

In situ hybridization 法による CEA 及び NCA mRNA の検出： 大腸癌及び大腸腺腫における検索

伊 藤 淳

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Detection of CEA and NCA mRNA by *In Situ* Hybridization : Investigation in Colonic Cancers and Adenomas

Jun ITOH

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. YACHI)

ABSTRACT In order to study the expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific cross-reacting antigen (NCA) genes in colonic disorders, the expression of CEA and NCA mRNA in colonic cancers, noncancerous colonic mucosa and colonic adenomas was investigated by *in situ* hybridization. The results were compared with those of CEA gene products by the immunohistochemical method using anti-CEA monoclonal antibody. Furthermore, in some cases of colonic cancers, the expression of CEA and NCA mRNA was investigated by Northern blot analysis. The results are summarized as follows :

1. It was possible to detect specific mRNA for CEA and NCA from human cultured cell lines by *in situ* hybridization using probes from the 3'noncoding regions of CEA and NCA cDNA.
2. In 80% of colonic cancerous tissues, CEA mRNA was detected by *in situ* hybridization. The distribution of CEA mRNA corresponded with the immunohistochemical staining pattern of the CEA product. In noncancerous colonic mucosa, however, CEA mRNA was not detected by *in situ* hybridization.
3. The expression of NCA mRNA in colonic cancerous tissues detected by *in situ* hybridization and Northern blot analysis was stronger than that in noncancerous colonic mucosa. This suggests that NCA mRNA may be a useful tumor marker in histological studies.
4. The expression of CEA and NCA mRNA in colonic adenomas detected by *in situ* hybridization was stronger than that in noncancerous colonic mucosa. This suggests that colonic adenomas have a higher potential for malignancy than noncancerous colonic mucosa. Hereafter, it is important to compare the gene expression of CEA and NCA between cancer in adenoma and *de novo* cancer.

(Received December 18, 1989 and accepted January 10, 1990)

Key words : Carcinoembryonic antigen, Nonspecific cross-reacting antigen, *In situ* hybridization, Colonic cancer, Colonic adenoma

Abbreviations

BGP-1	: biliary glycoprotein-1	MOPS	: 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid
BSA	: bovine serum albumin	mRNA	: messenger RNA
cDNA	: complementary DNA	PS β G	: pregnancy-specific β_1 -glycoprotein
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid	RNase	: ribonuclease
kb	: kilobase	SSC	: standard saline citrate

1 緒 言

Carcinoembryonic antigen (CEA) は、1965年 Gold and Freedman¹⁾ により大腸癌組織より検出された分子量約 18 万、約 600 個のアミノ酸よりなり、分子量の約 50% を糖鎖部分が占める糖蛋白抗原で、代表的な腫瘍マーカーの一つとして臨床的に利用されている。

最近の遺伝子工学の発達により、CEA については 1987 年 Oikawa *et al.*²⁾ が遺伝子クローニングに成功し、さらに CEA と部分共通抗原性を有する nonspecific cross-reacting antigen (NCA)³⁾ についても、Neumaier *et al.*⁴⁾ によりクローニングされ、それぞれペプチドの一次構造が決定された。これらの cDNA を用いた分子生物学的手法の応用により、遺伝子発現を RNA レベルで解析することが可能となり、CEA 及び NCA については、これまで主に組織より RNA を抽出し、Northern blot 法により解析されてきた⁵⁻⁷⁾。しかしこのような方法では組織内における分布や、個々の細胞の遺伝子発現の状態を詳細に観察することは困難である。一方、Northern blot 法と相補的な役割を果たす手法として、特定の mRNA を組織切片上で検出する *in situ* hybridization 法があり、本法によれば、組織形態を保持しつつ、個々の細胞レベルにおける遺伝子発現の状態が検出可能である。

本研究では、CEA 及び NCA にそれぞれ特異的な cDNA をビオチンで標識して非放射性プローブを作製し、大腸癌及び非癌部組織（特に大腸腺腫）における CEA 及び NCA mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検索し、従来の免疫組織学的手法による産物レベルでの成績と比較検討した。一部の大腸癌症例についてはさらに Northern blot 法を施行し、mRNA の発現強度について *in situ* hybridization 法による結果と比較検討した。

2 方 法

2.1 培養細胞株及び臨床組織材料

2.1.1 培養細胞株

CEA 産生性細胞株として、大腸癌細胞 BM314 及び胃癌細胞 MKN45、CEA 非産生性細胞株として、肝癌細胞 c-Hc-4 を用いた。これらを 10% 牛胎仔血清加 RPMI1640 培養液 (GIBCO, USA) を用い、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

2.1.2 臨床組織材料

外科的切除、内視鏡的摘除術（ポリペクトミー）または内視鏡下生検によって得られた大腸癌 15 例（中分

化腺癌 13 例、低分化腺癌 1 例、粘液癌 1 例）、大腸腺腫 13 例（tubulo-villous adenoma 2 例、tubular adenoma 11 例）、大腸過形成ポリープ 2 例、さらに発生母地としての臓器の違いによる比較対照として、胃中分化型管状腺癌 2 例、胃過形成ポリープ 1 例の総計 33 例を用いた。また外科的切除によって得られた癌症例では、同時に癌部より原則として 5 cm 以上離れた粘膜部分を採取し、非癌部材料として用いた。これらの各組織材料は、採取後 30 分以内に 4% paraformaldehyde により固定後、30% sucrose 中で脱水処理を施し、OCT コンパウンド (Miles, USA) 中に包埋後、-80°C に凍結保存した。これらの各標本をマイクロトームにより 5 μm の凍結切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色を行い組織学的に検討するとともに、以下に述べる *in situ* hybridization 法及び免疫組織学的検索に供した。また大腸癌及び非癌部粘膜の一部は、原則として採取後直ちに（一部の手術材料については 4°C で 10~15 分保管後）、-80°C に凍結保存し、Northern blot 法のための total RNA の抽出に用いた。

2.2 cDNA プローブ

本研究において用いたプローブとしては、J. E. Shively 博士 (Research Institute of City of Hope, Duarte, CA) より供与された CEA cDNA である pCEA3⁸⁾ の *RsaI-EcoRI* 断片 0.39 kb (以下 CEA non-coding)、及び NCA cDNA である NCA #2⁴⁾ の *EcoRI-HindIII* 断片 0.85 kb (以下 NCA non-coding) を用いた。さらに *in situ* hybridization 法の基礎的検討におけるプローブの negative control として、がん研究振興財団遺伝子バンクより供与された human chorionic gonadotropin cDNA である pchCG-beta #67⁹⁾ の *HindIII* 断片 0.6 kb、及び human amyloid beta-protein cDNA である pAZ-11^{10,11)} の *EcoRI* 断片 0.65 kb を用いた。

2.3 *In situ* hybridization 法

2.3.1 プローブの標識

2.2 に おい て 述 べ た プ ロ ー ブ を、ランダムプライマー法¹²⁾ により標識した。すなわち cDNA を一本鎖とした後に、DNA polymerase I の large fragment (TAKARA, Japan) によりビオチン標識 dUTP (BRL, USA) を取り込ませる方法によった。

2.3.2 *In situ* hybridization 法

In situ hybridization 法は、Singer *et al.*¹³⁾ の方法を一部改変し行った。すなわち 2.1.2 で述べた凍結組織切片に対し前処理として、PBS で 10 分間処理した後、proteinase K (Boehringer, W. Germany) を用

い、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 37°C 、 $10\sim 30$ 分の条件により除蛋白操作を行った。PBS 洗浄後、4% paraformaldehyde で 5 分間、後固定を行い、さらに PBS 洗浄後、Jensen *et al.*¹⁴⁾ の方法に準じて 0.01 M EDTA 、 0.01 M MgCl_2 で 30 分間処理することにより、内因性アルカリフォスファターゼ活性を除去した。その後 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)、 0.1 M glycine を室温で 10 分間加え、さらに 50% deionized formamide、 $2\times\text{SSC}$ により 70°C 、10 分間処理後、ビオチン化 cDNA プローブをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは 50% deionized formamide、 $2\times\text{SSC}$ 、10% dextran sulphate (Pharmacia, Sweden)、0.2% BSA、20 mM vanadyl ribonucleoside complex (BRL, USA) よりなる混合液(プローブ最終濃度 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$) 中で 37°C 、15 ないし 20 時間インキュベートした。その後のシグナルの検出は以下の如く行った。50% formamide、 $2\times\text{SSC}$ (30 分)、50% formamide、 $1\times\text{SSC}$ (30 分)、 $1\times\text{SSC}$ (30 分) により洗浄後、3% BSA 中で 37°C 、30 分間インキュベートした。次にプローブ上の標識ビオチンに、ストレプトアビジン(Boehringer, W. Germany) ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) を室温、1 時間の反応により結合させ、さらにストレプトアビジンにビオチン化アルカリフォスファターゼ(Vector laboratories, USA) ($1 \text{ U}/\text{ml}$) を室温、1 時間の反応により結合させ、最後に反応基質として、ニトロブルーテトラゾリウム(Sigma, USA) ($0.33 \text{ mg}/\text{ml}$)、5-プロモモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェート(Sigma, USA) ($0.17 \text{ mg}/\text{ml}$) の混合溶液を用いて発色を行った。核染色は 1% メチルグリーン(Sigma, USA) により行った。

2.4 Northern blot 法

2.4.1 total RNA の抽出

2.1.2 で得られた凍結組織材料を液体窒素中でホモジナイズした後、Chirgwin *et al.*¹⁵⁾ の方法に従い guanidinium thiocyanate 法により total RNA を抽出した。

2.4.2 プローブの標識

2.2 において述べたプローブを、ニックトランスレーション法¹⁶⁾ により標識した。Specific activity は $5\sim 8\times 10^8 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ であった。

2.4.3 Northern blot 法

Northern blot 法は Goldberg¹⁷⁾ の方法に準じて行った。すなわち 2.4.1 で抽出した total RNA $20 \mu\text{g}$ を、Goldberg buffer (0.04 M MOPS 、 $5 \text{ mM sodium citrate}$ 、 0.5 mM EDTA)、16% formaldehyde を含む 1% agarose (Bio-Rad, USA) gel で、 30 V 、約 8

時間電気泳動を行った。泳動後、RNA をニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell BA85, W. Germany) にトランスファーし、続いてポリシラーバック内で 2.4×2 で作製したプローブを最終濃度 $0.4\times 10^6 \text{ cpm}/\text{ml}$ となるように加え、ニトロセルロース膜を 42°C 、15 ないし 20 時間インキュベートし、ハイブリダイゼーションを行った。次にニトロセルロース膜を洗浄した後、XAR-5 フィルム(Kodak, USA) を用い、 -80°C においてオートラジオグラフィを行った。

2.5 免疫組織学的検索

2.1.2 で述べた凍結切片を用い、藤田・今井¹⁸⁾ の報告に準じて間接免疫ペルオキシダーゼ法を行った。一次抗体として CEA ペプチドをエピトープとするモノクローナル抗体 MA208¹⁹⁾、次いで二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリン(DAKO, Denmark) を反応させ、0.01% 過酸化水素水加 3-3' ジアミノベンチジンにより発色を行った。

3 成 績

3.1 In situ hybridization 法の基礎的検討

CEA 及び NCA の 3' noncoding region をプローブとして用い、まず培養細胞を対象として *in situ* hybridization 法の基礎的検討を行った。

Fig. 1 にプローブとして、CEA noncoding を用いた結果を示す。CEA 産生性の大腸癌細胞 BM314 及び胃癌細胞 MKN45 において、陽性シグナルを細胞質内に顆粒状ないしその集積として認めた。一方 CEA 非産生性の肝癌細胞 c-Hc-4 では、シグナルは検出されなかった。同じ培養細胞を対象とし、プローブとして NCA noncoding を用いた場合も、同様の結果を得た。

さらに BM314 を対象とし、以下の検討を行った。Fig. 2(a) に示すように、CEA noncoding をハイブリダイズさせる前に、BM314 を RNase A(Boehringer, W. Germany) で前処理することにより ($10 \mu\text{g}/\text{ml}\sim 1 \text{ mg}/\text{ml}$ 、 $1\sim 3$ 時間)、シグナルはほぼ完全に消失した。また Fig. 2(b) に示すように、非標識の CEA noncoding プローブをあらかじめ CEA mRNA とハイブリダイズさせることにより(プローブ最終濃度 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)、ビオチン化プローブのハイブリダイゼーションは阻止され、シグナルは検出されなかった。以上について、プローブとして NCA noncoding を用いた場合も、同様の結果を得た。さらに negative control のプローブとして pchCG-beta # 67 あるいは pAZ-11 を用いてハイブリダイゼーションを試みたが、シグナルは検出されなかった。Fig. 2(c) に pchCG-beta # 67 の成績を示し

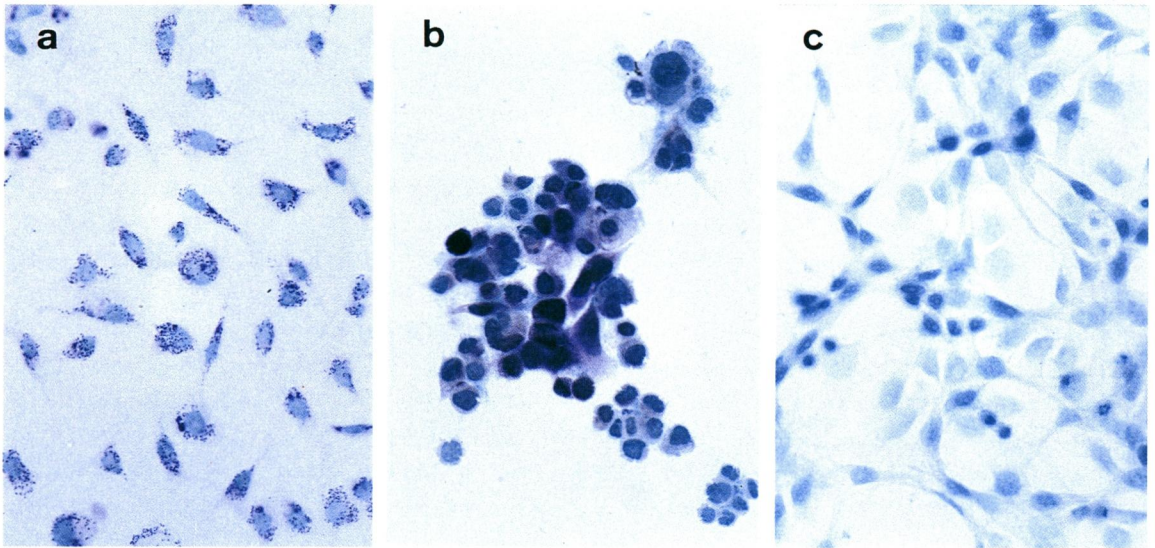


Fig. 1 *In situ* hybridization of human cultured cell lines with CEA noncoding probe. (a), colonic cancer cell line BM314; (b), gastric cancer cell line MKN45; (c), hepatocellular carcinoma cell line c-Hc-4. Nuclei of the cells were stained with methyl green. ($\times 470$)

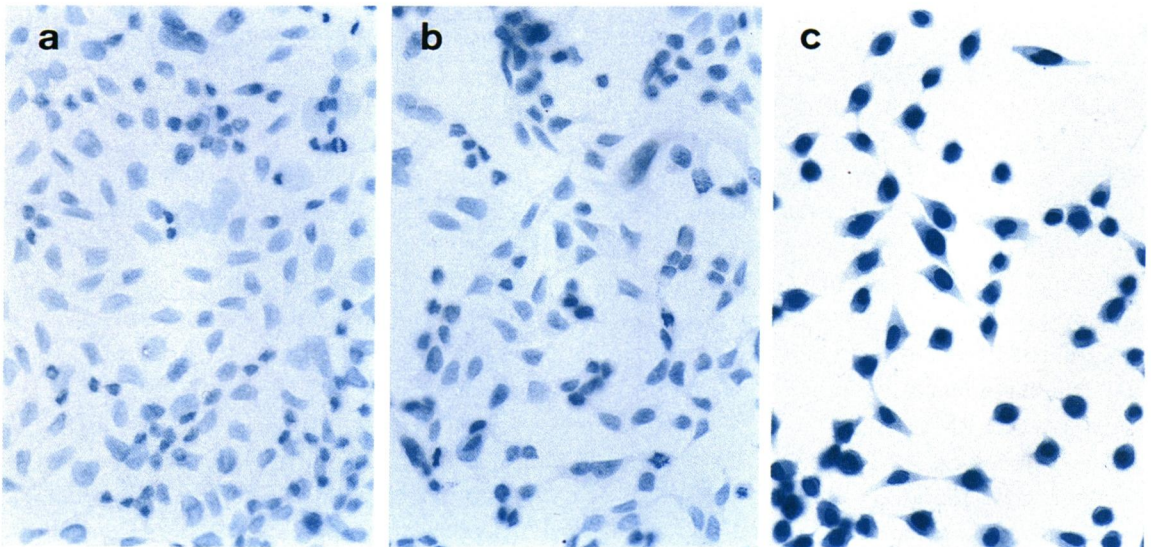


Fig. 2 *In situ* hybridization of BM314 with CEA noncoding probe. No signal was detected when the cells were pretreated with RNase A(a), and with the same unlabeled probe(b). No signal was detected with human chorionic gonadotropin cDNA pchCG-beta#67 which was used as negative control of the probe (c). Nuclei of the cells were stained with methyl green. ($\times 470$)

た。

3・2 大腸癌組織における CEA 及び NCA mRNA の発現

3・2・1 CEA mRNA 及び産物としての CEA について

外科的切除または内視鏡下生検によって得られた大腸癌 15 例について、癌部及び非癌部における CEA

mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて検索し、免疫組織染色による産物としての CEA の局在と比較検討した。Table 1 に CEA mRNA の発現強度の成績を一括して示すが、癌部では発現強度に差はあるものの、15 例中 12 例に癌細胞の細胞質中に mRNA の陽性シグナルを認めた。一方非癌部においては、全体にシグナルは弱く、腺腔細胞の細胞質中に陽性シグナ

Table 1 In situ hybridization and immunohistochemistry of colonic cancers.

Case No.	Histology	In situ hybridization				Immunohistochemistry (Anti-CEA MoAb MA208)	
		CEA		NCA		Ca	N
		Ca	N	Ca	N	Ca	N
C 1	mod. diff. adenoca.	++	-	+	-	++	+/-
C 2	mod. diff. adenoca.	++	-	+	-	++	+/-
C 3	mod. diff. adenoca.	++	-	+	-	++	+/-
C 4	mod. diff. adenoca.	++	-	++	-	++	-
C 5	mod. diff. adenoca.	++	-	++	-	+	+/-
C 6	mod. diff. adenoca.	++	-	+/-	+/-	++	-
C 7	mod. diff. adenoca.	++	nd	+	nd	+	nd
C 8	mod. diff. adenoca.	+	-	+	+/-	+	+/-
C 9	mod. diff. adenoca.	+/-	-	-	-	+	-
C10	mod. diff. adenoca.	+/-	-	-	-	+	-
C11	mod. diff. adenoca.	-	-	+/-	+/-	+	+/-
C12	mod. diff. adenoca.	-	-	-	-	+	+/-
C13	mod. diff. adenoca.	-	-	-	-	+	+/-
C14	poorly diff. adenoca.	+/-	-	++	+/-	++	+/-
C15	mucinous ca.	+/-	-	-	-	++	+/-
C16	mod. diff. adenoca. (stomach)	+/-	-	+/-	-	++	+/-
C17	mod. diff. adenoca. (stomach)	+/-	-	+	-	+	+/-

The intensity of *in situ* hybridization and immunohistochemical staining was scored as negative(-), slightly positive(+/-), positive(+) and strongly positive(++).

MoAb, monoclonal antibody; Ca, colonic cancer; N, adjacent mucosa; mod. diff. adenoca., moderately differentiated adenocarcinoma; poorly diff. adenoca., poorly differentiated adenocarcinoma; mucinous ca., mucinous carcinoma; nd, not done.

ルを認めなかった。

抗 CEA モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色では、Table 1 に示すように、癌部では 15 例中全例に癌細胞の細胞質中に、産物としての CEA の比較的強い局在を認めた。かつその局在部位は、CEA mRNA の発現部位とほぼ一致していた (Fig. 3(a), (b))。一方非癌部においては、検索しえた 14 例中 10 例に、腺腔細胞の腺腔側に微量の CEA の局在を認めた (Fig. 4(a), (b))。

一方 Northern blot 法では、癌部では検索しえた 9 例中全例に、CEA mRNA に相当する 3.5 kb 及び 4.2 kb のバンドが検出された。なお一部の症例では 5 kb 付近にも弱いバンドが検出されているが、これは 28S ribosomal RNA と非特異的にハイブリダイズしているものと考えられた。非癌部では 9 例中 7 例に同様に CEA mRNA に相当するバンドが検出されたが、癌部に比較すると、発現が弱い傾向が認められた。しかし症例によっては、C2 のように癌部と同程度の発現を示

すものも認められた (Fig. 5(a), (b))。

3・2・2 NCA mRNA について

3・2・1 で述べた大腸癌 15 例について、*in situ* hybridization 法による NCA mRNA 発現の検索結果を Table 1 に示す。癌部では 15 例中 10 例に、癌細胞の細胞質中に mRNA の陽性シグナルを認めた (Fig. 3 (c))。発現強度は症例により異なるが、NCA mRNA の発現を認める症例では、概ね CEA mRNA も発現しており、かつその局在部位もほぼ一致を認めた。一方非癌部においては、14 例中 4 例に一部の腺腔細胞の細胞質中に、ごく微量ながらも mRNA の陽性シグナルを認めた (Fig. 4(c))。

一方 Northern blot 法では、癌部では 9 例中全例に、NCA mRNA に相当する 2.9 kb のバンドが検出された。非癌部では 9 例中 8 例に同様のバンドが検出されたが、各症例毎に観察した場合、非癌部よりも癌部に発現が強いという一定の傾向が認められた (Fig. 6(a), (b))。

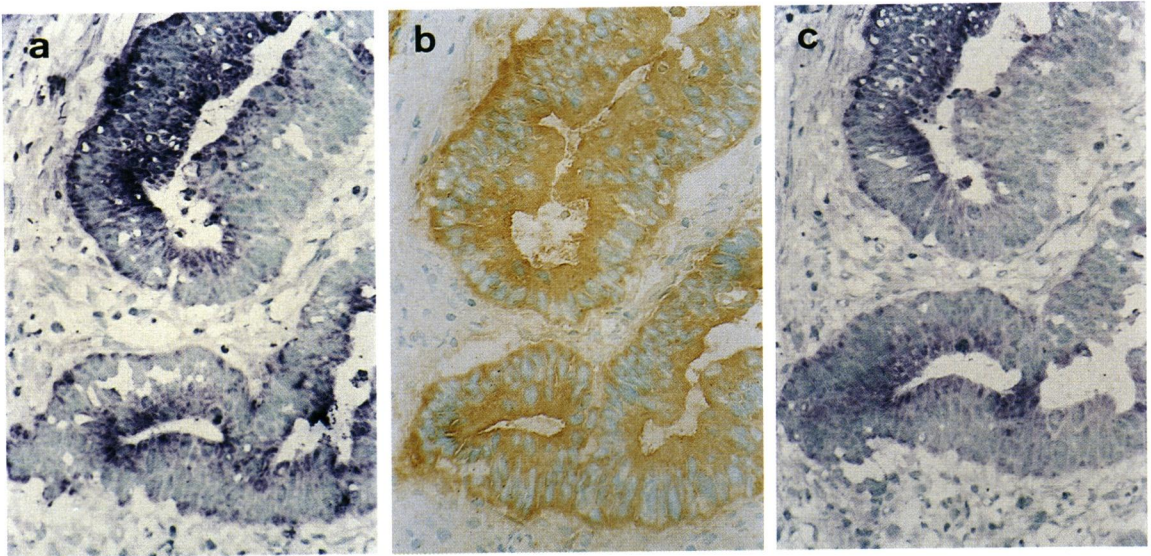


Fig. 3 Comparison of the localization of the CEA and NCA gene products in colonic cancer. (a), *in situ* hybridization with CEA noncoding probe; (b), immunohistochemical staining pattern with anti-CEA monoclonal antibody MA208; (c), *in situ* hybridization with NCA noncoding probe. ($\times 340$)

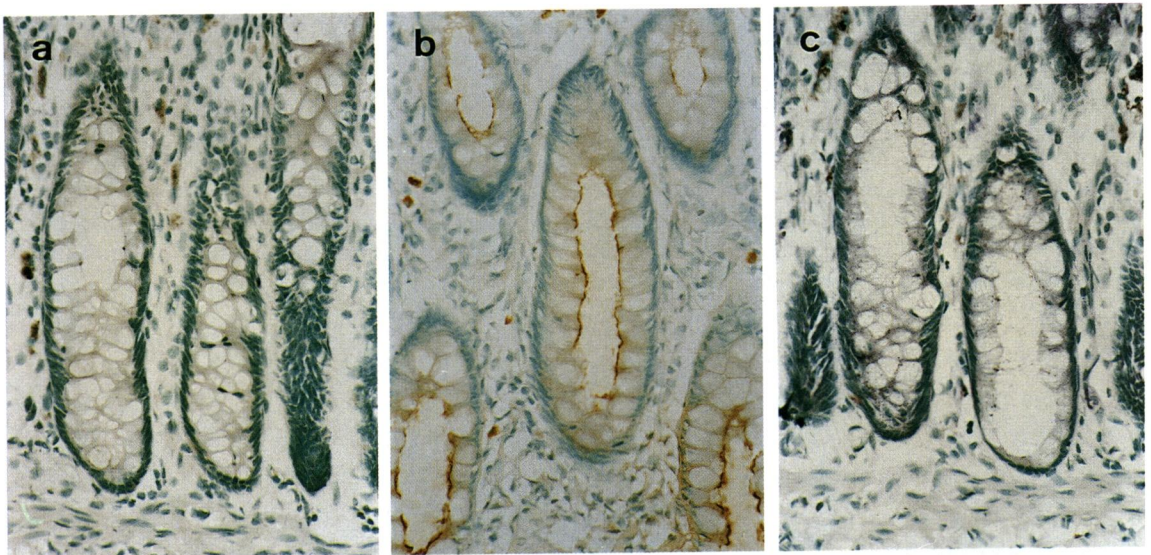


Fig. 4 Comparison of the localization of the CEA and NCA gene products in noncancerous colonic mucosa. (a), *in situ* hybridization with CEA noncoding probe; (b), immunohistochemical staining pattern with anti-CEA monoclonal antibody MA208; (c), *in situ* hybridization with NCA noncoding probe. ($\times 340$)

3・3 大腸腺腫における CEA 及び NCA mRNA の発現

3・3・1 CEA mRNA 及び産物としての CEA について

内視鏡的摘除術または内視鏡下生検によって得られた大腸腺腫 13 例，大腸過形成ポリープ 2 例について，CEA mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用い

て検索し，免疫組織染色による産物としての CEA の局在と比較検討した。

Table 2 に CEA mRNA の発現強度の成績を一括して示すが，15 例中 7 例（全て腺腫）に腺腫組織の細胞質中に mRNA の陽性シグナルを認めた。mRNA の発現強度は，癌組織に比較すると全般的に弱い傾向が認められたが，組織型による比較では，tubular adenoma

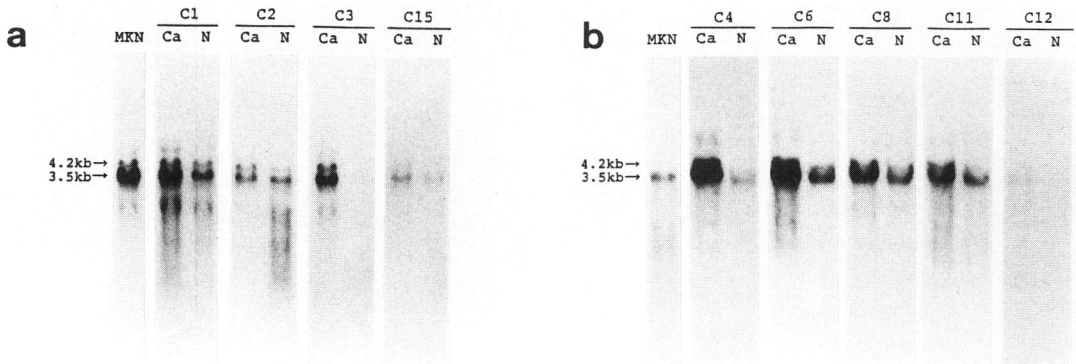


Fig. 5 Northern blot analysis of total RNA from human colonic cancers and adjacent tissues with CEA non-coding probe. (a) denotes experiment No. 1, and (b) denotes experiment No. 2. C1-C15, patient No. 1-patient No. 15, respectively; MKN, human gastric cancer cell line MKN45; Ca, colonic cancer; N, adjacent mucosa.

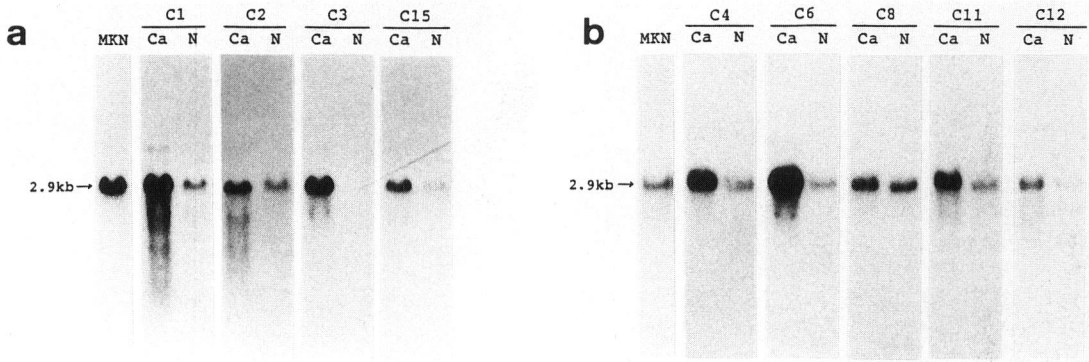


Fig. 6 Northern blot analysis of total RNA from human colonic cancers and adjacent tissues with NCA non-coding probe. (a) denotes experiment No. 1, and (b) denotes experiment No. 2. C1-C15, patient No. 1-patient No. 15, respectively; MKN, human gastric cancer cell line MKN45; Ca, colonic cancer; N, adjacent mucosa.

に比較し tubulo-villous adenoma においてやや強い傾向が認められた (Fig. 7(a)).

免疫組織染色では, Table 2 に示すように, 15 例中 13 例に CEA の局在を認めた. しかし局在部位は症例により異なっており, tubulo-villous adenoma では腺腫組織の細胞質中にも, 比較的強い CEA の局在を認めたのに対し (Fig. 7(b)), tubular adenoma では CEA の発現が弱い症例ほど, 局在が腺腔側に限局する傾向が認められ, 非癌部粘膜における局在様式と類似していた.

3・3・2 NCA mRNA について

3・3・1 で述べた大腸腺腫及び過形成ポリープ 15 例について *in situ* hybridization 法による NCA mRNA 発

現の検索結果を Table 2 に示す. 15 例中 6 例 (全て腺腫) に, 腺腫組織の細胞質中に mRNA の陽性シグナルを認めたが, 発現強度は癌組織に比較すると, 全般的に弱い傾向が認められた. 一方 NCA mRNA の発現を認める症例では, 癌部と同様に概ね CEA mRNA も発現しており, かつその局在部位もほぼ一致を認めた (Fig. 7(c)).

3・4 胃癌及び胃過形成ポリープにおける CEA 及び NCA mRNA の発現

大腸癌及び大腸腺腫に対する比較対照として, 胃癌 2 例, 胃過形成ポリープ 1 例につき同様に検索を行った. 癌部では 2 例ともに, CEA 及び NCA mRNA の発現を認め, 産物としての CEA の局在を認めた. いずれも

Table 2 *In situ* hybridization and immunohistochemistry of colonic adenomas.

Case No.	Histology	<i>In situ</i> hybridization		Immunohistochemistry
		CEA	NCA	(Anti-CEA MoAb MA208)
A 1	tubulo-villous adenoma	+	+	++
A 2	tubulo-villous adenoma	+	+/-	+
A 3	tubular adenoma	+	-	+/-
A 4	tubular adenoma	+/-	+	+/-
A 5	tubular adenoma	+/-	+/-	+
A 6	tubular adenoma	+/-	+/-	+/-
A 7	tubular adenoma	+/-	-	+
A 8	tubular adenoma	-	+/-	+
A 9	tubular adenoma	-	-	+
A10	tubular adenoma	-	-	+/-
A11	tubular adenoma	-	-	+/-
A12	tubular adenoma	-	-	+/-
A13	tubular adenoma	-	-	-
A14	hyperplastic polyp	-	-	+/-
A15	hyperplastic polyp	-	-	-
A16	hyperplastic polyp (stomach)	-	-	+/-

The intensity of *in situ* hybridization and immunohistochemical staining was scored as negative(-), slightly positive(+/-), positive(+) and strongly positive(++).

MoAb, monoclonal antibody.

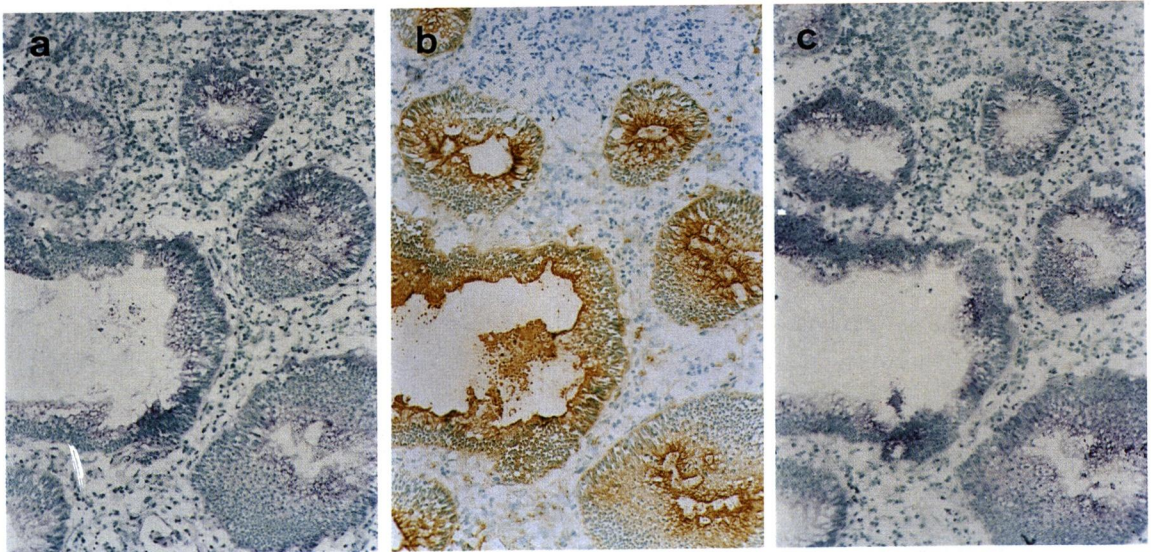


Fig. 7 Comparison of the localization of the CEA and NCA gene products in colonic adenoma. (a), *in situ* hybridization with CEA noncoding probe; (b), immunohistochemical staining pattern with anti-CEA monoclonal antibody MA208; (c), *in situ* hybridization with NCA noncoding probe. ($\times 340$)

腸上皮化生を示す非癌部では mRNA の陽性シグナルを認めなかったが、腺腔細胞の腺腔側に微量の CEA の局

在を認めた (Table 1). 一方、胃過形成ポリープでは mRNA の陽性シグナルを認めなかったが、腺腔側に限

局して CEA の局在を認めた (Table 2).

4 考 察

CEA 及び NCA は cDNA のクローニングの成功により、遺伝子レベルでの解析が可能となり、これまでも教室の高橋⁷⁾により CEA 及び NCA にそれぞれ特異的な cDNA プローブを用い Northern blot 法により、大腸癌及び従来より大腸癌の発生母地として注目されてきた大腸腺腫について、CEA 及び NCA mRNA の発現状況について検索されてきた。それに続いて本研究ではこれらの cDNA プローブを用い、*in situ* hybridization 法により大腸癌及び大腸腺腫における CEA 及び NCA mRNA の発現状況を検索し、従来の免疫組織学的手法による蛋白レベルでの成績と比較検討した。

In situ hybridization 法はプローブの標識法により、放射性プローブを用いる方法と、非放射性プローブを用いる方法に大別される。³H をはじめとするアイソトープによる標識法は、核種によりオートラジオグラフィに要する時間、解像力等に関してそれぞれ欠点を持ち、かつ特定の設備を要するなどの不便な点がある。一方、これらの問題を解決すべくハプテン等の非放射性物質でプローブを標識する方法の開発が進められつつある。これまでもビオチン²⁰⁾、DNP 基²¹⁾、スルホン基²²⁾、チミン 2 量体化²³⁾ などによるプローブ標識法が考案され利用されている。本研究で用いたビオチン標識による方法は、全行程を 3 日で終了でき、かつ通常の研究室で施行可能であるなどの利点がある。

CEA 及び NCA は、これまでの研究により、immunoglobulin gene superfamily に属するものと考えられており⁴⁾、両抗原は domain 構造を呈しており^{2,4)}、その塩基配列を比較すると、coding region に関しては対応する domain 構造の間に 80% 以上の homology が認められている⁴⁾。一方、3'noncoding region に関しては、その塩基配列は一部を除いて全く異なっており、CEA 及び NCA にそれぞれ特異的なプローブとなりうるものが、既に Northern blot 法を用いて示されている^{6,7)}。今回、これらの CEA 及び NCA の 3'noncoding region をプローブとして用い、*in situ* hybridization 法を施行した。

はじめに培養細胞を対象として *in situ* hybridization 法の基礎的検討を行った。その結果 BM314 及び MKN45 において、細胞質中に CEA 及び NCA mRNA の陽性シグナルを検出した。しかし個々の細胞に注目するとシグナルの強さに差があり、これらは個々の細胞の細胞周期の違いによる、CEA 及び NCA

mRNA の発現の差異を反映している可能性がうかがわれるが、mRNA の安定性その他の要因もあり、さらに詳細な検討を要するものと考えられた。

これらが目的とする mRNA を特異的に検出しているかどうかを、BM314 を対象として、さらに以下の方法により検討した。まず RNase による前処理により、シグナルはほぼ完全に消失した。このことは、プローブが DNA や蛋白分子に非特異的に結合することなく、RNA とハイブリダイズしていることを示唆している。次に非標識プローブをあらかじめ mRNA とハイブリダイズさせることにより、ビオチン化プローブのハイブリダイゼーションが阻止され、シグナルは検出されなかった。さらに negative control のプローブを用いた *in situ* hybridization 法を試みたが、同様にシグナルは検出されず、今回用いた CEA 及び NCA の cDNA プローブは、*in situ* hybridization 法においても特異的に CEA 及び NCA mRNA を検出することが示唆された。

さて CEA は、当初考えられていたほど癌特異的な抗原ではなく、大腸腺腫や正常大腸粘膜などの消化管粘膜上皮にも存在することが免疫組織学的に既に確認された^{18,24,25)}。しかしモノクローナル抗体による反応性はエピトープ部分に対する糖鎖の影響が強く、CEA 関連抗原との鑑別が困難な場合があり、免疫組織学的手法による解析には限界がある。さらに最近、CEA gene family として NCA の他にも BGP-1²⁶⁾ 及び PSβ G²⁷⁾ が相次いでクローニングされ、これらを mRNA レベルで鑑別することの重要性は増してきている。

そこで *in situ* hybridization 法を、臨床材料に応用し検討した。この場合 RNA の安定性という面から、特に手術標本における固定または凍結までに要する時間が問題となる。この点について林ら²⁸⁾は、マウス摘出臓器を用いて検討しているが、RNase が豊富な脾臓を除き、肝臓及び胃に関しては、摘出後数時間は mRNA が保存されることを示している。しかし手術標本の処理は迅速である方が望ましいと判断し、本研究においては可及的速やかに固定及び凍結を行った。

まず大腸癌部では、高率に CEA mRNA の発現及び産物としての CEA の強い表出を認めた。これらの成績より、大腸癌細胞において CEA mRNA の発現が亢進しており、同時に翻訳段階での亢進をも伴っていることが示唆された。

非癌部では、*in situ* hybridization 法により CEA mRNA は検出されなかったのに対し、Northern blot 法では、癌部に比較すると発現強度は弱い傾向にある

が、CEA mRNA の発現を認める症例が多かった。以上の成績は、*in situ* hybridization 法による mRNA の検出には、一定量以上の mRNA が保持されていなければならないことを示唆しており、mRNA の検出感度を向上させることが本法の今後の課題となろう。なお *in situ* hybridization 法の場合には、Northern blot 法と異なり、薄切標本の固定という別な要因が含まれる。固定法については、これまで mRNA の保存性、検出率及びバックグラウンドの強さ等から総合的にみて、4% paraformaldehyde による固定が最良とされており¹³⁾、本研究においても同じ固定法による。ちなみに従来のホルマリン固定、パラフィン包埋標本を用い、一部比較検討を試みたが、癌部及び非癌部ともに mRNA は検出しえなかった。最近、マイクロウェーブ照射による新しい固定法²⁹⁾も開発されており、今後これらを含めた固定法の比較検討が必要であろう。さらに他のハプテンを用いたプローブ標識法の比較も重要であると考えられる。

またこれまでの免疫組織学的検索では、癌部と非癌部の間に染色強度の強弱や細胞内局在の相違²⁴⁾を認める報告が多いが、本研究では免疫組織染色においては、腺腔側に微量の CEA の局在を認めるのみで、Northern blot 法による CEA mRNA の発現量との間に解離が認められる。この点については、Cournoyer *et al.*⁶⁾ は posttranscriptional modification の存在を仮定し、非癌部粘膜より検出される CEA mRNA が、蛋白合成に直接結びつかないとの考えを示している。しかし非癌部粘膜に検出される CEA mRNA のサイズは癌部からのものと一致しており⁶⁻⁷⁾、非癌部粘膜細胞においても CEA の活発な合成が行われている可能性がある。免疫組織学的に非癌部粘膜細胞において、CEA が腺腔側に極性を示して存在することからも、非癌部粘膜細胞では合成された CEA の turn over が早く、速やかに腸管腔内へ放出される機序が推測される。癌細胞において、CEA が極性を失い細胞質全体に強い染色性を示すことは、癌化に伴う CEA 合成量の変化のみならず、CEA の放出機序の変化をも反映しているものと考えられ、今後この点についての解析が重要であろう。また最近、CEA が adhesion molecule としての機能を果たしているとの考えも提唱されており³⁰⁾、CEA の生物学的機能についてもさらに明らかにされることが期待される。

一方、NCA についての検索では、*in situ* hybridization 法により、一部の症例で非癌部からも NCA mRNA が検出されたが、発現強度は CEA mRNA と同様に癌部で強い傾向を認めた。最近 CEA gene fam-

ily の一つとしてクローニングされた PSβ G の noncoding region と、NCA との間に homology が指摘されている²⁷⁾しかし消化管粘膜における産物としての PSβ G の存在はこれまで報告はなく、さらに PSβ G の mRNA のサイズは 1.7 kb と 2.2 kb であり NCA の 2.9 kb とは異なるため、PSβ G との cross-hybridization の可能性は低い。Northern blot 法では、全症例につき非癌部よりも癌部で NCA mRNA が強く検出されていることが注目される。NCA の生物学的機能については CEA と同様に不明であるが、これらの成績から、癌化に伴う遺伝子レベルでの二次的な変化を反映した NCA mRNA の発現亢進が考えられ、NCA が組織における腫瘍マーカーのひとつとなりうることを示唆するものと言えよう。

次に大腸腺腫（過形成ポリープ 2 例を含む）について同様の検討を行った。CEA 及び NCA mRNA の検出率及び発現強度は、全体的に見ると大腸癌と非癌部の中間に位置し、かつ tubular adenoma に比較し、tubulo-villous adenoma において特に CEA mRNA の発現がやや強い傾向を認め注目された。免疫組織染色についても、tubular adenoma で CEA 発現の弱い症例ほど腺腔側に限局する傾向を示し、非癌部粘膜における CEA 局在様式に類似しており、逆に tubulo-villous adenoma では CEA 局在は腺腫組織の細胞質中にも及び、癌部での局在様式に類似していた。以前より大腸腺腫は大腸癌の発生源地として論議されてきたが、本研究の成績を総合してみると、CEA のみならず NCA 遺伝子発現に関しても大腸癌と非癌部の中間に位置していると考えられた。大腸腺腫の中でも tubular adenoma よりも tubulo-villous adenoma の方が malignant potential が高い³¹⁾とされており、今回の成績もこれを支持する所見と言えよう。さらに villous adenoma についても検索が必要と考えられる。

最近 adenoma-cancer sequence³¹⁾に対する反論として、大腸腺腫を発生母地とせず、正常大腸粘膜より発生する早期大腸癌、いわゆる *de novo* 癌の存在が提唱されている³²⁾。今回は *de novo* 癌と考えられる症例については検索しえなかったが、今後は特に cancer in adenoma との比較検討が重要と考えられる。

腫瘍マーカーの cDNA プローブを用いた *in situ* hybridization 法は、既に α -fetoprotein (AFP) についても応用されており、Otsuru *et al.*³³⁾ は AFP mRNA が肝癌のみならず肝硬変症においてもその一部に認められるとし、将来の癌化との関連性を論じている。本法は遺伝子クローニングの技術の進歩によりその

重要性を増しているが、その特徴は細胞レベル、組織レベルでその形態を保持しつつ、特定の核酸分子の分布状態が検索可能なことである。したがって oncogene のように、核酸レベルについてはその塩基配列まで詳細に解析されているにもかかわらず、産物についての知見に乏しい場合にも応用でき、Northern blot 法との併用によりその有用性は大きいものと考えられる。さらに Northern blot 法に比較して、サンプルは少量で済むことが臨床的観点からは重要であり、生検材料で簡単に行うことができる見通しのある方法であり、今後の普及が期待されよう。

5 要 約

1. CEA 及び NCA の cDNA の 3'noncoding region をプローブとし、培養細胞を対象に *in situ* hybridization 法の基礎的検討を行った。その結果、CEA 及び NCA mRNA をそれぞれ特異的に検出することが可能であった。

2. 大腸癌部において、*in situ* hybridization 法により高率に CEA mRNA の発現を認め、免疫組織学的検索による産物としての CEA の局在部位とはほぼ一致を認めた。一方、非癌部では *in situ* hybridization 法により CEA mRNA を検出した症例は認められなかった。

3. NCA mRNA の発現は、*in situ* hybridization 法及び Northern blot 法により、非癌部に比較し癌部に強い傾向が認められ、癌化に伴う NCA mRNA の発現亢進が考えられ、NCA の組織における腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。

4. 大腸腺腫における CEA 及び NCA mRNA の検出率及び発現強度は、大腸癌と非癌部の中間に位置する成績を得た。大腸癌の発生母地として、正常粘膜に比較し malignant potential の増強が予想され、今後 *de novo* 癌との比較検討が重要と考えられた。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた谷内昭教授、研究に際して直接御指導いただいた今井浩三講師ならびに東出俊之博士に深謝いたします。また cDNA プローブを供与下さった J.E. Shively 博士 (Research Institute of City of Hope, Duarte, CA)、がん研究振興財団遺伝子バンクならびに貴重な組織標本を御提供下さった諸先生に謝意を表します。

本研究は文部省がん特別研究 I (63010058, 01010054, 谷内)、がん特別研究 II (01015095, 今井)

ならびにがん特別研究 II (01015093, 日野田) の補助によった。

文 献

1. Gold, P. and Freedman, S. O.: Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* **121**, 439-462 (1965).
2. Oikawa, S., Nakazato, H. and Kosaki, G.: Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 511-518 (1987).
3. von Kleist, S., Chavanel, G. and Burtin, P.: Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2492-2494 (1972).
4. Neumaier, M., Zimmermann, W., Shively, L., Hinoda, Y., Riggs, A. D. and Shively, J. E.: Characterization of cDNA clone for the nonspecific cross-reacting antigen (NCA) and a comparison of NCA and carcinoembryonic antigen. *J. Biol. Chem.* **263**, 3202-3207 (1988).
5. Sato, C., Miyaki, M., Oikawa, S., Nakazato, H. and Kosaki, G.: Differential expression of carcinoembryonic antigen and nonspecific crossreacting antigen genes in human colon adenocarcinomas and normal colon mucosa. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **79**, 433-437 (1988).
6. Cournoyer, D., Beauchemin, N., Boucher, D., Benchimol, S., Fuks, A. and Stanners, C. P.: Transcription of genes of the carcinoembryonic antigen family in malignant and nonmalignant human tissues. *Cancer Res.* **48**, 3153-3157 (1988).
7. 高橋裕樹: 大腸癌及び大腸腺腫における carcinoembryonic antigen 及び nonspecific cross-reacting antigen の遺伝子発現. *札幌医誌* **58**, 87-98 (1989).
8. Zimmermann, W., Weber, B., Ortlieb, B., Rudert, F., Schempp, W., Fiebig, H.-H., Shively, J. E., von Kleist, S. and Thompson, J. E.: Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res.* **48**, 2550-2554 (1988).
9. Fiddes, J. C. and Goodman, H. M.: The cDNA for the β -subunit of human chorionic

- gonadotropin suggests evolution of a gene by readthrough into the 3'-untranslated region. **Nature** **286**, 684-687 (1980).
10. Glenner, G. G. and Wong, C. W.: Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **120**, 885-890 (1984).
 11. Sasaki, H., Oishi, N., Furuya, H., Yoshioka, K., Yamada, T., Ogawa, S., Wong, C. W., Glenner, G. G. and Sasaki, Y.: A *Hind*III polymorphism detected by the cDNA encoding amyloid beta protein of Alzheimer's disease. **Nucleic Acids Res.** **15**, 6309 (1987).
 12. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.** **132**, 6-13 (1983).
 13. Singer, R. H., Lawrence, J. B. and Villnave, C.: Optimization of *in situ* hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. **BioTechniques** **4**, 230-250(1986).
 14. Jensen, H., Lyngbye, J. and Davidsen, S.: Histochemical investigation of the thermostable alkaline phosphatase in the normal full-term placenta. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** **47**, 436-442 (1968).
 15. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** **18**, 5294-5299 (1979).
 16. Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. **J. Mol. Biol.** **113**, 237-251 (1977).
 17. Goldberg, D. A.: Isolation and partial characterization of *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **77**, 5794-5798 (1980).
 18. 藤田英雄, 今井浩三: 抗CEAモノクローナル抗体による免疫組織化学的研究. 札幌医誌 **53**, 535-551 (1984).
 19. Kitagawa, H., Ohkouchi, E., Fukuda, A., Imai, K. and Yachi, A.: Characterization of carcinoembryonic antigen-specific monoclonal antibodies and specific carcinoembryonic antigen assay in sera of patients. **Jpn. J. Cancer Res. (Gann)** **77**, 922-930 (1986).
 20. Langer, P. R., Waldrop, A. A. and Ward, D. C.: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**, 6633-6637 (1981).
 21. Shroyer, K. R. and Nakane, P. K.: Use of DNP-labeled cDNA for *in situ* hybridization. **J. Cell Biol.** **97**, 377a (1983).
 22. Poverenny, A. M., Podgorodnichenko, V. K., Bryksina, L. E., Monastyrskaya, G. S. and Sverdlov, E. D.: Immunochemical identification of the product of cytosine modification with bisulphite and o-methylhydroxylamine mixture. **Mol. Immunol.** **16**, 313-316 (1979).
 23. Nakane, P. K., Moriuchi, T., Koji, T., Tanno, M. and Abe, K.: *In situ* localization of mRNA using thymine-thymine dimerized cDNA. **Acta Histochem. Cytochem.** **20**, 229-243 (1987).
 24. Ahnen, D. J., Nakane, P. K. and Brown, W. R.: Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer. **Cancer** **49**, 2077-2090 (1982).
 25. Yachi, A., Imai, K., Fujita, H., Moriya, Y., Tanda, M., Endo, T., Tsujisaki, M. and Kawaharada, M.: Immunohistochemical distribution of the antigenic determinants detected by monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. **J. Immunol.** **132**, 2998-3004 (1984).
 26. Hinoda, Y., Neumaier, M., Hefta, S. A., Drzeniek, Z., Wagener, C., Shively, L., Hefta, L. J. F., Shively, J. E. and Paxton, R. J.: Molecular cloning of a cDNA coding biliary glycoprotein I: primary structure of a glycoprotein immunologically crossreactive with carcinoembryonic antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85**, 6959-6963 (1988).
 27. Oikawa, S., Inuzuka, C., Kosaki, G. and Nakazato, H.: Exon-intron organization of a gene for pregnancy-specific β_1 -glycoprotein, a subfamily member of CEA family: implications for its characteristic repetitive domains and C-terminal sequences. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **156**, 68-77 (1988).
 28. 林 同輔, 堀見忠司, 岡林孝弘, 田中 出, 三宅規之, 平川恵一, 八木孝仁, 折田薫三: *In situ* hybridization 法における組織内 mRNA の試料採取後固定までの時間的変化に関する研究. 医学のあゆみ **151**, 623-624 (1989).
 29. Coates, P. J., Hall, P. A., Butler, M. G. and D'Ardenne, A. J.: Rapid technique of DNA-DNA *in situ* hybridization on formalin fixed tissue sections using microwave irradiation. **J. Clin. Pathol.** **40**, 865-869 (1987).

30. Benichou, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K. and Stanners, C. P.: Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* **57**, 327-334 (1989).
31. Morson, B. C. and Dawson, I. M. P.: Gastrointestinal pathology. Blackwell scientific publications. Oxford (1972).
32. 中村恭一, 渋谷 進, 西沢 護, 牧野哲也: 大腸癌の組織発生とその早期における発育過程. *胃と腸* **20**, 877-888 (1985).
33. Otsuru, A., Nagataki, S., Koji, T. and Tamaoki, T.: Analysis of alpha-fetoprotein gene expression in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis by *in situ* hybridization. *Cancer* **62**, 1105-1112 (1988).

別刷請求先

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 伊藤 淳