

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20591564

研究課題名(和文) ゲノム情報と癌遺伝子・癌抑制遺伝子中毒を指標にした
食道癌治療標的遺伝子の探索研究課題名(英文) Identification of target genes for esophageal cancers through
integrative analysis of genomic alterations and oncogene addiction

研究代表者

井本 逸勢 (橘 逸勢) (IMOTO ISSEI) (TACHIBANA ISSEI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：30258610

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌の「分子標的治療」を実現するための標的遺伝子候補の同定を目的に、アレイ技術を基盤に蓄積するゲノム異常領域内の遺伝子群やエピゲノム異常を示す遺伝子群から、これらの遺伝子異常を検出した細胞株を用いた機能解析と多数の臨床例における発現解析により、網羅的かつ効率的に「食道扁平上皮癌のアキレス腱となり得る遺伝子」の異常の同定を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：In order to identify target tumor-related genes for establishing molecular targeting therapy in patients with esophageal squamous-cell carcinoma, we integrated detailed information of genomic/epigenomic alterations in tumors, functional addiction of tumor cells to candidate target genes (oncogene addiction), and clinicopathological significance of altered expression status of those genes. Using this approach, we successfully identified a number of possible novel oncogene and tumor suppressor genes, which may be useful therapeutic as well as diagnostic targets for esophageal cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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・消化器外科学(食道外科学)

キーワード：食道癌、アレイ CGH、遺伝子増幅、DNAメチル化、癌遺伝子中毒

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌(ESCC)の発生・進展の過程では、多くの遺伝子に生じた様々な異常が蓄積されていくが、その基盤にはゲノム・エピゲノムレベルでの異常が関わっている。多くの遺伝子異常の中でも、ドライバー変異をもつ遺伝子が、癌細胞の悪性形質獲得に積極的に関与しているが、癌細胞がその遺伝子の機能の活性化・不活性化に強く依存した状態に

ある場合、その遺伝子の発現や活性を調節することで癌の増殖など悪性形質のコントロールが可能となる、癌遺伝子中毒(Oncogene addiction)・癌抑制遺伝子中毒(Tumor suppressor gene addiction)と呼ばれる現象が存在することが知られていた。従って、特異的依存により癌の脆弱性の鍵となる「アキレス腱遺伝子」を同定できれば有効な治療薬開発につながるが、①癌遺伝子・癌抑制遺

伝子中毒の分子機構は未知であり、既知の機能からの候補遺伝子アプローチでは、癌の多様性に対応した十分な数の標的候補を見逃す可能性が高い反面、②全ての遺伝子を対象とした場合、数の多さから施行可能なアッセイに限界があり、多彩な悪性形質について十分な検討が出来ない、などの理由で国内外で必ずしも有用な標的分子の同定が進んでいなかった。ESCCでも、これまで有用な分子標的が知られておらず、多様な悪性形質に対応した複数の分子標的を同定することは、有効な治療剤開発による新規治療法の確立と予後の劇的な改善を見込むことが出来ると考えられた。そこで、申請者らが、特に ESCCにおいて蓄積しさらに詳細な解析を進めているゲノム・エピゲノム異常の情報を活用した本課題を着想するに至った。

2. 研究の目的

ESCCの「分子標的治療」を実現するトランスレーショナルリサーチの標的遺伝子候補の同定を目標とし、アレイ技術を基盤に蓄積されたゲノム異常領域内の遺伝子群ならびにエピゲノム異常を示す遺伝子群をスクリーニングの対象に設定し、これら遺伝子の異常を検出した細胞株ならびに癌部・非癌部のペア検体を含む多数の臨床例から成るコホートを解析に用いることで、網羅性を維持しつつ効率的に「ESCCのアキレス腱となり得る遺伝子の異常」を同定する。

3. 研究の方法

① ESCCにおいてゲノム・エピゲノム異常を生じる遺伝子群の選別

ESCC細胞株を対象にした自作アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (CGH) 法で得られているゲノムコピー数異常の情報をもとに、増幅・ホモ欠失領域を決定し、さらに定量PCR法、高密度オリゴアレイCGH法、メチル解析により、これらの中から一次候補遺伝子を絞り込む (一次セット)。

② 細胞株と臨床検体での癌特異的発現異常を指標にした遺伝子選別

一次セットの遺伝子をESCC細胞株・臨床検体のRNAのパネルを用いてRT-PCRによる発現解析を行い、予測される発現異常に高頻度に一致するものを選択する (二次セット)。発現抑制の認められるものは、欠失以外の点突然変異、DNAメチル化などのエピゲノム異常などの関与に関して検討する。

③ 細胞株を用いた候補遺伝子の機能解析

発現亢進、発現抑制の認められた二次セットについて、それぞれ変化を認めた細胞株を用いてノックダウン、強制発現による細胞増殖などの表現型に対する変化を確認する。

④ 候補遺伝子の発現の臨床病理学的意義の検討

多数例の臨床検体を用い、主にパラフィン切片の免疫染色を用いた発現解析を施行することで、発現異常の予後を含めた臨床病理学的意義を検討する。

4. 研究成果

① 癌のゲノムコピー数異常解析と発現情報を用いた標的候補遺伝子探索

ESCC43細胞株を対象に既に取得済みのコピー数情報をもとに高密度オリゴアレイCGH解析により得られた情報を解析し、ホモ欠失領域、遺伝子増幅領域の詳細なマッピング情報を得た (図1)。異常領域内遺伝子を一次セットとしてリスト化し、データベースや細胞株パネルを用いた発現実験で得られる情報に基づいて、発現異常の認められる候補遺伝子の絞り込みを行った。本アプローチから、候補遺伝子リストが作成できることを確認できたため、さらにESCC以外の癌 (口腔癌、甲状腺癌、卵巣癌、肝癌、膵癌など) も同様のアプローチを進めた。

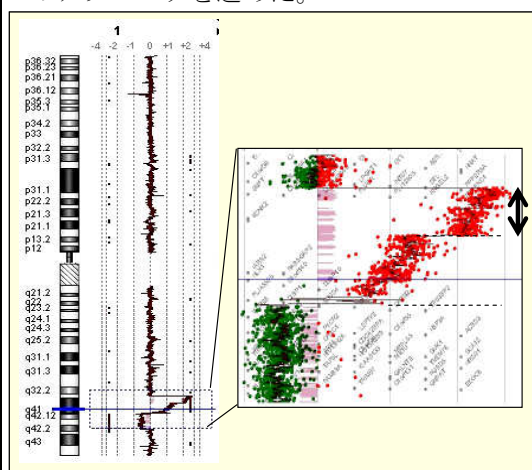


図1 増幅領域の詳細な絞り込み (雑誌論文⑤での例)

オリゴアレイCGH法により既知の増幅領域は矢印のピークの範囲に限局化でき、遺伝子の絞り込みがさらに可能になった。

② 標的遺伝子候補の臨床病理学的並びに生物学的意義の解明

選択した標的遺伝子候補に関して、臨床検体・細胞株パネルにおける mRNA 発現、ゲノムレベルでの点突然変異、DNAメチル化の評価を行うことで、より候補遺伝子として確からしいものまで絞り込んだ二次セットとしてリストを作成した。

このリスト内の遺伝子の siRNA によるノックダウンや強制発現が細胞増殖に及ぼす効果に関して、異常の認められた細胞株を用いて解析すると、特定の遺伝子についてのみその効果を認めたことから、これらの遺伝子は特異的に癌遺伝子中毒 (YAP, SMYD2, ITCH, PAK4, SMURF1, など) あるいは癌抑制遺伝子中毒 (PCDH17, ANGPTL2, miR-124, miR-203, など) を示す有力な癌関連遺伝子候補であることが予測された (図2)。一部の遺伝子 (PCDH17、

など)については、浸潤能についても依存性を確認できた。

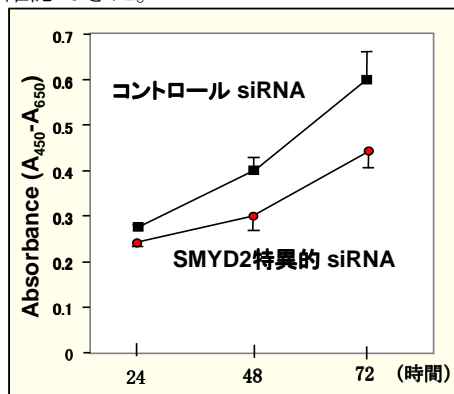


図2 siRNAによる細胞増殖抑制作用の検出 (雑誌論文⑤での例)

SMYD2の増幅/発現亢進のあったESCC細胞株では、siRNAを用いたノックダウンにより細胞増殖が抑制された(MTTアッセイ)

臨床検体の組織染色による発現量と臨床病理学的因子との相関の解析を行うことで、YAPやSMYD2の発現亢進例ではESCCの外科治療後の予後が不良であることなど、臨床病理学的な意義も確認され、新規の診断・治療標的となり得ることが示された。

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9件)

- ① Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J. YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2011;32:389-98 (査読あり)
- ② Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2010;31:1027-36 (査読あり)
- ③ Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2010;31:766-76 (査読あり)
- ④ Begum A, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Suzuki E, Amagasa T, Inazawa J. Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci* 2009;100:1908-16 (査読あり)
- ⑤ Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, Kozaki KI, Muramatsu T, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi

Y, Ichikawa D, Otsuji E, Inazawa J. Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2009;30:1139-46 (査読あり)

- ⑥ Ishihara T, Tsuda H, Hotta A, Kozaki K, Yoshida A, Noh JY, Ito K, Imoto I, Inazawa J. ITCH is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* 2008;99:1940-9 (査読あり)
- ⑦ Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer Res* 2008;68:5067-75 (査読あり)
- ⑧ Suzuki A, Shibata T, Shimada Y, Murakami Y, Horii A, Shiratori K, Hirohashi S, Inazawa J, Imoto I. Identification of SMURF1 as a possible target for 7q21.3-22.1 amplification detected in a pancreatic cancer cell line by in-house array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* 2008;99:986-94 (査読あり)
- ⑨ Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008;68:2094-105 (査読あり)

[学会発表] (計7件)

- ① 井本逸勢、春木茂雄、小崎健一、松井毅、河内洋、小松周平、村松智輝、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治: 食道扁平上皮癌において高頻度に発現抑制を受ける新規癌抑制遺伝子候補 Protocadherin 17(PCDH17), 日本人類遺伝学会第55回大会, 2010.10.29, さいたま
- ② 井本逸勢、稲澤譲治: がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析, 第69回日本癌学会学術総会, 2009.10.1, 横浜
- ③ 井本逸勢、松村聡、小崎健一、有井滋樹、稲澤譲治: ゲノムワイドな統合的DNAメチル化異常解析による肝癌抑制遺伝子候補探索, 日本人類遺伝学会第54回大会, 2009.9.26, 東京
- ④ 井本逸勢、春木茂男、小崎健一、松井毅、河内洋、小松周平、村松智輝、嶋田裕、河野辰幸、稲澤譲治: 食道扁平上皮癌で高頻度に発現消失する新規癌抑制遺伝子候補 protocadherin 17, 第69回日本癌学会学術総会, 2010.9.23, 大阪
- ⑤ 井本逸勢、稲澤譲治: ヒト癌におけるゲノム一次構造異常領域から同定された増幅

標的癌遺伝子候補としての dual specificity phosphatase, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生科学会大会・合同大会, 2008.12.11, 神戸

- ⑥ 井本逸勢、井上純、稲澤譲治：エピゲノム異常で発現抑制を受ける新規口腔、食道扁平上皮癌抑制遺伝子候補の同定, 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008.10.29, 名古屋
- ⑦ 井本逸勢、稲澤譲治：ゲノム構造解析による食道扁平上皮癌の標的遺伝子探索, 第 17 回日本アポトーシス研究会学術集会, 2008.8.2, 京都

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称：癌の検出方法および抑制方法

発明者：稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢・古田繭子・有井滋樹

権利者：富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：2010-046564(P09-034)

出願年月日：2010.3.3

国内外の別：国内

名称：食道癌の検出又は予後の予測のための方法及び食道癌抑制剤

発明者：稲澤譲治・井本逸勢・春木茂男

権利者：富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学

種類：特許

番号：2010-041825(P09-053)

出願年月日：2010.2.26

国内外の別：国内

名称：食道癌の検出方法及び抑制剤

発明者：井上純・井本逸勢・稲澤譲治

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社

種類：特許

番号：2009-073998(P08-037)

出願年月日：2009.3.25

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

徳島大学・大学院ヘルスハイ科技イノベーション研究部・人類遺伝学

(<http://plaza.umin.ac.jp/awahg/>)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子細胞遺伝

(<http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/framepage.htm>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井本 逸勢 (橋 逸勢)

(IMOTO ISSEI) (TACHIBANA ISSEI)

徳島大学・大学院ヘルスハイ科技イノベーション研究部・教授

研究者番号：30258610

(2) 研究分担者

稲澤 譲治 (INAZAWA JOHJI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30193551