

【第75回生涯教育講座】

染色体解析技術の歴史と展開

—ヒト染色体数決定から50年—

か かず なお き 樹 し わ く くに のり
 嘉 数 直 樹 塩 飽 邦 憲

キーワード：染色体解析，分染法，FISH法，SKY法，SCAN法

要 旨

2006年は、ヒト染色体数が決定されてから50周年の記念すべき年にあたる。この50年の間にさまざまな染色体解析技術が開発され、医学はもとより生命科学全体の発展に大きく寄与した。まず、分染法の開発は、腫瘍や先天性疾患の原因解明に決定的な役割を果たした。現在は、これらの疾患の臨床上の診断に必要な検査技術としての地位を確立している。さらに、FISH法の登場によって、染色体レベルでの異常を遺伝子レベルの異常に結びつけることが可能になった。また、間期核へのFISH法の導入によって、染色体解析の適用範囲は一挙に拡大し、特に分裂像が得られ難い固形腫瘍の解析に偉力を発揮している。最近では、蛍光シグナルのマルチカラー化に対応したFISH技術としてSKY法、SCAN法が相次いで開発され、より高精度に染色体構造異常を解析できるようになった。染色体解析技術は、今日においてもさらなる進展を遂げている。

1. はじめに

ヒト染色体研究の歴史は、1956年に Tjio と Levan がヒト染色体の数を46本と決定したことを契機に本格的に始まったと言ってよいだろう¹⁾。本年は、この年から50周年の記念すべき年にあたる。この50年の間に、次々と染色体解析技術が開発され、染色体研究は長足の進歩を遂げた（図1）。まず分染（バンディング）法が確立されて

からは、さまざまな腫瘍や先天性疾患において実におびただしい数の染色体異常が見つかった。その多年にわたる膨大な蓄積の中から、疾患や病型に特異的な異常が次第に知られるようになり、次いで、このような異常に対して分子生物学的手法による探索のメスが入られ、これらの原因遺伝子が続々と発見された。

1980年代に fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法が開発されてからは、染色体解析に分子生物学的手法が次々と取り入れられていき、特定の遺伝子に絞った異常の解析ができるようになった。当初の FISH 法は1~2色程度でしかシ

Kuninori SHIWAKU et al.

島根大学医学部環境保健医学講座環境予防医学
 連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

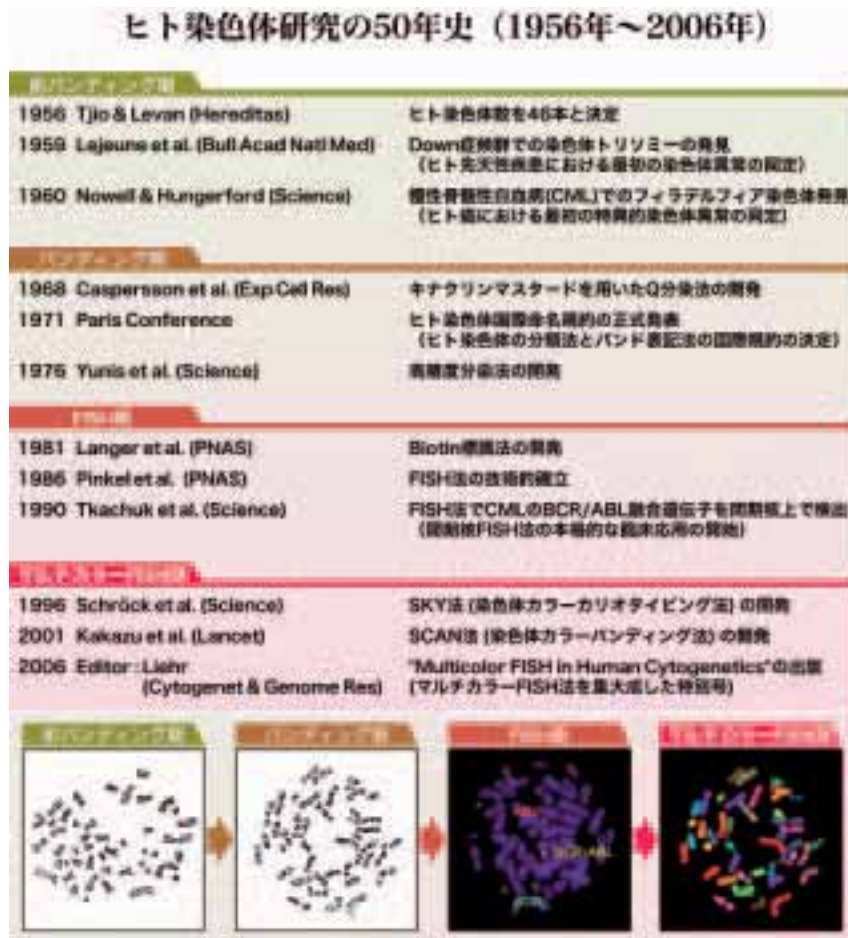


図1. ヒト染色体研究の50年史

グナルを検出できなかったため、一回の解析で用いられるプローブは数種類程度とごく限られていた。しかし、1990年代後半から FISH 法のマルチカラー化が飛躍的に進み、今や多数のプローブを同時に用いて、30色近くの色調でシグナルを識別できるようになった。具体的には、染色体マルチカラーカリオタイプング技術として spectral karyotyping (SKY) 法が開発され、複雑な染色体構造異常が多数存在しても 1 回の解析だけで包括的に同定できるようになった²⁾。今日では、SKY 法は特に臨床において有用な染色体診断技術として確固たる地位を築いている。しかし、この手法は染色体ペインティングプローブを用いている性質上、染色体単位でしか異常の由来を同定

できないという限界があった。この限界を克服するために、われわれは、新しい染色体マルチカラーバンディング法を開発し、spectral color banding (SCAN) 法と命名した³⁾。

本稿では、染色体解析技術についてその開発の歴史的展開に沿って、分染法、FISH 法、SKY 法、および SCAN 法の順に概説する。あわせて、これらの技術が実際にどのように染色体異常の解析へ応用されているか、腫瘍の例に絞って紹介する。

2. 分染法

染色体分染法は、キナクリンマスタードなどの蛍光色素やギムザ液で染色することにより、染色

体の長軸に沿って蛍光の強弱や白黒濃淡の横縞(バンド)を描出する技術である(前者はQ分染法, 後者はG分染法という)。このバンドパターンは染色体の種類に固有であり, それを肉眼で識別することにより, 個々の染色体を24種類(1番から22番までの常染色体とX, Yの性染色体)に分類し, また異常の有無を判定している(このような解析作業のことをカリオタイピングと呼ぶ)。

腫瘍や先天性疾患で認められる染色体異常を診断する方法として, 染色体分染法は今日でも基本的な技術である。分染法にはさまざまな方法があるが, 臨床診断で用いられるのは主にG分染法である。この方法は, バンド間の白黒濃淡のコントラストが明瞭で, バンド解像度も高いため, 分染法のなかで最も広く普及しているのである。

分染法は, 分裂像さえ得られれば, すべての染色体が解析対象となり, また, さまざまな異常に対応できるため, 染色体全体にわたって異常の有無を判定する場合に適している。また, 構造異常における切断点の決定も, バンド表記と対応して位置づけることができるため, 特に有用である。さらに, この方法は, コストが低く, FISH法のようにプローブを必要としないという点でも優れている。しかし, 1)分析細胞数が通常20個程度に限られる, 2)分裂像が得られない場合は解析できない, 3)この方法による染色体異常の解析には長年の経験と高度の熟練を要するなど, 欠点も少なくない。3)については, 熟練者でも異常を見落として正常と判定したり, 染色体異常が複雑すぎて完全には同定できなかったりすることが少なからずあった。その理由は, G分染法は白黒濃淡だけのバンドパターンを肉眼で識別して解析するため, 必然的に精度的な限界が生じるからである。これらの欠点や制限は, 後述するFISH法

によって克服され, 染色体解析が高い精度で定量性をもって行えるようになった。

3. FISH 法

1) 原理

FISH法とは, クローン化したDNA(ゲノム, 遺伝子, cDNAやオリゴヌクレオチド)を標識したプローブとスライドガラス上に固定した染色体DNAとをそれぞれ変性して1本鎖にしてから相補的に結合させ, その分子雑種の特異的部位を蛍光色素によるシグナルで検出する技術である(図2)。染色体レベルでの異常を遺伝子レベルの異常に結びつけることができる方法であり, 染色体解析に大きな進展をもたらした。

プローブの種類が増加するに伴い, 腫瘍や先天性疾患で認められるあらゆる染色体異常(転座, 欠失など)に対応できるようになった。さらに, シグナルの検出感度においても向上が図られ, より高感度な解析が可能になっている。FISH法は分染法とは異なり, 間期核もターゲットとしうるため, 分裂像が得られなくても解析でき, その適用範囲を大幅に拡大させた。特に分裂像が得られ難い固形腫瘍の解析に偉力を発揮している。また, 間期核FISH法は, 解析細胞数も数100個か

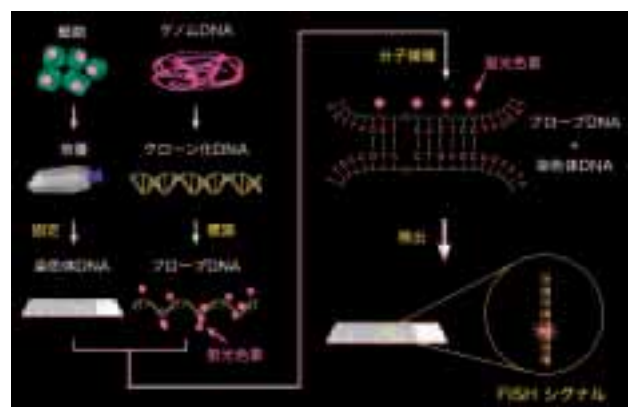


図2. FISH法の原理

ら1000個程度と、分染法に比べて格段に多く、定量的な解析が可能となる。現在では、臨床の現場で FISH 法を利用する機会は着実に増えている⁴⁾。

2) 臨床応用

(1) 病型特異的な転座（融合遺伝子）の検出とモニタリング

慢性骨髄性白血病（CML）における t(9;22)(q34;q11) のように、白血病には病型に特異的な転座が数多く知られている。このような転座とともに融合遺伝子が形成され、白血病の原因となっている（CML の場合は BCR-ABL 融合遺伝子）。したがって、融合遺伝子を FISH 法で検出することにより、病型特異的な転座を有する白血病細胞であるかないかを判別できる（図3）。さらに、間期核 FISH 法により融合陽性細胞を定量的にモニタリングすれば、白血病に対する治療効果の判定にも利用できる。間期核 FISH 法は分染法のような熟練を必要とせず簡便に判定でき、結果がより短期間で得られるというメリットがある。しかし、G分染法と異なり1回の解析で検出できる異常に限られており、使用プローブで検出できる特定の転座以外に異常が併存していても、それを把握することができないという欠点がある。

(2) コピー数異常の検出

腫瘍の病型や悪性度に関連して増幅したり欠失したりする遺伝子が数多く発見された。間期核 FISH 法はこうしたコピー数の絶対的変化を高感度に検出できる技術である。その応用例を示す。乳癌では既に多数の増幅遺伝子が知られている。その中でも、Her-2 遺伝子は、比較的高頻度に増幅が報告されている。この Her-2 遺伝子プローブで乳癌細胞株（MDA-MB-453）の間期核を対象として FISH 解析を行うと、コピー数の著明な

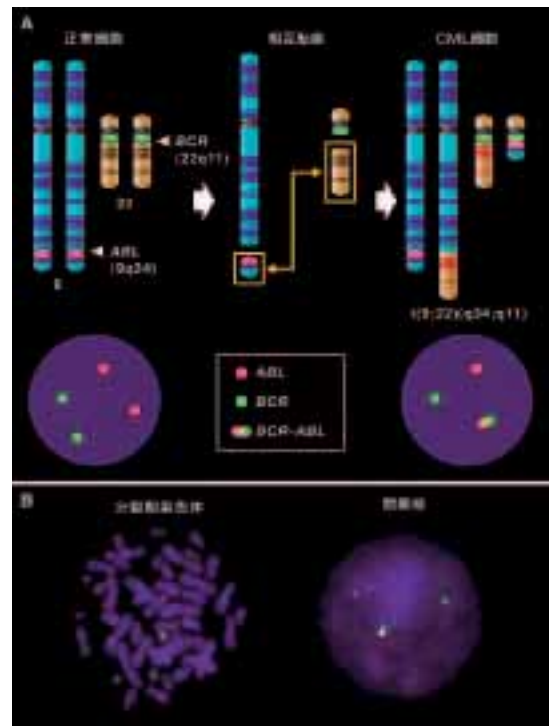


図3. FISH 法の臨床応用 (1)

CML における BCR-ABL 融合遺伝子の検出。

A：模式図のように、BCR 遺伝子プローブを緑、ABL 遺伝子プローブを赤の蛍光色素でそれぞれ標識し FISH 解析を行うと、正常細胞では赤と緑のシグナルが2コピーずつ検出される。一方、CML 細胞では、染色体上でも間期核上でも BCR-ABL 融合遺伝子が赤と緑の融合シグナルとして検出される。

B：実際の CML 症例での FISH 解析例も示す。分裂期染色体、間期核とも融合シグナルを認める。

増加を検出することができる（図4）。Her-2 遺伝子の増幅が検出された乳癌は、分子標的治療薬ハーセプチンの適応となることが保険上も認可されている。FISH 法は、治療方針の決定にも大いに有効である。

4. SKY 法

1) 原理と応用

SKY 法は、24種類のヒト染色体すべてに対応したペインティングプローブ（5色の蛍光色素を

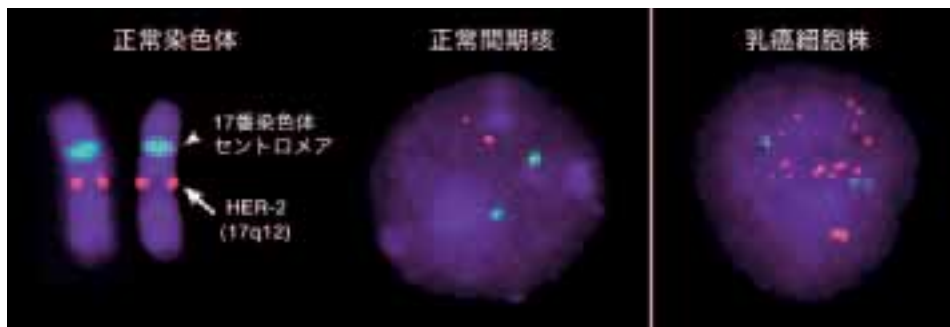


図4. FISH法の臨床応用 (2)

乳癌での Her-2 遺伝子増幅の検出。正常染色体上では、Her-2 遺伝子プローブ (赤のシグナル) は17番染色体 q12 バンドにマッピングされる (矢印)。矢頭の緑のシグナルは、17番染色体であることを示す同染色体セントロメアに特異的なシグナル。正常間期核では赤のシグナルも緑のシグナルも2コピーずつ認められるが、乳癌細胞株 (MDA-MB-453) の間期核では、多数の Her-2 のシグナル (赤) が観察され、同遺伝子が高度に増幅していることがわかる。

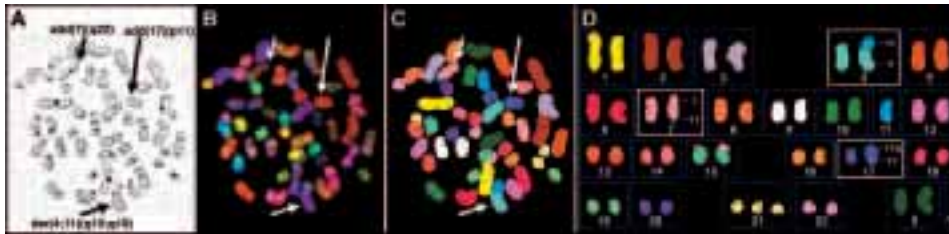


図5. SKY法による複雑型染色体異常の解析

白血病症例における染色体異常の同定。

A: G分染像。由来不明あるいは確定できない染色体異常が3つ認められている (矢印)。add(7)(q22), add(17)(p11)とはそれぞれ、7番染色体 q22 バンド、17番染色体 p11 バンドに由来が不明な染色体断片が転座していることを示す核型表記である。der(4;11)(q10;q10)とは、4番染色体長腕と11番染色体長腕が動原体領域 (染色体の短腕と長腕の間のくびれの部分) で結合していることを示す。この異常は確定できていなかった。

B: SKY 解析像。

C: Bの疑似カラー像。

D: 核型解析像。SKY 法による1回の解析だけで、白枠内に示されるように3つの構造異常の染色体構成が、色調の変化として包括的に同定あるいは確定できた。

組み合わせた24通りの色調で検出できるよう、染色体ごとにそれぞれ異なった標識がなされている)のカクテルを用いた FISH 解析で、染色体をその種別ごとに固有の色調で識別できる技術である。SKY 法では、染色体から発するシグナルは、それぞれの染色体ペインティングプローブにおける標識蛍光色素の組み合わせに固有のスペクトルパターンを有している。逆に、スペクトル解析で

この固有のパターンを認識することで、どの染色体由来かを自動的に判定させることが可能となる。この原理に基づいて、G分染法では解析困難な由来不明の染色体異常が同定できる^{5,6)} (図5)。

2) 利点と限界

腫瘍細胞においては、染色体異常は複雑でしかも複数が共存することが多く、G分染法で完全に同定するのは困難なことがしばしばある。このよ

うな場合でも SKY 法で解析すれば、複数の異常を包括的に同定し、複雑な異常もその染色体構成を一挙に明らかにすることは容易となる。現在、G分染法を補完する有力な染色体診断法として臨床検査の場でも急速に普及している。

SKY 法にも、染色体ペインティングプローブを用いている性質上、以下の3点にまとめられる限界がある。1)染色体単位でしか異常の由来を同定できない。2)染色体内部での構造異常(重複など)は色調の変化としてとらえることができない。3)複雑な構造異常における転座切断点を決定することができない。

5. SCAN 法

われわれは、上述した SKY 法の限界を克服しさらに精度を上げる目的で、染色体全長をバンド状に複数の色調で検出する方法の開発に着手した。その成果として、2001年に新しい染色体カラーバンディング法として SCAN 法を開発した³⁾。この方法は、Gバンドパターンと一致したバンド単位に固有の色調で識別できる点で理想的な方法である。

1) 原理

染色体顕微切断法とは、顕微鏡下でマイクロマニピュレーターを操作して、染色体全体あるいはその一部の領域を物理的に切り出す方法のことである。この技術をG分染後の染色体に適用すると、一つのバンドに一致する微細な染色体領域を切り出すことが可能となる。こうして回収した染色体断片から精製したゲノム DNA をテンプレートにして degenerate oligonucleotide primed (DOP)-PCR を行うと、そのゲノム DNA 全体にわたる増幅と同時に、蛍光色素を取り込ませて標識することができ、その産物は FISH 用のバンド

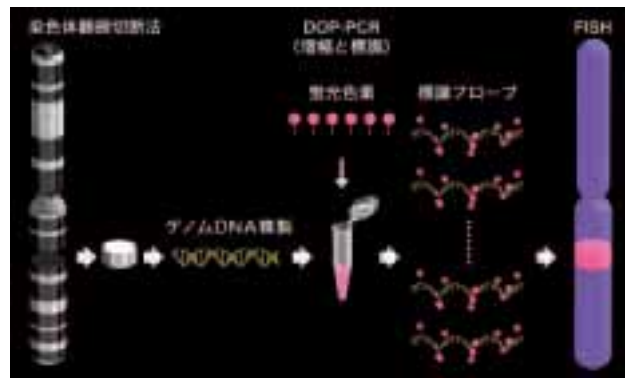


図6. SCAN 法の原理

染色体顕微切断法により、特定のGバンドに一致した染色体領域を物理的に切り出すことが可能である。そこから抽出・精製したゲノム DNA をテンプレートにして DOP-PCR を行うと、増幅と蛍光色素による直接標識を同時に行える。その産物をプローブとして正常染色体に対して FISH 法を行えば、元の切り出したバンドに一致してシグナルが検出される。

特異的プローブとして用いられる(図6)。この方法で、特定の染色体の全長をカバーする各バンド特異的ゲノム DNA を、波長域の異なる5種類の蛍光色素の中から1~2種類を選んで異なる組合せになるよう標識しておく。こうして調製した各バンド特異的プローブをすべて混合し、カクテルとしてヒト染色体に対して分子雑種させ、SKY 法と同じ原理で検出すると、バンド単位に異なる色調で識別できる。3番染色体を例にとると、ほぼ全長をカバーする15のバンド特異的ゲノム DNA からバンディングプローブを調製し SCAN 法を施すと、明瞭なカラー分染像として描出された⁷⁾(図7)。

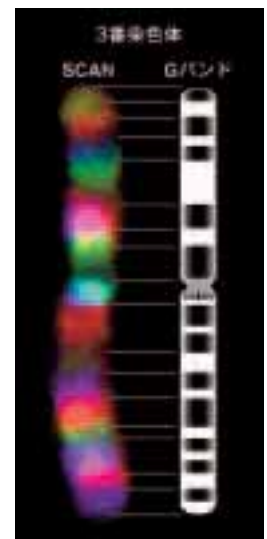


図7. 3番染色体におけるSCAN 法

左: 正常3番染色体のカラー分染像
右: 3番染色体のGバンド像模式図

SKY法と同じような原理で、SCAN法でも各バンドから発するシグナルは、それぞれの蛍光色素の組み合わせに特有のスペクトルパターンを有している。したがって、SKY法のスペクトルパターン認識のアルゴリズムを利用して、対応するバンドを自動的に判定させることが可能となる。

2) 染色体解析への応用

Gバンド上で由来不明の染色体断片が認められた場合、SKY法でどの染色体から派生したか同定することは比較的容易である。しかし、断片が短い場合は、派生した染色体のどのバンドに由来するかまでは決定することが困難であった。また、SKY法は染色体ペインティングプローブを用いているため、同じ染色体内だけでおこる異常は蛍光シグナルの色調の変化としてとらえることができない欠点があった。しかし、こうした異常もSCAN法で解析すれば、カラー分染像のパターンから容易に異常断片の由来をバンド単位で

同定することができる。実際に悪性リンパ腫の症例で、3番染色体短腕内の短い異常挿入断片が同じ染色体のq13バンド由来による重複であると決定することができた⁷⁾(図8)。これまでのG分染法のような肉眼によるバンドパターン認識に比べれば、SCAN法による染色体解析は精度が飛躍的に向上する。しかし、SCAN法は、現時点では従来のG分染法やSKY法に完全に取って代わるものではなく、あくまでもそれらの技術を補完するものと考えるべきである⁸⁾。

6. おわりに

ヒトゲノムプロジェクトの輝かしい成果として、全ゲノムのシーケンスのドラフト版が2001年に公表された⁹⁾。そして、2003年には完全解読が宣言された。既にポストゲノム時代に突入し、DNAマイクロアレイなどの網羅的発現解析の技術は飛躍的な進歩を遂げている。FISH法も発現

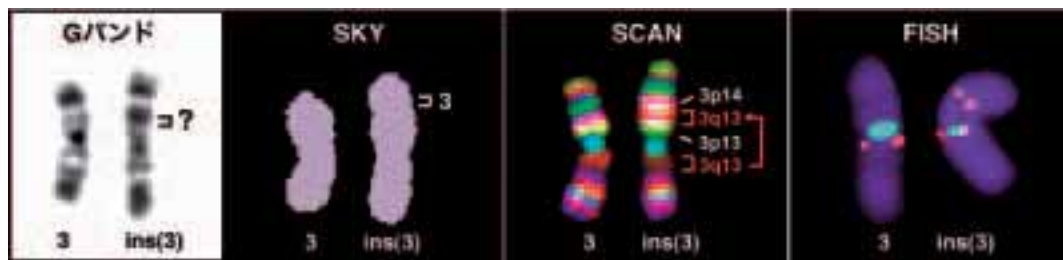


図8. 異常断片のバンド単位での由来同定

悪性リンパ腫症例。

Gバンド：3番染色体短腕に由来不明の短い断片の挿入が認められた（[ins(3)]と記載された染色体）。左は正常な3番相同染色体。

SKY：この挿入断片は同じ3番染色体由来であったため、ins(3)染色体を色調の変化として検出できない。また、挿入断片が短いため、3番染色体内のどのバンド由来であるかも明らかにできない。

SCAN：3p13バンドと3p14バンドの間に、左の正常な3番相同染色体では認められない過剰な赤いシグナルの挿入片を認めた。さらに、その挿入片は、同じ3番染色体長腕q13バンドのシグナルと、色調とスペクトルパターンにおいて一致した。SCAN法によって初めて、挿入断片が3q13バンド由来であることが明らかになった。

FISH：3q13バンド由来のゲノムDNAをプローブとしてFISH解析を行うと、ins(3)染色体の短腕でもシグナル（赤）を認め、SCAN法による解析結果が裏付けられた。緑のシグナルは3番染色体セントロメアを示す。

解析への応用の道が、着実に開かれてきている¹⁰⁾。われわれは、過去における染色体解析技術開発の輝かしい歴史に決して甘んじることなく、さらなる新技術の創造と応用を目指し、未来に向けて今後も大きく道を切り開いていかなければならない。

謝 辞

3番染色体のSCAN法に関する研究は、Applied Spectral Imaging社のIrit Bar-Am女史との共同研究であり、ここに深謝いたします。また、研究全般について助手を勤めてくれた技能補佐員の山根史嗣氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Tjio JH & Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1-6, 1956
- 2) Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Veldman T, Vignon C, Schröck E, Rowley JD, Ried T: Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497, 1996
- 3) Kakazu N, Ashihara E, Hada S, Ueda T, Sasaki H, Terada M, Abe T: Development of spectral colour banding in cytogenetic analysis. *Lancet* 357: 529-530, 2001
- 4) 嘉数直樹：臨床検査増刊号 造血器腫瘍（押味和夫，池田康夫編集），医学書院，東京，2002
- 5) Kakazu N, Taniwaki M, Horiike S, Nishida K, Tatekawa T, Nagai M, Takahashi T, Akaogi T, Inazawa J, Ohki M, Abe T: Combined spectral karyotyping and DAPI banding analysis of chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 336-345, 1999
- 6) Kakazu N, Kito K, Hitomi T, Oita J, Nishida K, Masuda K, Miki T, Abe T: Characterization of complex chromosomal abnormalities in B-cell lymphoma by a combined spectral karyotyping (SKY) analysis and fluorescence in situ hybridization (FISH) using a 14q telomere probe. *Am J Hematol* 65: 291-297, 2000
- 7) Kakazu N, Bar-Am I, Hada S, Ago H, Abe T: A new chromosome banding technique, spectral color banding (SCAN), for full characterization of chromosomal abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 412-416, 2003
- 8) Kakazu N, Abe T: Multicolor Banding Technique, Spectral Color Banding (SCAN): New Development and Applications. *Cytogenet Genome Res* 114: 250-256, 2006
- 9) International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001
- 10) Capodiceci P, Donovan M, Buchinsky H, Jeffers Y, Cordon-Cardo C, Gerald W, Edelson J, Shenoy SM, Singer RH: Gene expression profiling in single cells within tissue. *Nat Methods* 2: 663-665, 2005