

機関番号： 82504
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20591664
 研究課題名 (和文) ゲノム・エピゲノム異常領域を指標とし肺癌治療を目指した新規標的遺伝子の同定と解析
 研究課題名 (英文)
 Novel cancer related genes of lung based on the genomic and epigenomic aberrations.
 研究代表者
 横井 左奈 (YOKOI SANA)
 千葉県がんセンター (研究所)・がんゲノムセンター・部長
 研究者番号：30372452

研究成果の概要 (和文)：

癌による死因の最大の原因である肺癌の遺伝子異常を、マイクロアレイを用いて解析した。肺癌細胞株において遺伝子増幅および欠失が認められる染色体領域を明らかにし、遺伝子増幅領域の中から増幅に伴い発現が亢進している新規の肺癌関連遺伝子を同定した。また、肺癌臨床検体を用いた解析を行い、診断・治療に関わる因子の探索を進めた。

研究成果の概要 (英文)：

To explore novel lung cancer related genes, genomic and epigenomic aberrations were detected by DNA microarray in lung cancer cell lines and primary lung tumors from Japanese patients. We detected novel lung cancer related gene in the genomic amplified regions. We also make genetically modified mice of the gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：呼吸器外科学、分子細胞遺伝学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

肺癌は日本における年間死亡者数が5万人を越え、日本人男性の癌死の1位、女性の2位を占めており、その対策は急務である。検診の普及と手術療法、化学療法、放射線治療とその合併療法の進歩にもかかわらず、肺癌患者の5年生存率は10～15%とほとんど向上していない。EGFRを標的とした治療薬ゲフィチニブ (イレッサ) を含め、現在、臨床に実用されている分子標的治療薬は、すべてゲノム一次構造異常 (ゲノム異常) により惹

起された遺伝子異常を対象としたものであり、あらゆる増殖中の細胞に殺傷作用をおよぼす従来の抗がん剤による治療とは異なる、癌細胞の遺伝子産物の質的、量的変異を指標にした治療を実現してきている。このことは、ゲノムの変わらぬ傷である一次構造異常を治療標的とすることの安定性、特異性を示している。一方で、直接ゲノム構造を変化させず、ゲノムの修飾 (DNAメチル化・ヒストン修飾など) 異常により発現変化を起こすエピゲノム異常も高頻度で起こっており、この

両者が蓄積して肺癌の悪性形質獲得に寄与している。

申請者は染色体標本を材料にした従来の CGH 法を用いた肺癌のゲノム一次構造異常の網羅的解析とこれにより見出した遺伝子増幅領域から癌関連遺伝子の同定を行ってきた。中でも、肺小細胞癌における 5p13 増幅領域において SKP2 が活性化を受けて増殖に関与していることを示した (Yokoi et al. Am J Pathol 2002)。また、肺癌細胞において SKP2 の発現を抑制すると、アポトーシスが誘導され、oncogene addiction があることを見出した (Yokoi et al. Cancer Sci 2003)。また、肺非小細胞癌症例においても、SKP2 は過剰発現しており、肺癌細胞の遊走・浸潤に関与することを明らかにしてきた (Yokoi et al. Am J Pathol 2004)。SKP2 は CDK インヒビター p27 を基質としてユビキチンを付加し、26S プロテアソームでの分解を促進し、p27 の癌抑制機能を低下させる。2006 年にはプロテアソーム阻害薬のボルテゾミブ (ベルケイド) が多発性骨髄腫の治療薬として日本で承認されており、治療標的としてプロテアソーム経路が注目されている。しかし、従来の CGH 法の解像度は 5~10Mb レベルと低かったため、連携研究者の稲澤の主導により BAC クローンを用いた CGH アレイの開発を行い、2003 年には研究室レベルでの実用化・量産化を果たしてきた。この in-house BAC アレイを用いて肺癌細胞株の解析を行い、従来の CGH 法では検出できなかった増幅とそれに伴う発現亢進を検出した。

一方、ヒトゲノム DNA の全塩基配列が決定され、蛋白をコードする領域はゲノム全体の 2% にすぎないことが判明した。非コード領域に存在する、転写を制御するプロモーターや、転写因子の結合配列、DNA メチル化やヒストン修飾などエピゲノム解析をすすめることにより、遺伝子制御機能の包括的理解が可能になる。哺乳類のゲノム DNA において、非コード領域のプロモーターのメチル化は遺伝子転写レベルを負に制御している。また、プロモーターのメチル化により不活性化されている癌抑制遺伝子の報告は、様々な癌で年々増加している。肺癌では p16INK4A、TSLC1、RASSF1A、14-3-3σ などのプロモーター領域のメチル化による発現抑制が同定されているが、これらはまだ一部に過ぎないと思われる。従って、癌における異常なメチル化領域の探索は、新たな癌抑制遺伝子の同定につながると考えられる。そこで、我々は in-house BAC アレイを応用することで、肺癌において異常なメチル化領域の網羅的探索が可能であると考え、2 つの応用法を開発した。1 つは、DNA メチル化領域検出法である MCA (methylated CpG island amplification) 法により得られた DNA 断片

を BAC アレイのためのプローブとする BAMCA 法である。更に効率の良いメチル化領域の絞込みのために、もう 1 つの応用法として同じアレイプラットフォーム上でクロマチン免疫沈降法を展開する ChIP on BAC-array 法を確立した。ChIP on BAC-array 法により、メチル化シトシンに結合し発現抑制を行うことが知られている MeCP2 蛋白結合領域、および、発現抑制的に働くことが知られているヒストン修飾であるヒストン H3 リジン 9 ジメチル化領域を検出し、BAMCA 法による SmaI サイトの DNA メチル化領域の検索結果と重ね合わせ、3 つの実験の共通陽性領域を絞り込むことで、癌特異的メチル化されている領域の絞込みおよびメチル化により発現抑制されている癌抑制遺伝子を同定する エピゲノム異常解析法を開発した。

2. 研究の目的

- (1) 既に、主に日本人から樹立された肺癌細胞株 49 株の BAC アレイを用いたゲノム・エピゲノム解析よりのデータベースを構築しており、絞り込んでいる異常領域に対し、oligoアレイ、リアルタイム定量 PCR 法等を施行し、標的遺伝子を同定する。
- (2) 性染色体である X 染色体には、古くから癌精巣抗原が多数座位することが指摘されているものの、常染色体に比し、解析が遅れている。実際に、我々のこれまでの解析においても、X 染色体の増幅・欠失が他の癌種に比べ肺癌において高頻度に検出されてきている。我々は、X 染色体について偽常染色体領域を除き 1003 個の BAC クローンで網羅した X-tiling アレイを既に作製した。このアレイを用いて、X 染色体に特化した詳細なゲノム・エピゲノム解析を肺癌細胞株を対象にして施行する。検出した異常領域を指標に、遺伝子発現の質的・量的変化をリアルタイム定量 PCR 法などにより解析し、標的遺伝子を同定する。
- (3) 同定した標的遺伝子につき、分子生物学的・細胞生物学的機能解析により肺癌における意義を明らかにし、臨床病理学的因子との関連を検討する。
- (4) 肺癌手術検体、気管支鏡検体、および喀痰細胞診検体を用いて診断ツール、治療標的としての有用性の検討と肺癌診断・治療用のゲノムアレイの開発、および臨床検体を用いたゲノム・エピゲノム解析を行い、肺癌関連遺伝子のカタログ化を進める。

3. 研究の方法

- (1) スクリーニング用ゲノム DNA アレイの作

製

既に実用化している in-house ゲノムアレイのうち以下の3種類①全染色体を1Mb間隔以下にカバーする約4,500個のBACクローンを配置したスクリーニング用アレイ(MCG Whole Genome Array-4500)、②癌の多項目遺伝子診断を可能にするため約800種類の癌遺伝子および癌抑制遺伝子に特化したカスタムアレイ(MCG Cancer Array-800)、③癌精巢抗原が多数座位するX染色体を1003個のBACで隙間なくカバーしたアレイ(MCG X-tiling Array)を作製し、解析に用いる。

(2) CGHアレイ法による新規遺伝子増幅領域の検出と肺癌関連遺伝子の解析

①既に終了している肺癌細胞株49株に対するMCG Cancer Array-800およびMCG Whole Genome Array-4500によるゲノムコピー数異常解析の結果、遺伝子増幅として検出されている領域をリスト化する。このうち、X染色体に増幅を認めた細胞株を選出し、MCG X-tiling Arrayによる詳細なゲノムコピー数異常解析を施行し、増幅領域の再リスト化を行う。検出された増幅領域のうち、微細増幅領域もしくは遺伝子密度が低い領域に対しては、FISH法により遺伝子増幅の有無とその範囲を決定し、増幅領域内のトランスクリプトに対し、リアルタイム定量PCR法を施行し、増幅に伴う発現亢進を認め、かつ正常肺と比較し肺癌において高頻度に発現亢進している標的遺伝子の同定を行う。

②同定した遺伝子につき、発現ベクターを用いた一過性強制発現系もしくは安定発現系により細胞内局在の評価およびコロニー形成の促進等が認められるかを確認する。遺伝子増幅株に対しsiRNAによるノックダウンを行い、細胞増殖能、浸潤能などを評価し、oncogene addictionの有無を確認する。遺伝子の持つモチーフ構造等から機能を予測し、肺癌細胞においてgain of functionになっているかを評価する。ウサギ等を用いて抗体を作製し、免疫沈降後の質量分析、yeast two-hybrid等により相互作用する蛋白を同定し、既存のシグナル伝達系での位置づけを行う。トランスジェニック動物を作製し、発癌機序の解明を行う。

③統計学的解析可能な情報を有する肺癌手術検体を収集し、組織マイクロアレイを用いた多検体の免疫染色による評価を行い、臨床病理学的因子との関係を解析する。気管支鏡検体、および喀痰細胞診検体を用いて、免疫染色、リアルタイム定量PCR、FISH法による迅速診断系の確立と評価を行う。モノクローナル抗体を作製し、サンドイッチELISA法などによる測定系を確立し、血清等を用いた診断マーカーとしての評価を行う。

(3) CGHアレイ法による新規異常メチル化領

域の検出と肺癌抑制遺伝子の解析

①これまでの研究で確立してきた、BAMCA法により検出したDNAメチル化領域、抗MeCP2抗体によるChIP on BAC-array法にて検出したMeCP2蛋白結合領域、抗ヒストンH3リジン9ジメチル化抗体によるChIP on BAC-array法にて検出したヒストンメチル化領域を重ね合わせる方法を用いて、肺癌細胞株の解析数を追加し、共通陽性領域で頻度の高いものをメチル化による制御を受ける肺癌のエピゲノム異常領域として選出し、標的遺伝子の同定を行う。

②手術検体、気管支鏡検体、剖検例など肺癌臨床検体を用いてCGHアレイ法によるゲノムコピー数異常解析を施行し、同様に標的遺伝子の同定を行う。薬剤感受性等の臨床病理学的因子との関係を解析し、診断・治療に有用な遺伝子群の同定を行う。

4. 研究成果

(1) 日本人由来の肺癌細胞株49株のゲノム解析により、肺小細胞癌に見出した第1番染色体短腕の新規遺伝子増幅領域に着目し、標的遺伝子としてTRIM33を同定した。肺小細胞癌細胞株にTRIM33を強制発現させると細胞増殖能は亢進し、反対にsiRNAによりノックダウンすると細胞増殖能は低下したため、TRIM33は治療標的として有用であると思われた。TRIM33は、肺小細胞癌のみならず、肺非小細胞癌においても約半数の症例で非腫瘍部と比較して腫瘍部において発現が亢進していた。肺腺癌細胞株においてsiRNAによりTRIM33をノックダウンすると細胞の増殖は抑制されたため、TRIM33は肺非小細胞癌においても治療標的として有用であると思われた。またTRIM33は、乳癌など癌腫を超えて癌関連遺伝子として働いていると考えられた。

(2) これまでのゲノム解析から、X染色体上にコピー数増加を認めた細胞株は49株中23株あった。これらにつき、X染色体を隙間なくカバーしたMCG X-tiling Arrayを用いてより詳細なゲノムコピー数異常解析を施行した。その結果、肺癌関連遺伝子探索のランドマークとなる遺伝子増幅・ホモ欠失を各4領域に検出した。

(3) 肺癌における新規増幅領域の標的遺伝子に関し、トランスジェニックベクターを作成し、トランスジェニックマウスの作成を進めている。

(4) 細胞株のみならず肺癌臨床検体についてもゲノムコピー数解析をオリゴアレイを用いて行った。新規の遺伝子増幅領域が検出され、増幅に伴う発現亢進を示す新規肺癌関連遺伝子候補が同定された。その中には、発生時や幹細胞において働く遺伝子があり、増幅

に伴う発現亢進をしていることを確認した。

また、肺癌臨床検体120症例につき既知の分子マーカー (EGFR 変異等) の評価を行い、同定した標的遺伝子との関連を調べた。

次に、縦隔リンパ節転移を認める肺癌手術症例から肺原発巣およびリンパ節転移巣を採取し、アレイCGHによりゲノムコピー数変化を比較した。その結果、リンパ節転移巣におけるゲノム変化は、原発巣の変化を非常に良く反映していることが確認できた。そこで、超音波気管支鏡下に肺小細胞癌リンパ節転移検体を採取し、アレイCGHによりゲノムコピー数解析を行った。その結果、1p, 1q, 3q, 5p, 6p, 6q, 8q, 12q, 17q, 18q, 19pに高頻度のコピー数増加を認めた。また、3p, 4q, 5q, 10q, 13q, 15q, 16p, 16q, 17p, 22qに高頻度のコピー数減少を認めた。これらの結果は、以前行った肺小細胞癌細胞株での解析結果と良く一致していた。また、新規の増幅およびホモ欠失領域も検出され、標的となる遺伝子の同定を進めている。

当院における2007年から2009年までの非小細胞癌手術症例および気管支鏡生検症例404例につきALK免疫染色を行った結果、15例が陽性であった。そのうち10症例につきアレイCGHによりゲノムコピー数解析を行った。その結果、コピー数変化を認めた染色体領域数は0~20であった。ALK阻害薬の効果に関わる遺伝子の同定を進めている。

以上により、研究目的は一定の成果をあげたと考える。

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8件)

- (1) Shingyoji M, Kageyama H, Sakaida T, Nakajima T, Matsui Y, Itakura M, Iuchi T, Yokoi S, Kimura H, Iizasa T. Detection of Epithelial Growth Factor Receptor Mutations in Cerebrospinal Fluid from Patients with Lung Adenocarcinoma Suspected of Neoplastic Meningitis. *J Thorac Oncol.* 2011 [in press]
- (2) Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues. *Pathobiology.* 2011; 78: 1-9
- (3) Gotoh M, Arai E, Wakai-Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hosoda F, Shibata

T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Diagnosis and prognostication of ductal adenocarcinomas of the pancreas based on genome-wide DNA methylation profiling by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 780836

- (4) Nishiyama N, Arai E, Nagashio R, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Kanai Y. Copy number alterations in urothelial carcinomas: Their clinicopathological significance and correlation with DNA methylation alterations. *Carcinogenesis.* 2011; 32: 462-9.
- (5) Nishiyama N, Arai E, Chihara Y, Fujimoto H, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Tsukamoto T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. *Cancer Sci.* 2010; 101: 231-240
- (6) Arai E, Ushijima S, Gotoh M, Ojima H, Kosuge T, Hosoda F, Shibata T, Kondo T, Yokoi S, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2009; 125: 2854-2862
- (7) Arai E., Ushijima S., Fujimoto H., Hosoda F., Shibata T., Kondo T., Yokoi S., Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation profiles in both precancerous conditions and clear cell renal cell carcinomas are correlated with malignant potential and patient outcome. *Carcinogenesis.* 2009; 30: 214-21
- (8) 横井左奈, 稲澤譲治 遺伝子異常の全ゲノム探索、肺癌 2008; 66: 45-49

[学会発表] (計14件)

- (1) 新行内雅斗、癌性髄膜炎が疑われた肺癌症例における髄液中EGFR変異の検討、第51回日本肺癌学会総会、2010年11月3-4日、広島
- (2) Nakajima T, EGFR, K-ras, p53 gene mutation analysis in NSCLC using microsamples obtained by

- EBUS-TBNA、
- (3) CHEST 2010.11 バンクーバー、カナダ
 - (4) 横井左奈、The tripartite motif 33 (TRIM33), an amplification target for 1p13, promoted growth of breast cancer、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日、横浜
 - (5) 横井左奈、1p13 増幅領域の標的遺伝子 tripartite motif 33 (TRIM33)は乳癌の予後不良因子である、日本人類遺伝学会 第 54 回大会 2009 年 9 月 25 日 東京
 - (6) 西山直隆、Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日、横浜
 - (7) 新井恵吏、Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 2 日、横浜
 - (8) 横井左奈、アレイ CGH 法による肺小細胞癌の潜在的ゲノムコピー数解析と癌関連遺伝子の同定、日本人類遺伝学会 第 53 回大会、2008 年 9 月 29 日、横浜
 - (9) 横井左奈、The tripartite motif 33 (TRIM33) gene is probable target for 1p13 amplification in small cell lung cancer、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋
 - (10) 坂本宙子、X-tiling アレイを用いた X 染色体上の癌関連遺伝子群の探索、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋
 - (11) 久保田健夫、レット症候群の自閉症状の要因としてのシナプス関連分子のエピジェネティックな制御異常、第 31 回日本神経科学大会、2008 年 7 月 9-11 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 左奈 (YOKOI SANA)
千葉県がんセンター (研究所)・がんゲノムセンター・部長
研究者番号：30372452

(3) 連携研究者

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
(平成 20 年度)