

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 7日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590369

研究課題名（和文）未分化型胃癌の進展にエピジェネティックな発現調節がどのようにかかわっているか

研究課題名（英文）The role of epigenetic regulation of gene expression in progression of undifferentiated-type gastric carcinomas

研究代表者

杉原 洋行（SUGIHARA HIROYUKI）

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：30171169

研究成果の概要（和文）：

腫瘍の進展とともにエピジェネティックな調節が外れることによって、ゲノムコピー数を反映した遺伝子発現パターンになることを示唆するデータが得られた。これが正しければ、特定の遺伝子のコピー数変化のパターンから腫瘍の進展リスクを診断できるようになる。そのような遺伝子の候補として、胃癌では *MYC* と *TP53* に加えて、分化型では腸型や上皮間葉転換に関連する遺伝子等、未分化型ではインテグリン遺伝子があることを示した。

研究成果の概要（英文）：

We have demonstrated that gene expression pattern of cancer may eventually become genomic dosage-dependent due to the attenuation of epigenetic regulation during tumor progression. If this is true, we can predict the progression risk of the cancer by the pattern of copy-number alterations of specified genes. In gastric cancer (GC), candidates of such genes were found to include many genes related to intestinal expression and epithelial mesenchymal transition in differentiated-type GC and integrin genes in undifferentiated-type GC in addition to *MYC* and *TP53*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：未分化型胃癌、epigenetics、がん進展、アレイ CGH、クラスター解析、上皮間葉転換、インテグリン、腸形質

1. 研究開始当初の背景

本研究の基盤になったのは、筆者らが明らかにした、次の3点であった。まず、①未分化

型胃癌の系譜には印環細胞癌に由来するものと分化型腺癌に由来するものがあること (Peng et al., J Pathol, 2003; 2004;)、②そ

れらの間で、細胞間接着 (Nakamura et al., J Pathol, 2005)、*TP53* 変化 (Yoshimura et al., Pathobiology, 2006)、腸発現 (Natsagdorj et al., Histopathology, 2008) のパターンが異なること、である。分化型腺癌由来ではこれらの発現パターンが腫瘍内で比較的均一であることから、ゲノムレベルで変化が固定されていること、一方印環細胞癌由来では、腫瘍内で (浸潤性の程度と必ずしも関係せず) 組織環境によって可逆的に変化することから、epigenetic なメカニズムが関わっていることが示唆された。また E-cadherin の発現からみた細胞間接着は必ずしも浸潤性を反映しないことを明らかにしていたので、浸潤により直接関わっていると考えられる、癌細胞と間質との相互作用にかかわる種々のインテグリンの発現を検討することが課題となっていた。

更に、③これまで食道扁平上皮癌やその培養株を使い、種々の epigenetic な変化を、遺伝子のコピー数と発現との間の discordance として全体的に捉え、進展との関係や系譜による違いを明らかにしてきた。即ち、ゲノムコピー数は変わらないまま発現が低下する場合 (negative induction) は、DNA やヒストンのメチル化が、ゲノムコピー数が増加したのに、発現は正常かそれ以下である場合 (negative compensation of genomic dosage) では、ヒストンの脱アセチル化が働いていることを、染色体レベル、遺伝子レベルで明らかにした (Ling et al., 投稿中)。

以上の3点を基盤に、本研究では、印環細胞癌由来と分化型腺癌由来の未分化型胃癌を対比しながら、EMT を通じて浸潤性に関わるインテグリン遺伝子の腫瘍内発現を明らかにし、さらにアレイ CGH によるインテグリン遺伝子コピー数のデータと対比することによって、遺伝子コピー数と発現との間の discordance として認識できるエピジェネティックな調節が未分化型胃癌の進展にどのように関わっているのかを明らかにしようとした。

2. 研究の目的

本研究では、①アレイ CGH で E-cadherin、腸型関連遺伝子、インテグリン遺伝子のコピー数と免疫組織化学によるタンパク発現を比較し、進展とともにゲノムコピー数非依存性遺伝子発現が低下し、ゲノムコピー数依存性遺伝子発現が亢進するかどうかを確認すること、②浸潤性にかかわる癌細胞間相互作用が、由来の異なる未分化型胃癌の間で異なるかどうかを、上皮間葉転換 (EMT) の解析を中心に明らかにすること、を目的とした。

3. 研究の方法

①材料：最終的に、(粘膜内に層構造を持つ) 印環細胞癌由来の未分化型胃癌 20 例と (層構造を示さず、腺管成分を持つ) 分化型腺癌由来の未分化型胃癌 9 例、および分化型腺癌 27 例を用いた。いずれも早期および進行期症例を含む。

②アレイ CGH：ホルマリン固定、パラフィン包埋切片の複数箇所 (粘膜部、粘膜外浸潤部、非腫瘍部) からレーザマイクロダイセクションにより DNA を抽出、精製後、全ゲノム増幅 (WGA2, SIGMA) 後に非腫瘍部及び腫瘍部 DNA をそれぞれ cy3、cy5 で標識し、アジレント社の 60K オリゴ CGH マイクロアレイに対して hybridize した。アジレント社のアレイスキャナで蛍光イメージを取り込み、Feature Extraction Ver. 9.5.3 により、遺伝子コピー数を計算、 $\log_2 T/R > 0.3219$ を gain、 $\log_2 T/R < -0.3219$ を loss とした。アレイ解析結果は、クラスター解析 (Cluster 3.0, complete linkage) を行った。

③免疫組織化学：E-cadherin、腸型関連遺伝子はホルマリン固定、パラフィン包埋切片に酵素抗体法 (Histofine、ニチレイ) で染色。インテグリンは凍結切片をアセトン固定後、アルカリフوسفターゼ・抗アルカリフوسفターゼ (APAAP) 法で染色。そのさい、インテグリンは間質細胞にも発現するものがあるので、癌細胞での発現を評価するために、サイトケラチンとインテグリンの二重染色と、結果の定量的解析を行った。

4. 研究成果

①分化型胃癌での *TP53*、*MYC*、インテグリン、カドヘリン、腸型関連遺伝子のコピー数：研究期間の前半は、(予想されたことではあったが) 未分化型胃癌のレーザマイクロダイセクションからの DNA 抽出に難渋し、繰り返し採取してもなかなかアレイ解析ができる程、量的に十分な DNA が採取できず、やむなく DNA 抽出の容易な分化型胃癌でアレイ CGH 解析を進めた。しかしながら、これによって、胃癌の進展パターンと遺伝子コピー数変化との間に、意外にも明瞭な関係があることが分かった。これまでの胃癌の染色体 CGH で最も高頻度に変化していた *MYC* と *TP53* に注目したところ、*MYC*⁻ かつ *TP53*⁺ が粘膜内癌 13 例中 9 例で見られ、これを dormant パターンと名づけた。一方、*MYC*⁺ もしくは *TP53*⁻ のいずれかを示すものは進行癌 10 例の浸潤部では 7 例に見られ、これを aggressive パターンと名づけた。進行癌の浸潤部には、今のところ dormant パターンは見つかっていない。更に、上皮間葉転換 (EMT) にかかわるインテグリンとカドヘリン (*ITGA1*、*ITGA2*、*ITGA5*、*ITGA6*、*CDH1*) だけでなく *REG4*、*CDX2*、*MUC2*、*MME* (CD10) 等腸型関連遺伝子にも注目すべきことが明らかになった。EMT については、dormant な

腫瘍では上皮性インテグリンのコピー数の減少が、aggressiveな腫瘍では間葉性インテグリンのコピー数の増加が見られた。*CDH1*は分化型腺癌ではdormantパターンをとるものほとんどでコピー数が減少していたが、aggressiveパターンをとるものではコピー数の増加または減少が見られ、一定しなかった。腸型形質については、dormantな腫瘍では腸型遺伝子のコピー数減少、aggressiveな腫瘍では逆にコピー数の増加がみられる傾向があった。

②分化型胃癌での腸型関連遺伝子のコピー数と発現との関係：

早期、進行期にかかわらず、dormantパターンとaggressiveパターンをとる部位との間でMUC2またはCD10陽性となる割合はほとんど変わらなかった ($P=0.93$) が、陽性の腫瘍の中での両遺伝子コピー数は、dormantパターンをとったサンプルのすべてで減少、aggressiveパターンをとったサンプルで増加するものが多かった ($P=0.0026$)。コピー数が増加したaggressiveパターンを取ったサンプルでは、遺伝子コピー数と遺伝子発現が平行して増加していたものは粘膜内癌で少なく (20%) 進行癌で多かった (71%)。以上から、dormantパターンをとるものではepigeneticな発現調節が良く保たれているのに対し、aggressiveパターンをとるものでは低下している可能性が考えられた。aggressiveパターンを取る腫瘍はこのepigeneticな発現調節が進展とともに低下するために、最終的にゲノム変化が発現するに至ると考えられた。

③未分化型胃癌でのインテグリン、カドヘリン、腸型関連遺伝子の発現：

癌細胞では浸潤とともに上皮性インテグリンサブユニット ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 4$) を失い、間葉性インテグリンサブユニット ($\alpha 1$, $\alpha 5$) の発現が亢進することを明らかにした。これは癌の上皮間葉転換 (EMT) を反映していると考えられる。またこのEMシフト以外に、 $\beta 1$ から αV グループへの脱分化シフトも早期癌より進行癌でより顕著に見られた。凍結切片で、カドヘリンは、Eカドヘリン、Pカドヘリン、LIカドヘリンを調べた。早期癌より進行癌で発現低下が顕著であったのは、PカドヘリンとEカドヘリンの細胞外ドメインであった。今回は、浸潤先進部の解析が中心であったため、ホルマリン固定・パラフィン包埋切片で確認していた、粘膜下層浸潤部でのEカドヘリン細胞外ドメインの発現亢進 (Nakamura et al., J Pathol, 2005) は検出できなかった。ゲノムコピー数との比較も粘膜部と浸潤先進部で行なった。

腸発現は、層構造 (LS) のある未分化型胃癌では、粘膜内でのサイズ依存性の腸型発現

の増加、深部浸潤に伴う腸型発現の低下が見られたが、分化型腺癌由来の未分化型胃癌では、粘膜内から腸型発現がしばしば見られ、浸潤に伴う有意な発現低下が見られなかったことを報告している (Natsagdorj et al., Histopathology, 2008) が、今回、その時に用いた材料からアレイCGH用にDNAのサンプリングを行なった。

④未分化型胃癌での *TP53*、*MYC*、インテグリン、カドヘリン、腸型関連遺伝子のコピー数：研究期間の後半になって、マイクロダイセクションの精度が上がり、時間をかけて採取量を大幅に増やすことによって、未分化型胃癌でもアレイCGH解析が可能になった。その結果、遺伝子コピー数変化の方向もaggressiveパターンが多く、分化型粘膜内癌の約70%で見られたdormantパターンは、検索した未分化型粘膜内癌8例中に1例も見出せなかった。分化型でdormantパターン (*MYC*-/*TP53*+) とaggressiveパターン (*MYC*+ and/or *TP53*-) との間で逆のコピー数変化を示した、EMTや腸形質等に関連する遺伝子のコピー数解析およびクラスター解析を行った。層構造のある未分化型胃癌でも、層構造がなく腺管成分のある未分化型胃癌でも、EMTに関連する遺伝子のうち、*CDH1*にはあまり変化はなく、*ITGA6* (上皮性) と *ITGA5* (間葉性) は粘膜内癌の多いクラスターで、それぞれコピー数増加と減少を示し、浸潤癌の多いクラスターでは逆に、それぞれ減少と増加を示し、分化型と基本的に同様であった。一方、腸型関連遺伝子では、分化型で見られたような、aggressiveパターンでのコピー数の増加傾向が、層構造の有無に関わらず見られた。

⑤未分化型胃癌でのインテグリン、カドヘリン、腸型関連遺伝子のコピー数と発現との関係：

④の結果は、発現レベルで未分化型の粘膜内癌から浸潤部へ行くにつれてEMTが起こっていたこと (③) と平行していた。一方、腸形質の遺伝子は特に *MUC2* で、層構造の有無に関わらず未分化型胃癌全体でコピー数増加の傾向があり、印環細胞癌由来では浸潤癌と粘膜内癌との間でコピー数に大きな違いがなく、粘膜内での病変のサイズ依存性の発現亢進や浸潤部での腸形質の発現低下 (Natsagdorj et al., 2008) はepigeneticに調節されていると考えられた。

⑥プロモーターDNAのメチル化の技術レベルを上げるために、マイクロサテライト不安定性と *hMLH1* のプロモーターメチル化の腫瘍内多様性を調べた。その結果、*hMLH1* のプロモーターメチル化の蓄積が時間依存性、局所的に起こり、late eventとしてマイクロサテライト不安定性が獲得されることに起因するこ

とが分かり、Cancer Letters に論文として掲載された。

⑦以上の成果の意義と今後の展望：

未分化型胃癌のアレイ CGH 解析の技術的な困難さのために、より技術的に容易な分化型胃癌のデータもあわせて得ることができ、分化型と未分化型を比較することができた。

未分化型では、「研究の目的」の①に書いた)当初の予想に反して、(層構造を含む)粘膜内癌からゲノムコピー数依存性に遺伝子が発現する傾向があった(成果⑤)。一方、コピー数変化のパターンは aggressive パターンが多く、dormant パターンが見られなかった。つまり、分化型はゲノムレベルで2つの系譜が識別できたが、未分化型はゲノムレベルでは粘膜内癌から進行癌と共通した遺伝子コピー数変化を示す単一の系譜に属すると推定された。振舞いとして dormant な層構造でも基本的に aggressive なコピー数変化が既に存在していたが、epigenetic に補正されていると考えられた。したがって、初期には aggressive なゲノム変化のパターンが epigenetic に補正され、進展とともにその補正が外れてゲノムコピー数を反映した aggressive パターンが発現されるに至るという現象は、分化型、未分化型に共通で、また食道扁平上皮癌でも同様の結果を得ていること(Ling et al. 投稿中)から、かなり一般的な現象である可能性がある。もしそうであれば、これらは遺伝子発現パターンの将来像を遺伝子コピー数パターンとして見ることで、(胃癌にとどまらず、種々の臓器の)早期癌の進展リスクを診断することに根拠を与えることになる。

早期胃癌の治療を、進展リスクに応じたものに改善する上で、不可逆的なゲノム変化に基づく、このようなリスク診断が今後重要になるであろう。問題は、どのような遺伝子を進展リスク評価に使うべきかである。我々は、胃癌で最も高頻度にコピー数が変化している *MYC* と *TP53* から aggressive パターンと dormant パターンを定義することから出発したが、これだけでは分類不能と判定される検体が、分化型の40検体中10検体を占めた。これらの2遺伝子にどのような遺伝子を加えたら分類不能をなくすことができるか、この診断を実用化する上で重要な問題である。本研究では、この点について、以下の遺伝子を検討した。

腸型関連遺伝子は、分化型胃癌では aggressive パターンでコピー数の増加、dormant パターンでコピー数の減少と、正反対の変化が見られた。未分化型胃癌では、分化型由来でも印環細胞癌由来でもコピー数が増加し、浸潤癌と粘膜内癌との間でも大きな違いが無く、未分化型全体として aggressive パターンであることに対応していると考えら

れた。

浸潤性にかかわる EMT 関連遺伝子のうち、細胞間接着にかかわる *CDH1* は分化型腺癌では dormant パターンでコピー数が減少していたものの、aggressive パターンでは一定の傾向を示さなかった。未分化型では、層構造のない分化型腺癌由来で genetic に発現が固定されていることを予想していたが、実際は、層構造の有無に関わらず、*CDH1* のコピー数変化自体が少なく、腫瘍の進展に伴う E-カドヘリンの発現変化(Nakamura et al., J Pathol, 2005)は、epigenetic な調節によることが示唆され、*CDH1* のコピー数は、進展リスク診断にはあまり有用ではないと考えられた。一方、EMT の中で細胞間質相互作用に関わるインテグリン遺伝子のコピー数は、印環細胞癌由来でも分化型由来でも、発現と平行し、ゲノムコピー数依存性に、進展と共に EMT が進む方向に変化しており、ゲノム変化が先行する不可逆的な変化として浸潤性により密接に関わっていると推定され、進展リスク診断にも有用な遺伝子と考えられた。

MYC、*TP53* に腸型遺伝子を加えることによって、aggressive パターンと dormant パターンの識別率が上がること、また *ITGA6* (上皮性)と *ITGA5* (間葉性)を加えることによって、基本的に aggressive パターンを示す未分化型胃癌を進展リスクの違いにより更に亜分類できることにより、より適切な治療方針の選択が可能になることが期待される。

まとめると、腫瘍の進展とともに epigenetic な調節が外れることによってゲノムコピー数を反映した遺伝子発現パターンになることを示唆するデータが得られた。この性質を利用すれば、特定の遺伝子のコピー数変化のパターンから腫瘍の進展リスクを診断できる可能性があり、国内外に類を見ない、新たな研究領域を提示できた。胃癌では、遺伝子発現の将来像としてのゲノム変化が起こっている候補遺伝子として、*MYC*と *TP53*に加えて、分化型では腸型関連遺伝子、EMT 関連遺伝子等、未分化型ではインテグリン遺伝子が該当した。これらを使った進展リスク診断を低いコストで実用化することが次の課題である。

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5件)

- ① 杉原洋行、コピー数変化を使った早期胃癌の進展リスク評価. 生体の科学、62巻、541-545、2011、査読無
- ② Nakayama T, Ling ZQ, Mukaisho K, Hattori T, Sugihara H. Lineage analysis of early and advanced tubular

adenocarcinomas of the stomach: continuous or discontinuous? BMC Cancer 10: 311, 2010、査読有

- ③ Ling Z-Q, Tanaka A, Li P, Nakayama T, Fujiyama Y, Hattori T, Sugihara H. Microsatellite instability with promoter methylation and silencing of hMLH1 can regionally occur during progression of gastric carcinoma. Cancer Letters 297: 244-251, 2010、査読有
- ④ 杉原洋行、がんの進展と DNA ploidy の変化. Cytometry Research、20 巻、49-56、2010、査読有
- ⑤ Yanchenko N, Sugihara H, Hattori T. Application of a novel method of double APAAP staining with subsequent quantitative image analysis to the examination of integrin expression in undifferentiated-type gastric carcinomas. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 57: 1183-1193, 2009、査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① Sugihara H, Relationship of gene copy number and gene expression in gastric carcinoma. 第 8 4 回日本胃癌学会総会、2012. 2. 9、大阪
- ② 杉原 洋行、仲山貴永、向所賢一、遺伝子コピー数変化からみた早期胃癌の進展リスク評価. 第 2 2 回日本消化器癌発生学会総会、2011. 11. 25、佐賀
- ③ 杉原 洋行、仲山貴永、向所賢一、早期胃分化型腺癌の進展に関連する遺伝子コピー数変化の特徴、第 2 1 回日本サイトメトリ学会学術集会、2011. 6. 25、京都
- ④ Sugihara H, Genetic lineage analysis for prognostic evaluation of early gastric cancers. The 8th Pathology Conference (招待講演)、2011. 5. 19、Hochiminh (ベトナム)
- ⑤ 仲山貴永、向所賢一、服部隆則、杉原洋行、胃分化型胃癌の系譜解析: アレイ CGH を用いた早期癌と進行癌の比較、第 1 0 0 回日本病理学会総会、2011. 4. 28、横浜
- ⑥ 仲山貴永、向所賢一、服部隆則、杉原洋行、胃分化型腺癌の系譜解析: アレイ CGH を用いた早期癌と進行癌の比較、第 8 3 回日本胃癌学会総会、2011. 3. 5、三沢
- ⑦ 仲山貴永、向所賢一、服部隆則、杉原洋行、アレイ CGH を用いた胃分化型腺癌の系譜解析: 進行癌と早期癌の比較、第 2 1 回日本消化器癌発生学会総会、2010. 11. 18、軽井沢
- ⑧ 仲山貴永、凌志強、向所賢一、服部隆則、杉原洋行、Array CGH による早期および進

行期分化型腺癌の系譜解析、第 6 9 回日本癌学会学術総会、2010. 9. 23、大阪

- ⑨ 仲山貴永、杉原洋行、凌志強、向所賢一、服部隆則、粘膜内および進行期分化型胃癌の染色体解析、第 9 9 回日本病理学会総会、2010. 4. 27、東京
- ⑩ Yanchenko N, Sugihara H, Hattori T. Correlation of EMT with mucin and integrin phenotype alterations in undifferentiated gastric carcinomas. 第 68 回日本癌学会総会、2009. 10. 2、横浜

[図書] (計 3 件)

- ① Yanchenko N, Sugihara H. InTech, Integrin and cadherin expression and undifferentiated-type gastric carcinoma diversity. In: Gastric Carcinoma - Molecular Aspects and Current Advances, 2011, 105-122
- ② 馬場正道、杉原洋行、文光堂、層構造 [第 6 章 胃] 病理形態学キーワード (病理と臨床 2 8 巻臨時増刊号)、2010、116-117
- ③ 杉原洋行、文光堂、腫瘍鑑別診断アトラス 胃癌、2009、75-84

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqpathol/research/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉原 洋行 (SUGIHARA HIROYUKI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30171169

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

向所 賢一 (MUKAISHO KEN-ICHI)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50343223