

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2014～2015  
課題番号：26861312  
研究課題名(和文) CISH法による絨毛分子病型診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of molecular pathological

## 研究代表者

加来 博志 (KAKU, Hiroshi)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40456059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：日常診療で用いられる、パラフィンブロック検体を用いて、STR多型解析に匹敵する、分子病型診断法の確立を企画した。セントロメア近傍のプローブを用いたChromogenic in situ Hybridization(CISH法)による倍数性診断CISH法と、これまでに確立されたp57KIP2免疫染色法(雄核発生奇胎が抽出可能である)を合わせた絨毛の分子病型診断法の確立を目的とした。CISH法で解析したところ、75%の症例でCISHシグナルを得ることができたが、25%の症例では、シグナルが得られなかった。CISHシグナルを安定して獲得するには、検体の処理法が重要である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Precise diagnosis of hydatidiform mole is important because some extent of molar patients would be developing into gestational trophoblastic neoplasia. The aim of this study was the establishment of molecular pathological diagnosis with p57KIP2 immunohistochemistry and Chromogenic in situ Hybridization (CISH). The immune staining of p57KIP2 determined androgenetic hydatidiform moles. Otherwise, CISH discriminated the triploidy of partial hydatidiform moles from biparental diploid abortion.

Seventy-five percent of cases demonstrated the appropriated CISH signals, although twenty-five percent of cases did not indicate the signals. To get the stable signal, the methods of the fixation of the villous sample could be critical. Further investigation would be necessary.

研究分野：婦人科学

キーワード：絨毛性疾患 胚細胞性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

社会全体の妊娠年齢の高齢化に伴い、拳児希望のある高齢胞状奇胎(疑い)患者も増加している。超音波診断技術の進歩に伴い、流産がより早期に判定されるケースが増えたこともあり、胞状奇胎と胞状奇胎でない流産の病理学的鑑別が困難な症例が増加している。特に、父2母1のハプロイドで構成(3倍体)される部分胞状奇胎と両親由来2倍体である流産の鑑別が難しい症例が増加している。

胞状奇胎後には、続発症(侵入奇胎)が一定頻度で発症するため、胞状奇胎手術後には、一定の避妊期間が必要である。高齢不妊症患者にとっては、胞状奇胎手術後の避妊期間は、年齢に伴う妊孕能低下を考えると、短い方が好ましい。「胞状奇胎疑い」が遺伝学的には両親由来2倍体であることが確実に診断されれば、通常の流産と同様に早期に妊娠許可することができ、拳児希望患者にはメリットとなる可能性がある。

2011年7月に改訂された絨毛性疾患取扱い規約第3版では、「胞状奇胎の定義は病理学的診断に基づく」と変更された。胞状奇胎の病理診断の重要性が上昇することに伴い、病理診断医間の胞状奇胎診断の差が、現在以上に問題となってくる可能性がある。我々の研究室ではp57KIP2免疫染色が、続発症のハイリスクである雄核発生奇胎(全胞状奇胎)の抽出に有用であることを確立してきた。

しかし、胞状奇胎の約半数を占める部分胞状奇胎(父2母1の三倍体)を病理標本から確実に鑑別する方法はない。未染標本から、絨毛細胞を顕微鏡補助下に選択的に回収(マイクロダイセクション法)し、ゲノムDNAを抽出し、新鮮検体で行っている場合と同じようにDNA多型を用いた遺伝学的手法を適用することは可能であるが、日常臨床で実施可能な施設は国内ではほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、日常診療で用いる病理標本をもとに、これまでに確立されたp57KIP2免疫染色法に加えて、セントロメア近傍のプロープを用いたChromogenic in situ Hybridization(CISH法)による倍数性診断を適用し、合わせて、絨毛の分子病型診断法

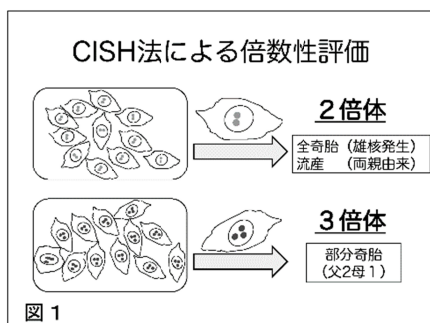


図1

の確立を目的とする(図1, 図2, 表1)。

全胞状奇胎、部分胞状奇胎、流産を正確に鑑別し、拳児希望のある流産患者に適切な避妊期間を提示することを目指す。

表1 CISH法・p57KIP2免疫染色による鑑別

	全奇胎	部分奇胎	流産
CISH法シグナル	2個	3個	2個
p57KIP2免疫染色	陰性	陽性	陽性
DNA多型解析	雄核発生	父2母1三倍体	父1母1二倍体

3. 研究の方法

(1) 症例の抽出

これまでに、われわれの施設で、Short tandem repeat (STR) 多型解析によるDNA診断により、遺伝学的診断がなされた、胞状奇胎・流産症例から80症例を抽出した。雄核発生奇胎40例、父2母1の3倍体20例、両親由来2倍体20例を選んだ。2011年から2015年の5年間の症例を対象とした。

(2) CISH法の施行

未染標本に対して、脱パラフィン処理後、ZytoVision GmbH社ZytoDotプロープ(ZytoDot CEN7 Probe, ZytoDot CEN17 Probe, ZytoDot CENX Probe, ZytoDot CENY Probe)の4プロープを用いて、CISH法を施行した。方法は、ZytoVision GmbH社Kit記載のプロトコール通りに施行した。

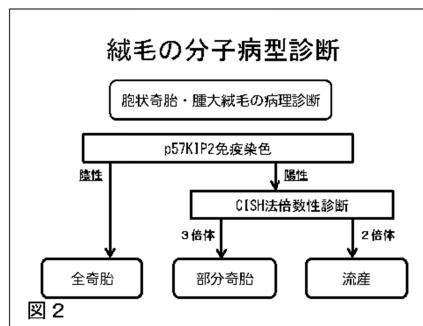


図2

(3) パラフィンブロックの保存期間・保存条件の検討

ZytoDot CEN17 Probeを用いて、2011、2012、2013、2014、2015年に作成されたパラフィンブロックから作成した未染標本に

対して CISH 法を施行した。

#### (4) 免疫染色 (p57KIP2 免疫染色)

抗体は、Lab vision 社の Anti-p57 Kip2, Mouse mono (MS-1062-R7) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 2014 年症例を用いた、CISH 法の結果

診断から 3 ヶ月以内の症例 8 例に対して ZytoDot CEN17 Probe で 17 番染色体の倍数性評価は可能であった。理論的に想定される通り、全奇胎 (雄核発生奇胎) と流産 (両親由来 2 倍体) 症例では、CISH シグナルは、最大 2 個であり、2 倍体と判定可能であった。一方父 2 母 1 の 3 倍体である部分奇胎では、評価可能な細胞の 10% 以上で CISH シグナルが 3 個認められた。

#### (2) パラフィンブロックの保存期間等の条件について

2011 年症例 (4 年前の症例) であっても、CISH シグナルの検出は、可能であったが、一部の症例は、ごく最近の症例であっても、全くシグナルを得ることができなかった。シグナルを得ることができなかった症例について、電子カルテの診療情報から、検体の提出タイミングなどについて、確認を行ったところ、ホルマリン固定後長時間経過していた症例が、一部に含まれていた (金曜日や連休前日などに検体提出が行われた症例)。また、一部の症例では、ホルマリン固定までに長時間経過したものが含まれていた (冷蔵保存後)。原因が特別指摘できないがシグナルを得ることのできなかった症例の半数を占めていた。

#### (3) CISH 法結果のまとめ

ZytoDot CEN17 Probe で検討した 40 例の結果、30 例で CISH シグナルを得ることができた。28 例では、想定したシグナル数を得ることができた (全奇胎・流産では 2、部分奇胎では 3) が、2 例の部分奇胎例では、シグナル数の評価が困難であった。10 例ではシグナルを得ることができなかった。

シグナルの得られなかった 10 例については、再評価を行っている。また、ZytoDot CEN7 プローブを用いて、系統的に評価を行っている。

#### (4) p57KIP2 免疫染色結果

80 症例に対して、p57KIP2 免疫染色を行った。全症例で、陽性コントロールである、中間型栄養膜細胞は、全例で陽性となった。40 例の雄核発生奇胎では、全例細胞性栄養

膜細胞は染色陰性であった。また 20 例の部分奇胎 (父 2 母 1 の 3 倍体) および 20 例の流産 (両親由来 2 倍体) 症例では、全例細胞性栄養膜細胞陽性であり、DNA 診断の結果と矛盾しなかった。

#### (5) まとめ

本研究の着想は、日常診療で用いる病理組織標本、パラフィンブロック検体を用いて、新鮮検体で行う DNA 診断に匹敵する絨毛の分子病型診断法を確立する点にあった (図 2)。p57KIP2 免疫染色法は最近 5 年間の検討症例全例で、評価可能であった。一方、CISH 法では、およそ 25% の症例で、判定できなかった。

現在、ZytoDot CEN7 プローブでの評価を行っている。これまでのデータからは、手術検体の処理法 (ホルマリン固定までの時間・固定時間) により、CISH シグナルが得られるか、大きく関わっている可能性が示唆された。

乳癌の臨床で行われている HER2 遺伝子の増幅の判定を FISH 法や CISH 法で行う際には、検体の固定バッファー、固定までの時間、固定時間などに対する推奨時間が決まっている。FISH 法や CISH 法による判定を予定している場合には、そのことを踏まえた、検体処理が求められている。今回は、後方視的検討であり、検体処理については、その点の考慮がされていない。そのため、シグナルが得られなかった症例の割合が高かった可能性がある。CISH シグナルを安定して獲得するには、検体処理法の標準化が、重要である可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kaku H, Usui H, Qu J, and Shozu M Mature cystic teratomas arise from meiotic oocytes, but not from pre-meiotic oogonia. *Genes Chromosomes Cancer* 査読あり **55**: 2016, 355-364, DOI: 10.1002/gcc.22339

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

加来 博志 ( KAKU, Hiroshi )  
千葉大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：40456059

### (2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：