子（MYC, BCL1, BCL2, BCL6）の計5種類の遺伝子のシグナルを正常な分裂中期染色体上と間期核上で、それぞれ正確に識別して検出することができた。
- 3) 乳癌において高頻度で増幅していることが知られている5種類の遺伝子、FGFR1、MYC、CCND1、HER2、

ZNF217をそれぞれ含むBACプローブを用いたspectral FISH法を行った。その結果、正常分裂中期染色体では、おのおのの染色体上の局在に一致して異なる色調でシグナルを検出することができた。また乳癌細胞株の間期核では、この5種類の乳癌関連増幅遺伝子のそれぞれについて、一回の解析で同時にコピー数の異常な増加を包括的に決定することが可能になった。

＜国内外での成果の位置づけ＞

国外では、染色体セントロメアプローブを用いたspectral FISH法が、2001年度に既に報告されている。しかし、癌に関連した遺伝子のコピー数異常を包括的に同定できるspectral FISH法の開発は、まだ報告されていない。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

技術的に困難な点はなかったが、間期核の厚みによる焦点深度の違いにより、シグナルが捕捉されないことが、この解析の欠点として挙げられた。

ヒトゲノム解析計画の副産物として、染色体ごとにBACクローンの整列地図が作成された。この潤沢なゲノム資源を活用することにより、既知の遺伝子を含むBACクローンの検索が容易になった。しかし、腫瘍臨床検体は入手が困難であったため、細胞株でしか解析できなかった。

＜今後の課題＞

現時点では、5～6種類のプローブをおのおの異なる色調で検出することが可能になった段階である。今後は、蛍光色素の組み合わせをさらに増やし、より多数の遺伝子を同時に解析できるように進展させたい。

乳癌以外にも各種の癌について、病態・悪性度に密接に関連した重要な遺伝子を多数選び、それらのコピー数の異常を包括的に検出する解析を進め、その有用性を評価する。B細胞性リンパ腫に関しては、IgH遺伝子の転座相手先を融合シグナルによって同定する検出系が既に診断に利用されている。これにspectral FISH法を導入して、複数の候補の中から転座相手先を一回の解析で決定可能な方法に発展させる。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1) 論文

1. Imamura, T., Kakazu, N., Hibi, S., Morimoto, A., Ikushima, S., Fukushima, Y., Ijuin, I., Hada, S., Kitabayashi, I., Abe, T., and Imashuku, S., Rearrangement of the MOZ gene in pediatric therapy-related myelodysplastic syndrome with a novel chromosomal translocation t (2;8) (p23;p11), Genes Chromosomes Cancer, 36, 413-419 (2003) .