

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19591939

研究課題名（和文）子宮体癌特異的発現遺伝子による分子診断

研究課題名（英文） Gene expression profiles in endometrial carcinoma

研究代表者

西川 博 (NISHIKAWA HIROSHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00347410

研究成果の概要（和文）：子宮体癌・正常子宮内膜の新鮮凍結標本を用い、組織から抽出した RNA を使用し、改良型 Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)法によって、遺伝子発現プロファイルを作製した。この遺伝子発現プロファイルの解析により、子宮体癌と正常子宮内膜の組織間で発現量に大きな差のある遺伝子配列を確認した。不適當なものを除いた候補遺伝子から、RT-PCR 法により、mRNA の発現量を比較した。多検体の検索により候補遺伝子を絞り込むことができた。この中に、子宮体癌に特異的に発現する遺伝子が含まれ、これらによる分子診断が可能になる。

研究成果の概要（英文）：The gene expression profiles of human endometrial carcinoma were analysed by serial of gene expression (SAGE) which allows quantitative and simultaneous analysis of a large number of transcripts. More than 22000 transcripts derived from a normal endometrial tissue and endometrial carcinoma tissue were analysed. While extensive similarity was noted between the expression profiles of the normal endometrial tissue and endometrial carcinoma tissue, many transcripts, such as B-factor properdin, uridine phosphorylase, and cyclin G1 interacting protein, were expressed at extremely different levels in differentiated and undifferentiated carcinoma. These data provide new information that might be used to identify genes useful for the diagnosis and treatment of endometrial carcinoma.

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	1,950,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：婦人科腫瘍学、子宮体癌、分子診断、プロファイル

1. 研究開始当初の背景

子宮体癌は以前子宮癌のうち約 10%を占めるにすぎなかったが、近年増加傾向にあり、開腹手術の必要な浸潤癌では子宮癌全体の約 50%を占めるようになった。増加の原因は不明であるが、晩婚化や分娩数の減少、食生活の欧米化が原因と考えられている。子宮体癌のスクリーニングとして広く普及している方法は、子宮内膜細胞診であるが、手技にある程度の熟練が必要で、また子宮体癌の検出率は十分でない。特に若年者に多い高分化型腺癌や初期癌での検出率が悪く、検査を繰り返し施行することが多い。また、確定診断として用いられる子宮内膜組織診でも、十分な腫瘍組織が得られない場合や、壊死などで変性が著しい場合では、診断に苦慮することがあり、産婦人科領域では問題になっている。今後も晩婚化や少子化、食生活の欧米化に伴い子宮体癌の発生頻度は増加すると考えられ、より正確で迅速な検査・診断法の確立が必要となる。子宮体癌の発生に関わる分子を使用した分子診断により、より初期の段階や組織診では不相当と判断される組織での診断が可能になると考えられている。しかし、子宮体癌の発生機序は解明されておらず、これまでも、いくつかの子宮体癌特異的発現遺伝子は発表されているが、子宮体癌の分子診断に使用できる特異的発現遺伝子は、未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

分子技術における最近の進歩は、より効率的で効果的な分子ベースの診断と治療への可能性を認める。したがって、癌の分子診断、遺伝子治療を開発する上で癌細胞に特異的に発現している mRNA を検出することは重要

な課程である。子宮体癌でもこれまでの多くの研究で MLH1, MSH2, PTEN, K-ras, BRCA1 などの発現が報告されているが、子宮体癌の分子診断や治療に使用できる分子は未だに明らかにされていない。我々は、Serial Analysis of Gene Expression (SAGE 法) の改良法により、子宮体癌で発現している mRNA の発現量プロファイルを作成し、また正常子宮内膜組織でも同様の mRNA の発現量プロファイルを作成し、両者のプロファイル間で発現量に差がある遺伝子を同定することを試みる。その後、その結果を元にしてそれぞれに対するプライマーを作成し、real-time quantitative PCR により数検体での 2 次スクリーニングを行う。この結果で明らかに差が確認された遺伝子について、さらに多検体で 3 次スクリーニングを行い、子宮体癌の特異的発現遺伝子を判明し、その遺伝子が子宮体癌の原因となっていること、またその遺伝子を使用した子宮体癌の分子診断法の確立をめざす。

3. 研究の方法

(1) SAGE 法による子宮体癌、正常子宮内膜の遺伝子発現プロファイルの作製

46 歳患者の子宮体癌組織 (類内膜腺癌, G1)、43 歳患者の正常子宮内膜の組織標本を、患者の同意のもと開腹手術時に摘出保存し、新鮮凍結標本とした。これらの標本それぞれより mRNA を抽出し、改良型 SAGE 法を用いて mRNA を各 10000 個以上解析し、発現頻度を示す遺伝子発現プロファイルを作製した。従来の SAGE 法では、各 mRNA から 14bp の配列の情報しか得られなかったが、この改良法では 4bp 長い 18bp の長さを持った遺伝子配列の出現頻度のリストが作

製できることにより、2次スクリーニングをより正確に行うことを可能にした。

(2) 遺伝子発現プロファイルの比較

mRNA は一つずつ解析され、入力された後コンピュータ解析を行った。子宮体癌、正常子宮内膜組織、それぞれの遺伝子発現プロファイルを作成した。両者の遺伝子発現プロファイルを比較し、2つの組織間で発現量に大きな差のある遺伝子配列を拾い上げた。この発現遺伝子の表現する遺伝子産物を検索し、不適当なものは削除した。

(3) プライマーの作成と2次スクリーニング

18bp の情報を元に 5'プライマーを作成した。これと 3'プライマーを Poly A アンカープライマーとし、候補遺伝子 32 個のそれぞれに対し、SYBR Green の蛍光をモニターすることで子宮体癌、正常子宮内膜それぞれ 5 検体組織からの mRNA を用いて real-time quantitative RT-PCR を行い、SAGE で検出された発現量の差の再現性を確認し、2次スクリーニングとした。

(4) 3次スクリーニング

2次スクリーニングで明らかな差が確認された候補遺伝子について、TaqMan プローブ、プライマーを作成した。RT-PCR によりさらに多検体による3次スクリーニングを実施した。子宮体癌（類内膜腺癌、特殊型）、および正常子宮内膜組織（月経周期により4期）、子宮内膜増殖症に分別し、3次スクリーニングを行った。

4. 研究成果

改良型 SAGE 法により子宮体癌、正常子宮内膜の組織より mRNA を合計 23145 個解析した。コンピュータ解析によりそれぞれの組織の遺伝子プロファイルを作成した。両者の比較により、子宮体癌、正常子宮内膜組織間で 10 倍以上の大きな差のある遺伝子 66 個を候補

遺伝子とした。(表 1)

表 1 プロファイル比較

No.	Ratio	E.Ca.	Normal	Sequence	No.	Ratio	E.Ca.	Normal	Sequence
1	237	711	3	TGGCCGCCATGAGG	34	16	16	0	AATCCACTTCCGC
2	102	102	0	CTGCTCAGGCCGA	35	15	15	0	TGGGAGCTGTGTG
3	30	90	0	TGGCCGCCATGAGA	36	15	15	0	TAGGACTGCCGCC
4	83	166	2	TGGGGCCCTGTGTGG	37	15	15	0	CNCTCCAAACTCAT
5	50	50	1	CAGGCAGCAGCTCC	38	14	14	0	CTGTCTGTGTGGGG
6	40	40	0	CCTGTGCTCAACCA	39	14	14	0	CAGAGCAGTGACAG
7	37	326	14	CTGCTGCTGGGGCT	40	13	13	0	TGCCGCTGTGTGT
8	34	34	0	CCAGCTGATCCCAAC	41	13	13	0	TGAGGCTCCCAAG
9	33	33	0	CGCGCTCAAGCCCTG	42	13	13	0	CTCCCGCCCACTG
10	30	30	0	CAGCTGAGCCCGCT	43	13	13	0	AAACCTGACCTGA
11	29	29	0	TGCCCTCTGTGGG	44	12	12	0	TGGGAGAGTGCCCT
12	24	24	1	TGACAACCTCAGCT	45	12	12	0	TGAACGCCACCTCA
13	23	23	0	ACACCGCCCGTCAAC	46	12	12	0	CCGAGCCCATGCC
14	22	22	0	CCATGCCCCCTGCC	47	12	49	4	CAGACGCTTCTCT
15	21	21	1	TGCCCCCGTCTCAT	48	12	12	0	AAAGAGTCTTGGC
16	20	20	0	CGACTGTAGCCCT	49	11	11	0	TGGGCTGTGTGTGA
17	19	19	0	CTGTGAGAGCTGTGC	50	11	11	0	TGGTGTGCTATGAG
18	19	19	0	TATTAAGTCACTA	51	11	11	0	TGAGTCCAGTGGC
19	19	19	0	CCAGCTGTGTGGCT	52	11	11	1	TAGTGTCTCTTCA
20	19	19	0	CAGCAGAGCCCGCA	53	11	11	0	TACCTCAGTCTCCA
21	18	18	0	TGCACTGTGTGGCTG	54	11	11	0	TGGGAGAGCTCTT
22	18	18	0	CTGTGCTGTGTGGGC	55	11	11	0	CTCTCTCTGGAACG
23	18	18	0	GGGCTGTGTGTGATG	56	11	11	0	CNTCCAGAGCTTAC
24	18	18	0	CTCCAGCTGTGTGCA	57	11	11	0	CAGCGATCATGGA
25	17	17	0	TTTCCCGAGAGGGCT	58	11	11	0	ACTGATTCAGACC
26	17	17	0	TGCTGTGTGTGGGC	59	11	22	2	AGCTTCTCACTCA
27	17	17	1	CTCCAGCTGTGAGG	60	10	10	0	TGGGCTTGTGTGTG
28	17	359	35	AGGCAGTGAAGG	61	10	10	0	TGGGAGCTCTGTT
29	17	17	0	CAGCTCTCAGGCTC	62	10	30	3	TACAGCCGCTTGGC
30	16	16	0	GCCTCATCCCTGCA	63	10	10	0	GCACTCTGTAAGGG
31	16	16	0	CTAGCCGCTTCCGG	64	10	10	0	CCACAATGCGCAG
32	16	16	0	CCCTTCCCTCTTCA	65	10	10	0	AGCTTCTCACTTCA
33	16	16	0	CACACTCTCTCCCT	66	10	10	0	AGCTCACTGAGGCT

各組織のプロファイル比較による候補遺伝子の表現される遺伝子産物を検索した。これらの検索はインターネットによるデータベースへのアクセスで可能となった。各プロファイル比較で差異のある候補遺伝子の表現する産物は、多くのものがミトコンドリアやリボゾーム蛋白質を示していた。このような不要なものや未知の遺伝子をリストから除外した。残った 32 個の候補遺伝子に対して、2次スクリーニング用のプローブを作成した。(表 2)

No.	Sequence	name
1	CTGCTCAGCCCGA	Homo sapiens B-factor, properdin (BPF)
2	TGGGGCCTCTGTGG	Homo sapiens cargo selection protein
3	CAGCGAGCAGCTCC	Homo sapiens keratinocytes associated protein 2 (KCP2)
4	CCATGTCCTCTGCG	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10350 (FLJ10350)
5	TGCTCCCTGCTCAT	Homo sapiens splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa (SF3A2)
6	CGATCTGAGCCCT	Homo sapiens ucnr1, transmembrane (UCN1)
7	TATTTAACTGACTA	Homo sapiens tumor rejection antigen (gp96) 1 (TRA1)
8	CCACCCCTGCTGGCC	Homo sapiens collagen, type VI, alpha 2 (COL6A2)
9	CAGCAGAGCCCGCA	Homo sapiens uridine phosphorylase (UP)
10	TGCCTGTGCGCTG	Homo sapiens cyclin G1 interacting protein (CG1)
11	CCCCACCTGCGCCA	Homo sapiens homolog of yeast MAF1 (MAF1)
12	TTCCCGAGAGGGT	Homo sapiens similar to Cysteine-rich protein 1 (CRP1)
13	CCCCACCTGCGCCA	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3
14	CAGCTCTCAGCTCC	Homo sapiens prohibitin (PHB)
15	CTAGCGCTTCCCG	Human rRNA primary transcript internal transcribed spacer 1 (ITS1)
16	CCCCACCTGCGCCA	Homo sapiens LOC348323 (LOC348323)
17	TAGGACTGAGCCGC	Homo sapiens mRNA for FLJ00338 protein
18	TGCGCGTCTGTGT	Homo sapiens similar to hypothetical protein MGC38830 (LOC126299)
19	TGAGGCTCCCTCAC	Homo sapiens CD81 antigen, (target of anti-proliferative antibody 1)(CD81)
20	AACCTTGACCTGCA	Homo sapiens metallothionein 2A (MT2A)
21	TGGGAGAGTCTCT	Homo sapiens target of myb1 (chicken) (TOM1)
22	CAGGAGCTCTCTCT	Homo sapiens RuvB-like 2 (E. coli) (RUVB2)
23	TGGGGCCTCTGTGG	Homo sapiens cargo selection protein (CSP17)
24	TAGCTGCTCCCGCA	Homo sapiens ornithine decarboxylase antisense 2 (OAZ2)
25	TACCCACAGCTCCCA	Homo sapiens bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2)
26	CTGAGGAGCCCTC	Homo sapiens mitogen-activated protein-binding protein-interacting protein
27	CGCTCTCTGGAAC	Homo sapiens LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated (LSM7)
28	CATCAGAGCCCGAC	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 35 (C17orf35)
29	CAGCGGCTATGGA	Homo sapiens keratin 19 (KRT19)
30	TGGCAGCTCTCTTT	Homo sapiens pitrilysin metalloproteinase 1 (PITRM1)
31	CCACAAATGCGCAG	Homo sapiens retinal short-chain dehydrogenase/reductase 2 (R1SDR2)
32	AGCCGCGCTTCCA	Homo sapiens glutathione peroxidase 1 (GPX1)

外科的手術時に得られた子宮体癌と正常内膜組織のそれぞれ5検体の間で、候補遺伝子プローブによる RT-PCR が行われ、遺伝子発現の差異を確認した。候補遺伝子を絞り、3次スクリーニング用のプローブをそれぞれ作成した。更に子宮体癌、正常子宮内膜組織検体を増やし、3次スクリーニングを実施した。遺伝子発現は子宮内膜異型増殖症組織や月経周期により異なる事が判明したため、3次スクリーニングは困難であった。それらの差異を加味して、2次スクリーニング前の候補遺伝子 32 個の中から、子宮体癌に有意な発現が認められる候補遺伝子は、最終的に 5 個に絞られた。最終的な候補遺伝子を (表 3) に示す。これらの候補遺伝子の産物の中には、炎症や癌の侵襲に対する生体の防御機序に関する物質や、生体の免疫を調整する因子が

含まれ、癌細胞の局所浸潤による炎症のコントロールへの関与が考えられた。また、細胞増殖や細胞周期を調整する因子も含まれ、癌細胞の特長である、自立的な細胞増殖・細胞分裂への関与も考えられた。これらの遺伝子産物は血清腫瘍マーカーとして使用することができるかもしれない。今回、子宮体癌特異的発現遺伝子を絞りきることはできなかった。しかし、他の癌腫では研究が見られる SAGE 法での発現遺伝子プロファイル解析は、子宮体癌組織では、これまでに発表されておらず、これらの候補遺伝子は新たなデータベースになると考える。またこれらの候補遺伝子の中には、子宮体癌の特異的発現遺伝子が存在し、その遺伝子を元にした子宮体癌の分子診断や子宮体癌の治療への応用が可能になる遺伝子が含まれると考える。(表 3)

表 3 候補遺伝子

0	Sequence	name
1	CTGCTCAGCCCGA	B-factor, properdin (BPF)
2	TGGGGCCTCTGTGG	cargo selection protein (mannose 6 phosphate receptor binding protein)
3	CAGCAGAGCCCGCA	uridine phosphorylase (UP)
4	TGCCTGTGCGCTG	cyclin G1 interacting protein (CG1)
5	TACCCACAGCTCCCA	bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2)

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 0 件)
- [学会発表] (計 0 件)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他] ホームページ等 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 博 (NISHIKAWA HIROSHI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00347410