
参考文献

1. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 235: 177-182, 1987
2. Kurosumi M: Recent Trends of HER-2 Testing and Trastuzumab Therapy for Breast Cancer. Breast Cancer 16: 284-287, 2009
3. Wolff AC, Hammond EH, Schwartz JN, et al.: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol 25:118-145, 2007.
4. Nitta H, Hauss-Weqrzyniak B, Lehrkamp M, et al: Development of automated brightfield double in situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN 17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence in situ hybridization (FISH) . Diagn Pathol 3: 41, 2008
5. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al: Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. J Clin Oncol 31: 3997-4013, 2013



乳癌における HER2 DISH法の 有用性と判定のコツ

執筆**黒住 昌史先生**

埼玉県立がんセンター病理診断科・部長

はじめに

遺伝子の発現状況を目で見えて判定する方法であるISH (*in situ* hybridization)法は基礎研究の分野ばかりではなく、実地臨床においても行われるようになった。ISH法としては、蛍光物質を使用するdual colorのFISH (fluorescence ISH)法が主流であったが、最近になって光学顕微鏡でも検索できるDISH (dual color ISH)法が開発され、特にHER2 (human epidermal growth factor receptor type 2) 遺伝子の診断法として実用化されている。本冊子では新しい遺伝子診断法であるDISH法の有用性と判定のコツについて解説したい。

1. HER2 DISH法の開発の背景

HER2 遺伝子の増幅のある乳癌は予後不良であることが明らかにされ、HER2 は乳癌の予後因子として注目されるようになった。この HER2 の働きを阻害する薬剤であるハーセプチン (trastuzumab) が開発され、多くの臨床研究によって HER2 タンパクの過剰発現もしくは HER2 遺伝子の増幅のある乳癌に対して有効であることが明らかにされた。また、治療対象の選択のために、HER2 タンパクは免疫染色、遺伝子増幅は ISH 法で判定されるようになった。このような趨勢の中で、通常の光学顕微鏡で簡便に診断できる DISH 法が新たに開発され、世界的に急速に普及している。

2. HER2 DISH法の原理

HER2 DISH 法は HER2 遺伝子と 17 番染色体セントロメア (Chr17) を 2 種類の色素によって可視化する dual color の ISH 法である。原理は HER2 遺伝子と Chr17 に選択的に結合するプローブを異なるハプテンで標識し、HER2 遺伝子と Chr17 に対して同時にハイブリダイゼーションし、HER2 標識ハプテンを SISH 法で、Chr17 標識ハプテンを CISH 法で可視化する方法である。

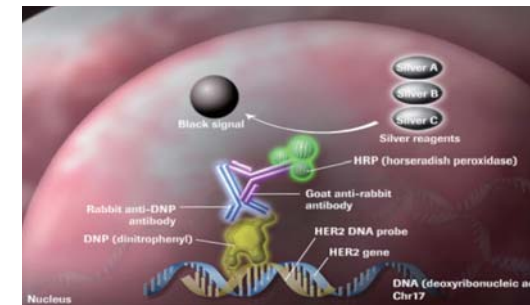
3. HER2 DISH法での検出過程

HER2 DISH 法での検出過程は以下の方法で行われる。

最初に DNP で標識した HER2 DNA プローブに抗 DNP ウサギモノクローナル抗体を抗原抗体反応で結合させる。次に抗 DNP ウサギモノクローナル抗体に対して HRP で標識した抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体を反応させる。その結果、組織切片上には、[DNP で標識した HER2 DNA プローブ]—[抗 DNP ウサギモノクローナル抗体]—[HRP 標識抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体] の結合物が形成される。この結合物に 3 種類 (A、B、C) の発色試薬を加えると酵素反応によって HER2 遺伝子が銀粒子で黒色に染色される【図 1】。

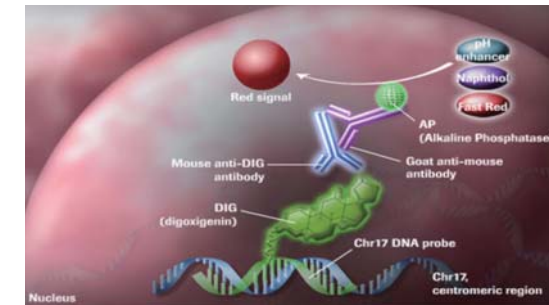
次の段階では、DIG で標識した Chr17 DNA プローブに抗 DIG マウスモノクローナル抗体を抗原抗体反応で結合させ、次に抗 DIG マウスモノクローナル抗体に対して alkaline phosphatase (AP) で標識した抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体を反応させる。その結果、組織切片上には、[DIG で標識した Chr17 DNA プローブ]—[抗 DIG マウスモノクローナル抗体]—[AP 標識抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体] の結合物が形成される。この結合物に pH エンハンサー試薬、naphthol 試薬、fast red 試薬を加えると酵素反応により、Chr17 が赤色に染色される【図 2】。

脱パラフィンからシグナル検出までの全過程は 13～14 時間程度で自動的に行うことができる。



▶【図1】 DISH法でのHER2遺伝子描出の原理

DNPで標識したHER2 DNAプローブ、抗DNP ウサギモノクローナル抗体、HRP標識抗ウサギIgGヤギポリクローナル抗体を使ってHER2遺伝子を銀粒子で描出する。



▶【図2】 DISH法でのChr17描出の原理

DIGで標識したChr17 DNAプローブ、抗DIGマウスモノクローナル抗体、AP標識抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体を用いて赤色に描出する。

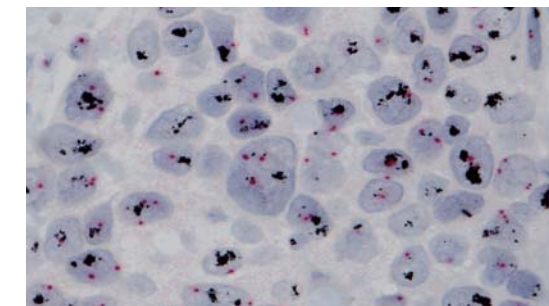
4. HER2 遺伝子診断の判定基準

HER2 DISH 法では HER2 遺伝子は黒色のシグナル、Chr17 は赤色のシグナルとして描出されてくる【図 3】。

浸潤巣の 20 個の癌細胞の核内に見える HER2 の黒色のシグナル総数と Chr17 の赤色のシグナル総数をそれぞれカウントしてそれらの比を計算して遺伝子増幅の有無を判定する。

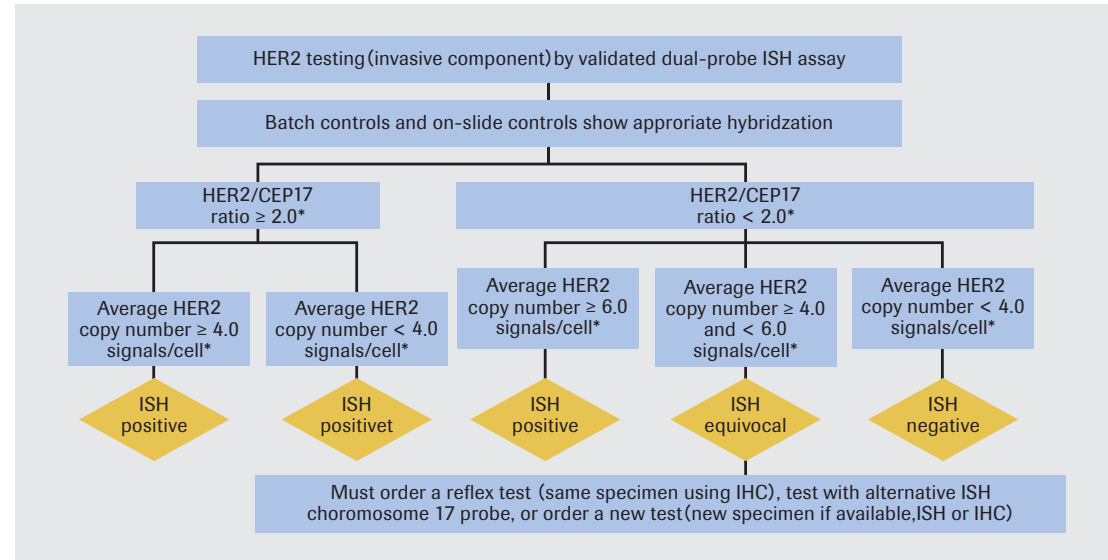
2013 年 10 月に ASCO/CAP から発表された乳癌における新たな判定基準では、最初の計測でシグナル比が 2.0 以上の場合には HER2 シグナル数が 4.0 以上でも 4.0 未満でも「陽性 positive」とし、シグナル比が 2.0 未満の場合には HER2 シグナル数が 6.0 以上は「陽性 positive」、4.0～6.0 は「境界域 equivocal」、4.0 未満は「陰性 negative」と判定する。

また、「境界域 equivocal」の場合にはリフレクステスト (同じ検体で IHC 法による再検査) もしくは 17 番染色体プローブを用いた別の ISH 検査、可能であれば新しい検体による新規検査 (IHC 法または ISH 法) のいずれかにより追加 HER2 検査を実施する【図 4】。



▶【図3】 HER2のDISH像

HER2遺伝子が黒色のシグナルクラスターとして、Chr17が赤色のシグナルで描出されている。



▶【図4】 HER2 ISHの判定基準(ASCO/CAP, 2013)
 シグナル比が2.0以上の場合は陽性とする。2.0未満の場合はシグナル数が6.0以上は陽性、4.0-6.0は境界域、4.0未満は陰性と判定する。

5. 判定の基本ルール

1) 計測の対象から除外する場合【図5】

- ①核が重なっている。
- ②シグナルが全く認められない。
- ③2色のシグナルが認められない。
- ④シグナルが核からはずれて核外にある場合には対象から除外する。

2) シグナルがきちんと分離して認められる場合【図6】

黒色 (HER2) のシグナルと赤色 (Chr17) のシグナルを 20 個の核について単純に数える。

3) シグナルが近接あるいは重なっている場合【図7】

- ①同色のシグナルがシグナルの直径と同じ距離または直径よりも短い距離に位置する場合には、1 個のシグナルとして数える。
- ②2色のシグナルが接近している場合には、対物 60x のレンズで分離を確認する。
- ③黒色のシグナルのクラスターに重なって赤色のシグナルを認める場合には、対物 60x のレンズで赤色のシグナルが正しい反応であることを確認する。

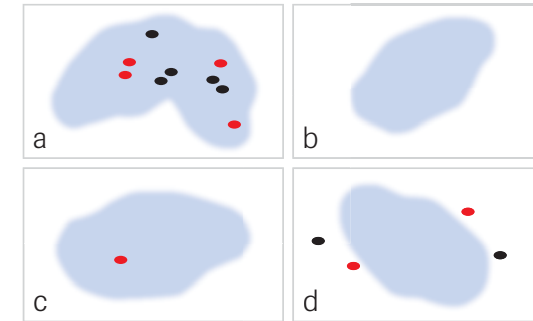
4) シグナルがクラスターを形成している場合【図8】

複数のシグナルの集合からなるシグナルクラスターはシグナル 1 個の大きさを基準にして 6 個、12 個などとおおよその数の評価を行う。また、計測結果にクラスターを認めたことを記録する。

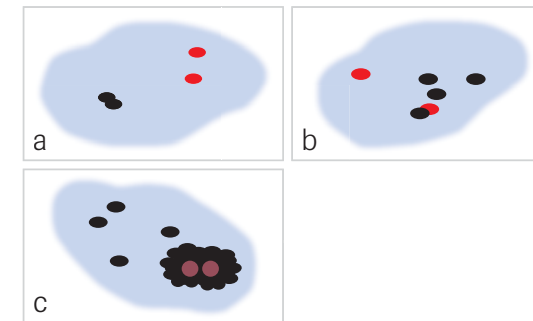
5) 黒色のダストや赤色の不鮮明なドットを認めた場合

【図9】

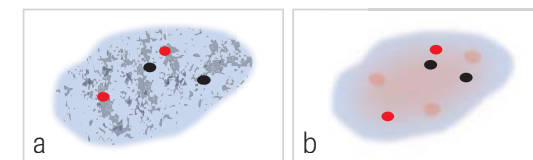
- ①黒色のダスト状のバックグラウンドを認めた場合には、明らかにシグナルと確認できたもののみを数える。
- ②シグナル様の不鮮明な赤色のドットを認めた場合には、染色強度の違いで真のシグナルと鑑別する。



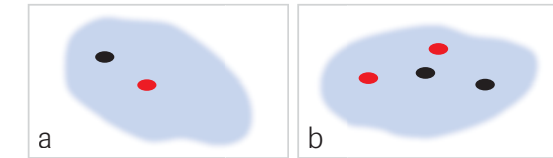
▶【図5】 DISH法での計測除外例
 a. 核が重なっている。
 b. シグナルが認められない。
 c. 2色のシグナルが認められない。
 d. シグナルが核からはずれて核外にある場合には計測しない。



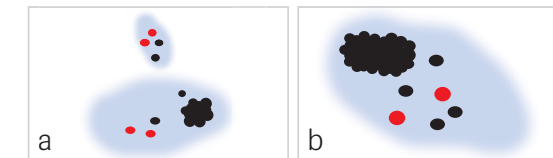
▶【図7】 シグナルが近接している場合
 a. 黒色のシグナルがシグナルの直径よりも短い距離にあるので1個に数える。
 b. 対物60xのレンズで赤色と黒色のシグナルが分離しているのを確認したので、黒色のシグナルは4個に、赤色のシグナルは2個に数える。
 c. 対物60xのレンズで黒色のシグナルのクラスターに重なっている赤色のシグナルが正しいシグナルであることを確認できたので、赤色のシグナルは2個に数える。



▶【図9】 黒色のダストや赤色の不鮮明なドットを認めた場合
 a. 黒色のダスト状のバックグラウンドを認めた場合には、明らかにシグナルと確認できたもののみを数える。
 b. シグナル様の不鮮明な赤色のドットを認めた場合には、染色強度の違いで真のシグナルとの鑑別を行う。



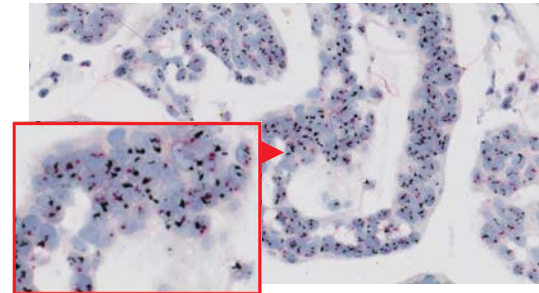
▶【図6】 DISHシグナルがきちんと分離して認められる場合
 a. 黒色 (HER2) のシグナルを1個に、赤色 (Chr17) のシグナルを1個に数える。
 b. 黒色 (HER2) のシグナルを2個に、赤色のシグナルを2個に数える。



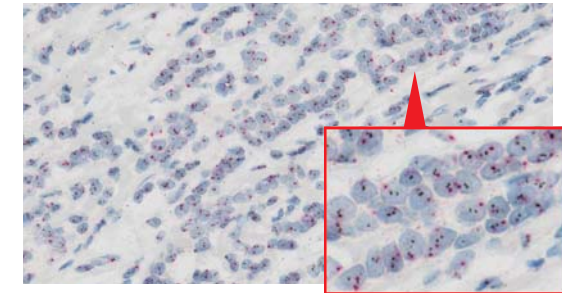
▶【図8】 シグナルがクラスターを形成している場合
 a. 黒色のシグナルは小さいクラスター1個でシグナル6個とし、単独のシグナルが2個あるので、合わせて8個に数える。
 b. 黒色のシグナルは大きいクラスター1個でシグナル12個とし、単独のシグナルが4個あるので、合わせて16個に数える。

6. 判定方法と判定のコツ

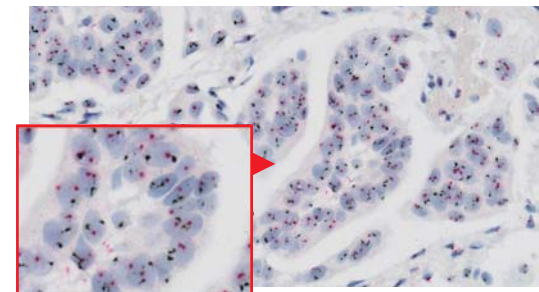
- 1) シグナルの観察には光学顕微鏡を使用する。
- 2) HE 染色標本で浸潤癌の分布と乳管内癌の分布状況を確認する。複雑な分布をしている場合には、ガラスにマジックでマークすると良い。
- 3) HER2 の免疫染色を行っている場合には、最も強く染色されている部分を探し、マジックでマークすると良い。
- 4) 20 倍の対物レンズを用いて 200 倍でシグナルが最も強い部分を探す。
- 5) 40 倍の対物レンズを用いて 400 倍でポイントとなる領域を詳しく観察する。
- 6) 内部コントロールとして正常細胞のシグナル状態を観察する。正常の乳管上皮細胞や間質の線維芽細胞では、通常は HER2 の黒色のシグナルが 2 個と Chr17 の赤色のシグナル 2 個が観察される。内部コントロールが認められない場合には、染色がうまく行っていないことになるので、再染色を行う。
- 7) シグナルの計測には、油浸を使用する必要はなく、40 倍の対物レンズを用いて 400 倍の視野でカウントする。
- 8) 黒色のシグナルがクラスターを形成している場合には、「陽性」であることは確実なので、クラスターの大きさに従ってカウントする【図 10】。
臨床との話し合いができていれば、カウントをしないで「陽性：2.0 以上」とレポートすることも可能である。
- 9) 黒色のシグナルがクラスターを形成している場合には、1 つずつのカウントは難しいので、例えば小さなクラスターを 6 個、大きなクラスターを 12 個と推定評価する。
- 10) 黒色のシグナルが概ね 1 個から 3 個以下の場合には「陰性」である可能性が高い。赤色のシグナルを見て 1 個の細胞に 1 個しかない monosomy でない限り、「陰性」の判定になる【図 11】。
- 11) 簡単な観察で「陽性」か「陰性」かの判別がつかない場合には、20 個の核について黒色のシグナル数と赤色のシグナル数を地道にカウントする必要がある【図 12】。
- 12) 20 個の核のカウントで境界領域になった場合には、前述のリフレックステストを実施する。
- 13) 赤色の Chr17 の選び方は実際には難しく、赤色のシグナルが 1 個の細胞が大部分を占めている場合には monosomy、3 個以上の細胞が大部分を占めている場合には polysomy かどうかの判断が必要になる。
- 14) monosomy もしくは polysomy の場合には、あえて赤色のシグナルが 2 個の核を探す必要はなく、決めた領域の核についてシグナル数をカウントする【図 13】【図 14】。
- 15) polysomy の場合にはシグナル比が 2.0 未満でも HER2 のシグナル数が判定のキーになるので、黒色のシグナル数のカウントに集中すれば良い。
- 16) 赤色のシグナルを 2 個以上持つ細胞が大半を占めているが、明瞭でないドットが混在している場合には、鮮明なシグナルを 2 個以上認める核を見つけ出してカウントすると、アーチファクトで多数に見える核を除くことができる。
- 17) 標本の広い範囲で黒色のシグナルを探し出してカウントすることは好ましくないので、決めた領域における 20 個の核について計測する。
- 18) 時にダストと思われる黒色の粒子が核外から核内にかけてみられることがあるが、このような標本では計測しないで、再染色を行う。
- 19) シグナルの発現が異なる核が同一組織上に混在しているヘテロジェネイティの場合には、シグナルが多く認められる核を選んでカウントする。薄切された切片であるためにシグナルが少なく見えている細胞を除くことができる。



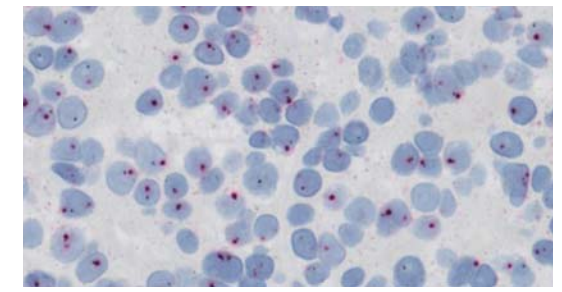
▶【図10】 DISH像
明らかな黒色シグナルのクラスター形成が見られ、瞬時に増幅のあることが分かる。核が重なっている所は計測の対象外になる。



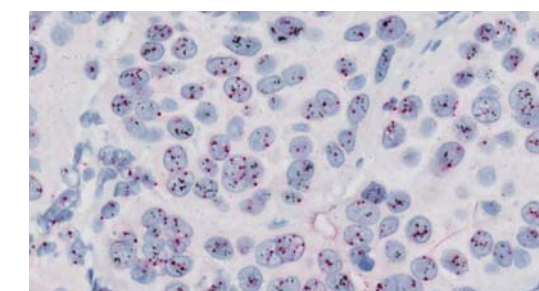
▶【図11】 DISH像
黒色のHER2シグナルは明らかに少なく、瞬時に増幅のないことが分かる。所々にシグナルがない核や1色しかない核があるが、計測の対象外になる。



▶【図12】 DISH像
黒色のHER2シグナルの数はそれほど多くはなく、増幅の有無はきちんと数えないと判断できない。間質にダスト様の物質が少量見られるが、判定には影響しない。



▶【図13】 monosomy像
多くの細胞で、赤色のシグナルが1個である。



▶【図14】 polysomy像
多くの細胞で、赤色のシグナルが3個以上認められる。黒色のシグナルが6個以上であれば、比に関わらず増幅である。周囲に針状結晶が認められるが、判定に影響はない。

おわりに

DISH法はHER2遺伝子増幅の検査法としては画期的なものであり、すでに本邦においても保険収載されている。本冊子では、この方法の原理と判定方法のコツについて紹介させて頂いたが、実際の判定に少しでもお役にたてば幸甚である。