

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390106

研究課題名（和文） 癌病態評価高精度ゲノムミニアレイの開発

研究課題名（英文） The development of a mini-array specific to gastric cancers to estimate biological characteristics.

研究代表者

佐々木 功典 (SASAKI KOHSUKE)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80116722

研究成果の概要（和文）

外科切除により採取された胃癌症例を用いてアレイ CGH 解析を行い、リンパ節転移の有無や組織型といった臨床病理学的事項と関係の深い BAC クローンを抽出し、胃癌の病態評価のためのミニアレイを作製した。このミニアレイで新規胃癌症例について病態予測を行ったところ、リンパ節転移が実際にない症例のうち7割のものを正しく予測できた。今後精度を上げるための検討は必要だが、今回開発したミニアレイは癌の病態評価（予測）に十分利用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We developed the “mini-array” for gastric cancer to evaluate biological characteristics including lymph node metastasis and so on. In order to select BAC clones linked with biological characteristics, we applied a technology of array-based CGH to gastric cancers. To evaluate the “mini-array” for gastric cancer, we applied “mini-array” for another case of gastric cancers and we succeeded in predicting correctly about 70% of cases with no lymph node metastasis. This result suggests the “mini-array” a useful device for personalized treatment for cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：がん、ゲノム、DNA コピー数、アレイ CGH

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因第一は悪性新生物、いわゆるがんである。その治療法の発展は近年目覚ましく、がん患者の予後は一昔前のそれと比較

して格段に改善しているが、いまなお多くの人ががんで亡くなっている。一方、さまざまな疾患において個々の患者に適した治療、すなわち個別化医療が求められるようにな

ってきている。個別化医療は、患者に優しい医療というだけでなく、医療経済の観点からも今後目指していくべき医療である。がん治療においても個別化医療は進みつつあり、例えば乳がんの治療薬であるトラスツズマブは、Her2 遺伝子の過剰発現を呈する乳がんにも有効であり、その投与には Her2 遺伝子の過剰発現の確認が必要である。

こういった背景を踏まえて、われわれはがんにおける個別化医療に有益な情報を与えるデバイス、“ミニアレイ”の作製を行うこととした。

2. 研究の目的

我々は、10年以上にわたり悪性腫瘍の遺伝子異常、特にDNAコピー数異常と臨床病理学的事項との関連をさまざまながんにおいて検討してきた。得られたデータの蓄積により、いくつかのがんではゲノムの特定の領域のコピー数変化がリンパ節転移や遠隔転移の有無といった個別化治療の指標となるがんの生物学的態度と関係があることがわかってきた。

本研究課題では各種固形がん、なかでも胃癌および大腸癌について、がんの個別化治療の指標となる病態を客観的かつ自動的に評価する高精度ゲノムミニアレイの開発を目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) アレイ CGH データの取得

胃癌、大腸癌について、臨床病理学的事項と関連の深いコピー数異常を呈するゲノム領域を抽出するために 1040BAC クローンがスポットされたアレイ CGH (MacArray™ Karyo 1400, MacroGen, Korea) を用いて解析した。

(2) 臨床病理学的事項との関連の深い BAC クローンの抽出

アレイ CGH のデータと各症例の臨床病理学的事項（リンパ節転移、遠隔転移の有無、組織型、深達度など）と強い関連を有するゲノム領域をアレイ CGH に貼り付けてある BAC 単位で抽出した。抽出にあたっては 2 つの方法を使用した。1 つは決定木による分類法

(WEKA decision-tree model classifier, J48 <http://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/webcite>) である。もう 1 つは 2 群間での有意差検定を使用し、 χ^2 乗検定によって 2 群間、たとえばリンパ節転移のある群とない群において DNA コピー数異常の頻度が異なる BAC クローンを抽出した。有意差検定については p 値が 0.05 未満のものを有意としたが、ミニアレイに張り付ける候補 BAC クローンとしては p 値が 0.01 未満のものを選んだ。

(3) 胃癌の病態評価のためのミニアレイ CGH プロトタイプ作製およびその評価

上記 2 つの方法で抽出された BAC クローン

にコントロール BAC を加え、胃癌の病態評価のためのミニアレイを作製し、新規胃癌症例を用いてその精度を評価した。

4. 研究成果

(1) 胃癌の病態評価のためのミニアレイに必要な BAC クローンの抽出

外科的に切除された 83 例の胃癌症例についてアレイ CGH を行った (図 2 a)。胃癌の病態評価に関係の強い BAC クローンは前述の 2 つの方法で行った。決定木による方法ではリンパ節転移について 6 クローン (5q13.2, 13q31.1, 1p22.3, 1p34.2, 14q32.2, 3q13.12)、肝転移について 4 クローン

(1q44-qter, 5q13.2, 6q23.2, 7q31.1)、腹膜播種の有無について 4 クローン (4q13.3, 4q32.2, 13q12.13, 12q24.23)、深達度 (早期癌か進行癌か) について 4 クローン (1q43, 21q22.2, 16q22.1, 6p21.1)、組織型について 7 クローンが抽出された (図 1)。有意差検定による方法では、リンパ節転について 7 クローン、肝転移について 6 クローン、腹膜播種について 5 クローン、組織型 (腸型かびまん型か) について 7 クローンがそれぞれ抽出された。

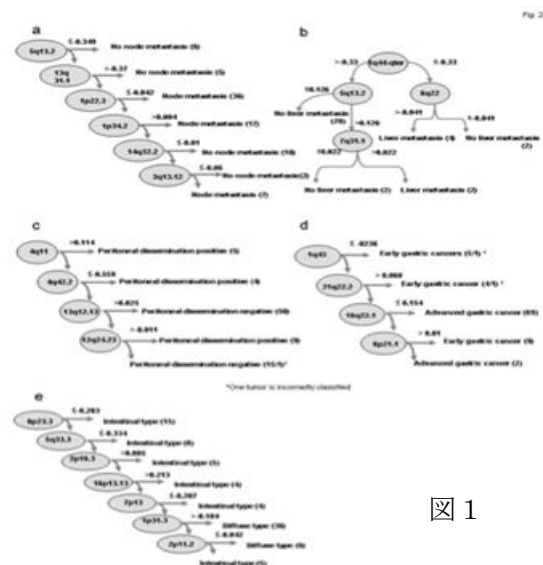


図 1

(2) 胃癌の病態評価ミニアレイプロトタイプの作製

2 つの解析法で抽出した胃癌の臨床病理学的事項と関連の強い BAC クローン 50 個に、病態との関連は薄いコピー数異常の頻度が高い、あるいは低いクローン 26 個およびレファレンスクローン 62 個を加え、計 138 個のクローンを胃癌病態評価専用のミニアレイのために選んだ。ミニアレイは 138 個のクローンをそれぞれ 3 スポットずつ配置したものを 1 セットとし、スライドガラス上に 2 セット貼り付けた (図 2 b)。

同一症例を用いて BAC アレイ CGH の結果とミニアレイ CGH の結果を比較したが、その

ロファイルはほぼ同じであった (図 2 c)。

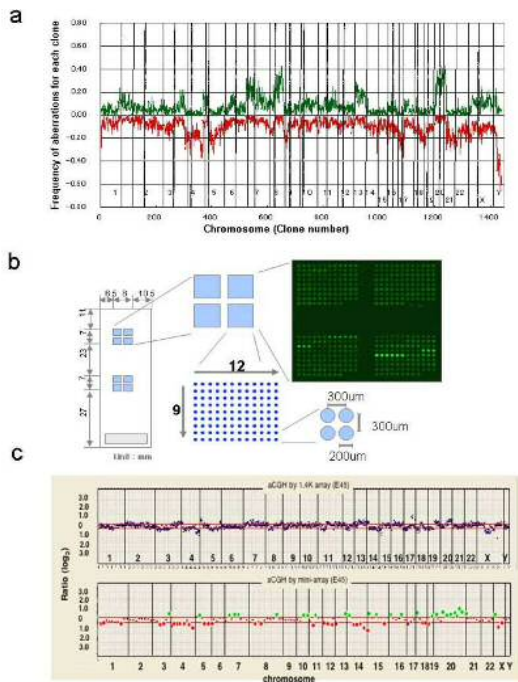


図 2

(3) 新規症例を用いたミニアレイの評価

この胃癌の病態評価のためのミニアレイの精度を確かめるために、新規胃癌症例 31 例、32 病巣を用いて検討した。病巣の内訳は早期病巣が 21 病巣、進行病巣が 11 病巣であった。治療前の内視鏡生検組織 1~2 片、あるいは内視鏡切除標本の一部を標本として採取し DNA を抽出し、病態評価、とくに生検組織からのリンパ節転移予測を試みた。生検切片組織からの DNA では 32 病巣中 25 病巣 (78.1%) でアレイ CGH が可能であった。アレイ CGH が不可能であった病巣は切片が小さすぎたり、乾燥により組織の状態が悪くなったものであったが、その後乾燥防止のために湿らせたろ紙へ組織を付着してから保存するようにしたところ、乾燥による組織の質の低下は抑えられた。

ミニアレイ CGH の結果から予測されたリンパ節転移と病理結果との一致率であるが、リンパ節転移有りと予想された 16 病巣のうち、実際に転移があったものが 4 例 (25%)、リンパ節転移なしと予想された 9 病巣のうち、転移がなかったものは 7 例 (77.7%) であった。胃生検切片からのアレイ CGH は技術的に可能ではあったが、今回の検討ではリンパ節転移について偽陰性が 22% もあった。生検組織でのアレイ CGH の結果からリンパ節転移を予測しようとした場合、偽陰性は許されず、今後さらに症例数を増やし、より精度高くリンパ節転移を予測できる推定カスケードの更新およびその精度評価を行い研究を進めていく予定である。

(4) 大腸癌の病態予測に特化したミニアレイ作製

胃癌と同様の方法で、大腸癌に特化したミニアレイを作製するために、大腸癌の臨床病理学的事項と関係の強い DNA コピー数異常を呈する BAC クローンを抽出するために、大腸癌 77 例について BAC アレイ CGH 解析を行った。20q、特に 20q11.21 における DNA コピー数の増加は症例の 70% に見られた。一方、DNA コピー数の減少は 18q23 で症例の 68% に認められた。リンパ節転移と比較すると、8q24.3 における DNA コピー数増加が最も関係していた ($p=3.52319E-05$)。今後はさらに症例数を増やし、大腸癌ミニアレイの候補となる BAC クローンを抽出し、ミニアレイのプロトタイプを作製を行っていく。

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 14 件)

- ① Oga A, Uchida K, Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Chochi Y, Ikemoto K, Okada T, Ueyama Y, Sasaki K, Yousefpour F. Loss of 6q or 8p23 is associated with the total number of DNA copy number aberrations in adenoid cystic carcinoma. *Oncol Rep.* 査読有 2011; 26(6):1393-1398. doi: 10.3892/or.2011.1446.
- ② Yamamoto Y, Misumi T, Eguchi S, Nakao M, Hara T, Sakano S, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H. Centrosome amplification as a putative prognostic biomarker for the classification of urothelial carcinomas. *Hum Pathol.* 査読有 2011; 42(12):1923-1930.
- ③ Uchida K, Oga A, Nakao M, Mano T, Mihara M, Kawauchi S, Furuya T, Ueyama Y, Sasaki K. Loss of 3p26.3 is an independent prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 査読有 2011; 26(2):463-469.
- ④ Nakao M, Kawauchi S, Uchiyama T, Adachi J, Ito H, Chochi Y, Furuya T, Oga A, Sasaki K. DNA copy number aberrations associated with the clinicopathological features of colorectal cancers: Identification of genomic biomarkers by array-based comparative genomic hybridization. *Oncol Rep.* 査読有 2011; 25(6):

- 1603-1611. doi: 10.3892/or.2011.1246.
- ⑤ Kawauchi S, Furuya T, Nakao M, Ikemoto K, Oga A, Sasaki K. A simple method for enhancing hybridization efficiency in chromosome and array comparative genomic hybridization. *Biotech Histochem*. 査読有 2011; 86(3):192-198.
- ⑥ Uchida K, Oga A, Nagatsuka H, Ueyama Y, Sasaki K. Screening for DNA copy number aberrations in mucinous adenocarcinoma arising from the minor salivary gland: two case reports. *Cancer Genet Cytogenet*. 査読有 2010; 203(2):324-327.
- ⑦ Kawauchi S, Furuya T, Ikemoto K, Yamamoto S, Oka M, Sasaki K. DNA copy number aberrations associated with aneuploidy and chromosomal instability in breast cancers. *Oncol Rep*. 査読有 2010; 24(4):875-883.
- ⑧ Kawauchi S, Furuya T, Uchiyama T, Adachi A, Okada T, Nakao M, Oga A, Uchida K, Sasaki K. Genomic instability and DNA ploidy are linked to DNA copy number aberrations of 8p23 and 22q11.23 in gastric cancers. *Int J Mol Med*. 査読有 2010; 26(3):333-339.
- ⑨ Eguchi S, Yamamoto Y, Sakano S, Chochi Y, Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Oga A, Matsuyama H, Sasaki K. The loss of 8p23.3 is a novel marker for predicting progression and recurrence of bladder tumors without muscle invasion. *Cancer Genet Cytogenet*. 査読有 2010 200(1):16-22.
- ⑩ Misumi T, Yamamoto Y, Murakami T, Ito H, Eguchi S, Yano S, Nagao K, Sakano S, Naito K, Sasaki K, Fichtner J, Matsuyama H. Genetic alterations at 13q14 may correlate with differences in the biological behavior of prostate cancer between Japanese and Caucasian men. *Urol Int*. 査読有 2010; 84(4):461-466.
- ⑪ Tsuji K, Kawauchi S, Saito S, Furuya T, Ikemoto K, Nakao M, Yamamoto S, Oka M, Hirano T, Sasaki K. Breast cancer cell lines carry cell line-specific genomic alterations that are distinct from aberrations in breast cancer tissues: comparison of the CGH profiles between cancer cell lines and primary cancer tissues. *BMC cancer*. 査読有 2010 Jan 14:10-15.
- ⑫ Kawauchi S, Sakai H, Ikemoto K, Nakao M, Takihara H, Shimabukuro T, Furuya T, Oga A, Matsuyama H, Sasaki K. 9p21 index as estimated by dual-color fluorescence in situ hybridization is useful to predict urothelial carcinoma recurrence in bladder washing cytology. *Hum Pathol*. 査読有 2009; 40(12): 1783-1789.
- ⑬ Yamamoto Y, Eguchi S, Nagao K, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Sasaki K, Matsuyama H. Intercellular centrosome number is correlated with the copy number of chromosomes in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 査読有 2009, 191(1):38-42
- ⑭ Chochi Y, Kawauchi S, Furuya T, Hasimoto K, Oga A, Sasaki K. A copy number gain of the 6p arm is linked with advanced hepatocellular carcinoma an array-based comparative genomic hybridization study. *J Pathol*. 査読有 2009 217(5), 677-684.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 佐々木 功典、がん細胞とゲノム発現、第 52 回日本臨床細胞学会総会、平成 23 年 5 月 21 日、福岡 福岡国際会議場
- ② 佐々木 功典、ゲノム解析のがん診療への応用、第 65 回日本消化器外科学会、平成 22 年 7 月 14 日、下関 海峡メッセ下関
- ③ 佐々木 功典、癌とゲノム、第 20 回日本サイトメトリー学会学術集会、平成 22 年 6 月 26 日、東京 東京慈恵会医科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 功典 (SASAKI KOHSUKE)
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：80116722