

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590751

研究課題名（和文） 包括的ゲノム解析による膵癌の抗癌剤感受性、高危険群の検討

研究課題名（英文） Identification of Genomic Locus Related to Sensitivity Against Anticancer Drug and Predisposition of Pancreatic Cancer Using Comprehensive Analysis

研究代表者

笹平 直樹（SASAHIRA NAOKI）

東京大学医学部附属病院・助教

研究者番号：30401102

研究成果の概要（和文）：高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて膵癌細胞株 25 種類のゲノム異常の網羅的解析を行った。新規の欠失および増幅領域を 8 領域ずつ見出すことが可能であり、膵癌手術検体を用いた解析でも、同様の異常を認めることを確認し、報告した。一方で、薬剤の代謝に関わる多型であるチトクローム 450 の一塩基多型を膵癌および胆道癌で解析した。近年、抗血小板薬やプロトンポンプ阻害剤の代謝に関わる CYP2C19 の多型が胆道癌の発癌に有意に関わることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed genome-wide copy number alterations and loss of heterozygosity (LOH) in 25 established pancreatic cancer cell lines using a high-density single nucleotide polymorphism (SNP) array and found eight amplified regions and eight deleted regions in at least 2 cell lines. We then examined representative genes at the eight amplified loci in matched pairs of pancreatic cancer and normal tissues. The amplification was detected in 1 (7.1%) to 5 (35.7%) of 14 microdissected tissue specimens.

Then we analyzed the relationship between SNP of cytochrome P450 and the susceptibility of pancreatic cancer. Genetic polymorphism of CYP2C19 was associated with the susceptibility to pancreatic cancer, but it was not significant statistically. In the case of bile duct cancer, it was proved to be significant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1950,000
2008 年度	300,000	270,000	570,000
2009 年度	1,500,000	270,000	1770,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵臓病学・高密度 SNP アレイ

1. 研究開始当初の背景
膵癌で死亡する患者の数は我が国では増加

傾向にあり、2003 年には 21,148 人が膵癌で死亡している。膵癌は現在、我が国の癌によ

る死因の 6.8%を占めており、肺癌、胃癌、大腸癌、肝癌に次いで第 5 位である。2003 年に発表された膵臓学会の集計によると、膵癌の 5 年生存率は全体で 4.9%、切除例では 13.5%に対してそれ以外では 0.6%。stage I の切除例の 5 年生存率が 58.6%であったのに対し stageIVb の切除例では 2.8%であった。膵癌患者に対し早期に診断して手術することが現時点では最善の方策であることを示している。

膵臓癌の早期診断のためには、高リスク群の囲い込みが必須であるが、その因子は明らかとなっていない。膵癌の 10%は遺伝性(家族性)であるものの、家族性あるいは遺伝性に膵臓癌を発生させる因子についてはほとんど知られていない。

一方、膵癌において高頻度の異常が報告されているのは癌遺伝子で *KRAS*、癌抑制遺伝子で *p16*、*p53*、*SMAD4* などであるが、そのほかにも膵癌においては特定の染色体領域の欠失や増幅が認められる。癌抑制遺伝子に異常が起これば癌抑制遺伝子の機能が完全に不活性化されることによって発癌過程を進む。欠失と小さな構造異常の組み合わせによる不活性が最も高頻度にみられており、*SMAD4* もこのような機序で機能が不活性化される遺伝子である。このような状態では、片方のアレルが消失した LOH の状態になっている。これらの異常が蓄積することが発癌に深く関わっていると考えられる。

これらの遺伝子異常は、いずれも体性変異であり、遺伝子多型との関連は報告されていない。また抗癌剤の感受性との関連も報告されていない。新たな膵癌における遺伝子異常をみつけ、遺伝子多型との関連を調べることは新たな高リスク群の発見に有用であり、また、抗癌剤の感受性との関連を調べることも有用であると考えられた。

2. 研究の目的

高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて、膵癌における新たな増幅、欠失などの遺伝子異常を見出す。さらに、これらの遺伝子異常と関連する遺伝子多型や抗癌剤の感受性に関して検討する。

3. 研究の方法

Affymetrix 社の GeneChip Human Mapping 100k Set アレイでは、SNPs 判定に用いたプローブのシグナル強度とデータ解析ソフトとして CNAG を使用することで、従来の CGH array 等 (1 Mb 程度) より高解像度で、より小さい増幅、欠失領域の検出が可能であり、さらに、SNP call の有無で LOH の有無が判定できる。膵癌細胞株ゲノム DNA を抽出し、100 k または 500 k chip を用いて、共通の遺伝子増幅および欠失領域や LOH の有無を網羅的に

解析する。

本解析システムの特徴は、

- 1) SNPs 判定に用いたプローブのシグナル強度を用いてゲノムのコピー数を計測
- 2) 実験間誤差の補正により高いシグナル/ノイズ比を実現。
- 3) 正常自己対照の無い場合でも、reference の選択を最適化することにより、コピー数の変化と LOH の有無を調べることが可能

があげられる。

この方法を用いて見出した増幅、欠失に関して、膵癌の手術検体から抽出した DNA を用いて、臨床検体でも増幅などの遺伝子異常を認めるか確認する。

また、新たな遺伝子異常に関して、これと関連する領域を含めた遺伝子多型や抗癌剤感受性との関連を検索する。

4. 研究成果

高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて膵癌細胞株 25 種類のゲノム異常の網羅的解析を行った。この方法を用いることで、既知の癌抑制遺伝子である p16 の欠失 (図 1)、癌遺伝子である *KRAS* の増幅を確認することができた (図 2)。

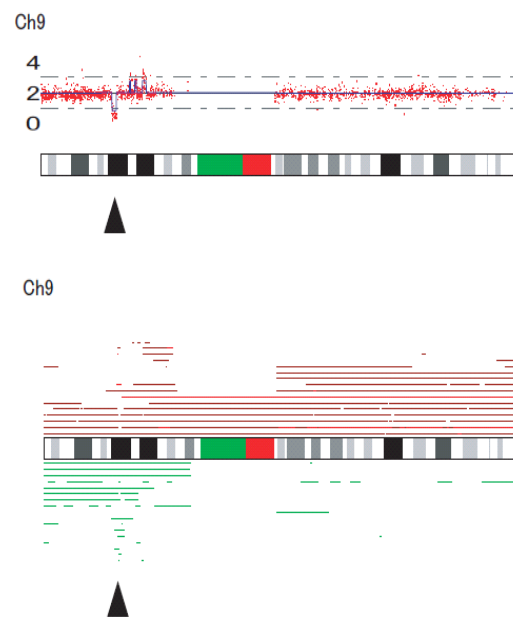


図 1 膵癌細胞株における 9 番染色体のコピー数変化、矢頭は p16 が局在する領域を示す。上図は、細胞株 SU8686 の結果、下図は、25 種類の細胞株をまとめて表示した integral view による解析結果。SU8686 で、p16 が局在する領域に小さな欠失を認め、そのほかの多くの細胞株でも緑色で示された欠失を認めることがわかる。

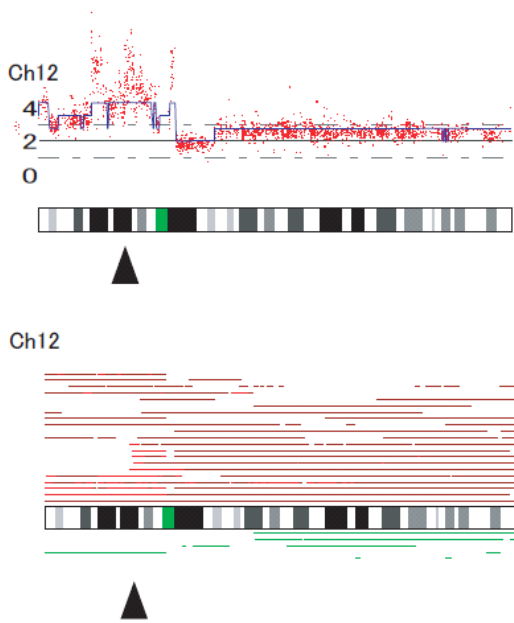


図2 膵癌細胞株における12番染色体のコピー数変化、矢頭はKRASが局在する領域を示す。

図1と同様に、上図は、細胞株SU8686の結果、下図は、25種類の細胞株をまとめて表示したintegral viewによる解析結果。SU8686で、KRASが局在する領域に高度増幅を認め、そのほかの多くの細胞株でも赤線で示された増幅を認めることがわかる。

さらに、新規のホモ欠失および増幅領域を8領域ずつ見出すことが可能であった。ホモ欠失領域では、一つの領域に平均1.42個の遺伝子があり、最小領域は6kbであった。増幅領域では、一つの領域には平均4.87遺伝子があり、最小領域は146kbであった。LOHは9p, 18q, 17p, 8p, 13q, 6q, 3p, 6p, 22q, 9qと12qにおいて50%以上の細胞株に認めた(図3)。頻度の高い9p, 18q, 17p, 13qには、それぞれ膵発癌における腫瘍抑制遺伝子であるp16, SMAD4, p53, RB1が局在しており、この解析の有用性が示唆される。

この新規に増幅および欠失あるいはLOHを認めた領域に関して、膵癌手術検体を用いた解析を行った。レーザーマイクロダイセクションを用いて、腫瘍部、非腫瘍部のDNAを抽出し、定量的PCR、マイクロサテライトマーカーを用いたLOH解析を行うことで、臨床検体でも、同様の異常を認めることを確認し、報告した。しかし、これら新規の遺伝子異常は遺伝子多型や抗癌剤感受性との関連は認めなかった。

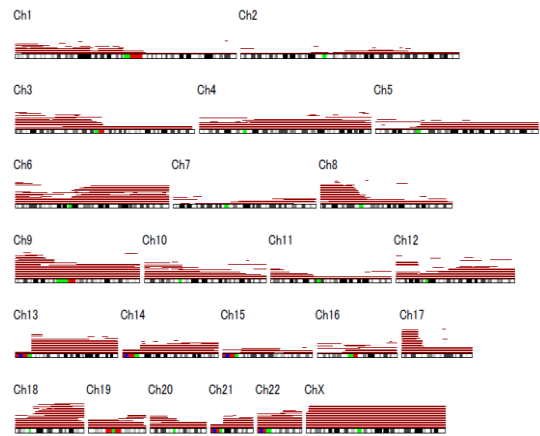


図3 膵癌細胞株25種類のLOH解析、赤線1本がその領域にLOHを認める細胞株1種類を示す。9p, 18q, 17p, 8p, 13q, 6q, 3p, 6p, 22q, 9qと12qにおいて50%以上の細胞株にLOHを認めた。

一方で、薬剤の代謝に関わる多型であるチトクローム450のSNPを膵癌および胆道癌で解析した。近年、抗血小板薬やプロトンポンプ阻害剤の代謝に関わるCYP2C19のSNPが胆道癌の発癌に有意に関わることがわかった。しかし、膵癌では関連がある傾向を認めたが、有意差は認めなかった。われわれは以前より、膵癌および胆道癌の高危険群の効率的な囲い込みを目指してきた。本研究により、臨床情報だけでなく、遺伝学的要素を組み込むことによりさらに精度の高い囲みこみを行っていきけ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5件)

①林連捷、浅岡良成、笹平直樹、多田稔ほか、Integrated analysis of copy number alterations and loss of heterozygosity in human pancreatic cancer using a high-resolution single nucleotide polymorphism array, *Oncology*、査読有、75巻、2008、102-112

②多田稔、膵検体による遺伝子診断、*医学のあゆみ*、査読無、222巻、2007年、51-53

③笹平直樹、多田稔ほか、膵発癌関連因子、*肝胆膵*、査読無、58巻、2009、531-539

④浅岡良成、多田稔ほか、膵癌における遺伝子増幅、LOH:高密度SNPアレイを用いた解析、*肝胆膵*、査読無、59巻、2009、1263-1269

⑤笹平直樹、多田稔ほか、Risk of pancreatic cancer in calcified chronic pancreatitis, *J Gastroenterol*、査読有、in press

〔学会発表〕(計 6 件)

- ①浅岡良成ほか、高密度 SNP アレイを用いた膵癌における遺伝子異常の網羅的解析、第 38 回日本膵臓学会大会、2007 年 6 月 28 日、福岡
- ②浅岡良成ほか、高密度 SNP アレイを用いた膵癌における遺伝子異常の網羅的解析、第 50 回日本消化器病学会大会、2008 年 10 月 1 日、東京
- ③磯村好洋、多田稔ほか、A genetic polymorphism of CYP2C19 is associated with the susceptibility to bile duct cancer. アメリカ消化器病学会 2009、2009 年 6 月 1 日、シカゴ
- ④笹平直樹、多田稔ほか、慢性膵炎からの発癌とその特徴、第 95 回日本消化器病学会総会、2009 年 5 月 8 日、札幌
- ⑤伊地知秀明、多田稔ほか、膵特異的遺伝子改変マウス膵発癌モデルを用いた膵癌の新規分子標的治療の検討、第 40 回日本膵臓学会、2009 年 7 月 30 日、東京
- ⑥笹平直樹、多田稔ほか、Risk of pancreatic cancer in calcified chronic pancreatitis. ヨーロッパ消化器病学会 2009、2009 年 11 月 24 日、ロンドン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹平 直樹 (SASAHIRA NAOKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30401102

(2) 研究分担者

多田 稔 (TADA MINORU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80302719

浅岡 良成 (ASAOKA YOSHINARI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90431585