

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08701

研究課題名(和文) 腺管分離法を用いたSNP arrayによる胆道癌のゲノムコピー数解析

研究課題名(英文) Copy number alterations in biliary tract cancer using crypt isolation technique

研究代表者

塩井 義裕 (Shioi, Yoshihiro)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00714346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌36例について、コピー数異常をSNPアレイを用いてGain, LOH, Copy-neutral LOHに分類し、臨床病理学的特徴との関連を検討した。胆嚢癌と胆管癌の比較においては、胆管癌でLOHが有意に多く見られた。コピー数異常に基づき階層的クラスター解析を行ったところ、2群に分かれた。subgroup間で有意なCNA変化を示すlocusは、全体で233箇所有意な差がみられ、Gainで195箇所、LOHで35箇所、CN-LOHで3箇所有意なCNA変化がみられた。これらのゲノムワイドな遺伝子座変化の検出は、胆道癌の発症や進行に関わる新規遺伝子の特定に寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道癌は我が国での罹患率は欧米より高く、癌による死因の第6位を占める予後不良な疾患である。しかし、胆道癌は比較的稀な疾患で、有効な治療法が限られている。今回、我々は胆道癌のコピー数異常に着目し、SNPアレイを用いてコピー数異常を検索し、臨床病理学的特徴との関連を検討した。胆道癌のコピー数異常に基づき階層的クラスター解析を行ったところ2グループに分かれ、有意な変化を示す遺伝子座を特定した。胆道癌における病態解明は、臨床病理学的因子に加えて分子病理学的因子も必要であり、ゲノムワイドな観点から癌の発生・進展の機序をさらに解明していくことが必要である。

研究成果の概要(英文)：We performed a comprehensive examination of Copy number alterations (CNAs) using isolated tumor glands obtained from biliary tract cancer. Our findings illustrate the unique molecular profile that characterizes the behavior of biliary tract cancer. In addition, candidate chromosomal alterations obtained from our results should be confirmed to determine whether such alterations may be useful as novel molecular markers.

研究分野：胆道癌

キーワード：胆道癌 SNP コピー数異常

1. 研究開始当初の背景

我が国における胆管癌による死亡数は 18,117 人 (2014 年) で、癌による死因の第 6 位を占める難治性癌である。比較的稀な悪性腫瘍ではあるが、わが国の罹患率は東アジア、チリとともに欧米に比べて高い。胆道癌は、化学療法や放射線治療では十分な治療成績は得られず、切除手術のみが根治を期待できる予後不良な疾患である。したがって、胆道癌の診療においては早期診断と治療成績の向上が急務であり、そのためには胆道癌の発生機序を明らかにすることが重要である。

染色体レベルでゲノムワイドに発生している異常として、2004 年に Iafrate¹⁾により報告されたコピー数異常 copy number variation (CNV) がある。CNV は、single nucleotide polymorphism (SNP) とならび、疾患感受性や薬剤応答性などの様々な個人間の差異を引き起こす一因と考えられている。一方、腫瘍における体細胞変異としてのコピー数変化を copy number alteration (CNA) と呼び、通常 2 コピーある遺伝子のコピー数が増加 (Gain) や減少 (Loss of heterozygosity [LOH]) することで発癌に密接に関与する。

Saeki らは、食道癌で、*TP53* 遺伝子座において LOH ではなく Copy-neutral LOH (CN-LOH、コピー数の変化を伴わないヘテロ接合性の消失) が高頻度に認められることを報告し、これが発癌の重要なメカニズムであることを示唆した²⁾。がんにおける CNA 解析では、2000 年代にアレイ CGH 法が実用化され、ゲノム全体から CNA を含む微細な染色体異常を検出できるようになったが、CN-LOH は検出できなかった。近年 SNP array を用いることでコピー数の増減だけでなく、CN-LOH を含めた CNA 解析が可能になった。

岩手医科大学病理診断学講座では、消化器癌の分子解析を継続して行ってきたが、近年では消化器癌のゲノム不安定性に焦点をあて、SNP array を用いた CNA 解析を行っている。高橋らは大腸癌の CNA 解析を行い、マイクロサテライト安定性の左側大腸癌では Gain が多くみられるものの LOH は少なく、マイクロサテライト安定性の左側大腸癌と右側大腸癌では異なる分子機序を持つことを明らかにした³⁾。また、荒川らは早期胃癌と進行胃癌の CNA を比較して、Gain、LOH の頻度の高い領域は異なること、また CN-LOH は進行癌で有意に増加していることから、コピー数異常が胃癌の進展に関与していることを示した⁴⁾。

本研究の仮説として、胆道癌においても、臨床病期や占拠部位 (肝外胆管癌・胆嚢癌・乳頭部癌) がコピー数異常と密接に関わっていることが推測されるため、本研究では、胆道癌におけるコピー数異常状態を明らかにするべく、SNP array を用いて CNA 解析を行うこととした。将来的にはターゲット領域を絞り込んだ上で胆道癌の診断治療へと応用する。

2. 研究の目的

1) 染色体レベルでゲノムワイドに生じているコピー数異常 Copy Number Alteration (CNA) の解析を行い、胆道癌におけるコピー数異常状態を明らかにする。

2) さらに胆道癌のコピー数異常と臨床病理学的特徴との関連を検討し、胆道癌の発がん過程を検証する。

3. 研究の方法

1. 申請施設およびその関連病院で手術を施行した肝外胆道癌の手術標本からサンプルを採取し、腺管分離法⁵⁾を用いて腫瘍腺管及び胆道上皮腺管を分離・採取して DNA を抽出する。
2. 実体顕微鏡下で分離腺管を回収し分離腺管を2つに分け、1つは分離腺管の形態像を調べるためにパラフィン包埋腺管ブロックを作製し、もう1つは DNA を抽出する。
3. SNP array (CytoScan 750K^R, Affimetrix)で CNA を検出し、Chromosome Analysis Suite(ChAS) Software (Affimetrix)を用いて解析する。CNA を Gain, LOH, CN-LOH に分類し、これらを示す染色体の遺伝子座の頻度を検索する。
5. 上記の分子異常と臨床病理学的因子(部位, TNM 分類)や予後との関連について検討する。

4. 研究成果

胆道癌の手術材料から分離腺管を採取して DNA を抽出し、CytoScan 750K^R (Affimetrix) を用いて胆道癌のコピー数解析を行った。肝外胆管癌 25 例と胆嚢癌 11 例について解析した統計ソフトは JMPpro13 を使用し、頻度の比較は Fisher's exact test、連続値の比較は Mann-Whitney's U test を使用した。有意水準は 0.05 とし、多重解析の補正には Benjamini-Hochberg FDR 法を用いた。

1. 胆管癌と胆嚢癌の CNA がみられた遺伝子座数の比較

胆管癌と胆嚢癌で CNA がみられた遺伝子座数を比較すると、CNA がみられる総遺伝子座数は、胆管癌に有意に多く見られ ($p=0.0371$)、Gain, LOH, CN-LOH 別では、LOH は胆管癌に有意に多くみられ ($p=0.0175$)、Gain および CN-LOH では両群間に有意差は見られなかった。

胆管癌と胆嚢癌間で有意な CNA 変化を示す遺伝子座数は 2 か所みられ、その部位は 7q21.3, 7q22.1 の Gain であった。

2. 胆道癌 36 例についての層別化解析

胆管癌 (25 例) と胆嚢癌 (11 例) を含めた胆道癌 36 例について、コピー数異常に基づき階層的クラスタ解析を行ったところ、2 群に分かれた。

1) subgroup 2 に対し、subgroup 1 では有意に胆嚢癌が多い結果であった。 ($p=0.0027$)

subgroup 1 と subgroup 2 の比較において CNA がみられる総遺伝子座数は Subgroup2 で有意に多くみられた。 ($p<0.0001$) Gain および LOH は、subgroup 2 で有意に多くみられた。 (それぞれ $p<0.0001$, $p<0.0001$) CN-LOH において有意差は見られなかった。

2) subgroup 間で有意な CNA 変化を示す locus 数

2 つの subgroup 間で有意な CNA 変化を示す locus 数を検索した。233 箇所有意な差がみられ、Gain が 195 箇所、LOH が 35 箇所、CN-LOH が 3 箇所有意な CNA 変化がみられた。

胆道癌では分子標的になりうるいくつかの遺伝子変異が発症の部位との相関も含めて報告されており、今後のそれぞれの遺伝子変異や pathway に対する分子標的治療薬の有効性の評価が待望されている。胆道癌の微小環境のさまざまな関連細胞を含む発がん機構の解明されており、胆管癌では KRAS や TP53 といった共通の変異に加え、比較的頻度が高い actionable な変異が報告されており、また肝外胆管癌や胆嚢癌では ERBB2 もしくは カテニンの変異が起きやすいことが報告されている。加えて、MARK や PI3K/AKT/mTOR pathway などのように治療法選択につながる可能性がある変異も報告されており、今後のがんゲノム医療への応用が期待されている⁶⁾。

岩手医科大学病理学講座では、胃癌や大腸癌などの領域で、SNP array を用いた CNA 解析を行い、その発癌機構について解明を進めてきた。分化型胃癌においては、早期から染色体の gain が出現し、癌の進行に従い染色体異常が蓄積することが示唆され⁴⁾、また大腸腫瘍においては、CNA は初期のプログレッションについて重要な役割を担っていることが示唆されている⁷⁾。今回、我々は胆道癌の発癌過程においても、コピー数変化が関与しているのではないかと推測し、胆道癌の臨床病理学的因子とコピー数変化について比較検討した。

胆管癌と胆嚢癌のコピー数を比較したが、総コピー数異常は胆管癌に多くみられ、その中でも LOH が多かった。当教室では胃癌や大腸癌において、コピー数異常の頻度や遺伝子座ごとの比較を報告しているが^{8, 9)}、今回は胆道癌でこれを行った。

胆管癌と胆嚢癌の両者を階層的クラスタ解析により層別化を行うと、コピー数異常の多い群と少ない群に層別化され、胆道癌の発生にはコピー数異常が関与するものと関与しないものがあり、そのコピー数異常は Gain と LOH が主であった。当教室の研究では、胃癌の進行には CN-LOH が関与することが示されたが⁴⁾、胆道癌では CN-LOH の関与が見られない結果であった。また、コピー数異常の多い群は胆管癌からなり、少ない群の主体は胆嚢癌であったが、胆管癌であっても胆嚢癌同様コピー数異常が少ない症例があり、この差が何らかの臨床病理学的意義をもつのか検討が必要である。

胆道癌における病態解明は、臨床病理学的因子に加えて分子病理学的因子も必要であり、ゲノムワイドな観点から癌の発生・進展の機序をさらに解明していくことが必要と考えられた。

参考文献

- 1) Iafrate AJ, et al. Nat Genet. 2004;36:949-51.
- 2) Saeki H, et al. Clin Cancer Res. 2011;17:1731-40.
- 3) Takahashi Y, et al. Int J Cancer. 2016;139:2493-2501.
- 4) Arakawa N, et al. Mol Carcinog. 2017;56:527-537.
- 5) Nakamura S, et al. Gastroenterology 1994;106: 100-107.
- 6) 永瀬浩喜. 胆と膵 2018 ; 39 : 299-304.

- 7) Eizuka M, et al. *J Gastroenterol.* 2017;52:1158-1168.
- 8) Sugai T, et al. *Gastric cancer.* 2018;21:765-775.
- 9) Sugai T, et al. *Mol Carcinog.* 2017;57:451-461.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugai Tamotsu, Takahashi Yayoi, Eizuka Makoto, Sugimoto Ryo, Fujita Yasuko, Habano Wataru, Otsuka Kouki, Sasaki Akira, Yamamoto Eiichiro, Matsumoto Takayuki, Suzuki Hiromu	4. 巻 57
2. 論文標題 Molecular profiling and genome-wide analysis based on somatic copy number alterations in advanced colorectal cancers	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 451 ~ 461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.22769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugai Tamotsu, Eizuka Makoto, Arakawa Noriyuki, Osakabe Mitsumasa, Habano Wataru, Fujita Yasuko, Yamamoto Eiichiro, Yamano Hiroo, Endoh Masaki, Matsumoto Takayuki, Suzuki Hiromu	4. 巻 21
2. 論文標題 Molecular profiling and comprehensive genome-wide analysis of somatic copy number alterations in gastric intramucosal neoplasias based on microsatellite status	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 765 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-018-0810-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugai Tamotsu, Eizuka Makoto, Habano Wataru, Fujita Yasuko, Sato Ayaka, Sugimoto Ryo, Otsuka Kouki, Yamamoto Eiichiro, Matsumoto Takayuki, Suzuki Hiromu	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive molecular analysis based on somatic copy number alterations in intramucosal colorectal neoplasias and early invasive colorectal cancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 22895 ~ 22906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuyukubo Takashi, Ishida Kazuyuki, Osakabe Mitsumasa, Shiomi Ei, Kato Renpei, Takata Ryo, Obara Wataru, Sugai Tamotsu	4. 巻 59
2. 論文標題 Comprehensive analysis of somatic copy number alterations in clear cell renal cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 412 ~ 424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.23164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 永塚真、石田和之、菅井有、ほか	4. 巻 53
2. 論文標題 【早期胃癌2018】 胃癌遺伝子検査の現状と未来	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 胃と腸	6. 最初と最後の頁 783-788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅井 有 (Sugai Tamotsu) (20187628)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	
研究分担者	石田 和之 (Ishida Kazuyuki) (40444004)	岩手医科大学・医学部・准教授 (31201)	