

機関番号：24303

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790681

研究課題名（和文）膵臓癌における染色体異常の網羅的解析および融合遺伝子の探索

研究課題名（英文） Analysis of Recurrent Chromosomal translocation of Pancreatic Cancer

研究代表者

吉田 直久 (YOSHIDA NAOHISA)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：50340089

研究成果の概要（和文）：

膵臓癌において網羅的染色体転座の解析を行った。8p12 に位置する NRG1 が膵臓癌においても関連する可能性を考えた。

研究成果の概要（英文）：

Cytogenetic Analysis of Pancreatic Cancer using Spectral Karyotyping and Fluorescence in situ hybridization was performed. The NRG1 at 8p12 was considered as one of candidate genes of pancreatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
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：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胆道学、膵臓学

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍や骨軟部肉腫では、これまでに多くの病型特異的な染色体異常が同定され、その切断点から BCR-ABL を代表とする融合遺伝子が多数単離されており診断・治療に応用されている。さらに最近では、前立腺癌におけるアンドロゲン調節遺伝子 (TMPRSS2) と ERG や ETV1 との融合遺伝子や肺癌における EML4-ALK 融合遺伝子が相次いで報告された (Science. 310:644-8, 2005) (Nature. 448:561-6, 2007)。一方消化器癌では現在のところ融合遺伝子の報告はないが、我々はそ

の存在を強く推定している。しかしながら消化器癌の染色体異常は複雑でありその解析は困難とされている。そこで我々は、消化器癌の中で予後不良とされる膵臓癌において独創的手法で染色体解析を行った。また、他の遺伝子においても融合遺伝子の存在が推定でき、これまで膵臓癌において研究がすすめられている p53 や K-RAS などとは全く異なる新しい発癌のメカニズムが判明することとなる。それにより飛躍的に病態の解明がなされれば膵臓癌の予後が改善できる可能性があると考え研究を進めている。

2. 研究の目的

膵臓癌における網羅的染色体解析を行う。また 8p12 に存在する特異的染色体転座による NRG1 の融合遺伝子を同定するため SKY 法、ゲノムアレイ法および cDNA バブル PCR 法を併用し転座相手遺伝子の解析をすすめていく。本研究は、膵臓がんにおける新しい予後因子や治療の指標になる可能性がある未知の染色体転座関連遺伝子などのバイオマーカーを同定することが目的としている。同定できた染色体転座関連遺伝子の消化器癌発生における役割を検討し、多数例での臨床的意義の解析を行う。

3. 研究の方法

1. 膵臓癌における複雑な染色体転座について対象数を増やし解析を行うために、我々がこれまでに造血器腫瘍の染色体解析に用いてきた確立された手技を用いて染色体標本の作成を行う (Genes Chromosomes Cancer. 26: 336-45, 1999)。対象として膵臓癌細胞株および病理組織学的に膵臓癌と診断された患者腹水中の腫瘍細胞を用いて染色体標本を作製し、SKY (spectral karyotyping) 法で網羅的に染色体転座を解析する。具体的には、腫瘍細胞をコルセミドにて処理し、分裂期核の腫瘍細胞を多数作成し、その後 KC1 にて低張処理を行う。得られた染色体検体を固定し、プレパラートに染色体を展開し標本を作成する。蛍光プローブを用い各々の染色体を染め分ける SKY 法を施し蛍光顕微鏡にて karyotype を決定する。

2. 腫瘍細胞より抽出した genomic DNA を高密度オリゴヌクレオチドアレイ (Affymetrix, Human mapping 250K array) を用いてゲノムコピー数を解析し SKY 法のデータと比較し特異的染色体転座における切断点の詳細な同定および相手候補遺伝子の同定を行う。

3. 得られた染色体転座点に存在する遺伝子の両端を認識する赤および緑の特異的蛍光プローブを用いて FISH 法を用いてその遺伝子内での切断を確認する。

同定しえた染色体転座関連遺伝子において mRNA レベルでの発現を正常膵組織および腹水腫瘍細胞において RT-PCR を用いて行う。

4. 同定しえた染色体転座関連遺伝子について cDNA バブル PCR 法を用いて相手遺伝子の探索を行う (後述文献 1)。

5. 膵臓癌における染色体転座による融合遺伝子が同定されれば Southern blot 法を用いてゲノム上の切断点の確認を行う。また in vitro の発現系を用いて細胞の増殖または分化への影響を検討する。

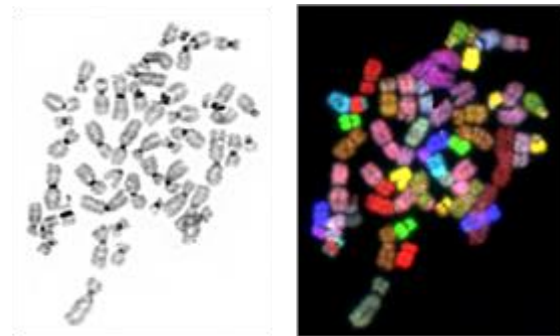
6. 多数の膵臓癌臨床検体において同定した融合遺伝子の有無を FISH 法および PCR 法を

用いて確認し、その頻度について解析する。

4. 研究成果

spectral karyotyping (SKY) 法、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて網羅的染色体転座の解析を施行した(下図)。

細胞株における SKY 像の実例 1



Spectral karyotyping :

39, der (X) t (X;21) (q28;q11.2), -1, der (3) t (3;21) (p12;q22.1), -4, del (5) (q11.2q31), +der (5) t (5;22) (q11.2;q11.2), -6, del (7) (q32), +der (7) t (3;7) (p13;p13), del (8) (p11.2), der (8) t (8;18) (q13;q12), +del (8) (p11.2) (q11.2), del (9) (q13), -10, -11, -11, del (12) (q13), -13, der (14) t (7;14) (q11.2;q32), t (14;20) (q24;p11.2), del (16) (p11.2), der (17) t (3;17) (p21;q25), der (18) t (7;18) (q11.2;q12), der (18) t (17;18) (q21;q21), del (21) (q22.1), -22

細胞株における SKY 像の実例 2

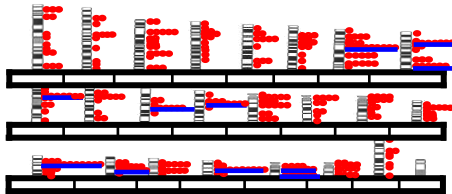
Spectral karyotyping :

57, X, -X, der (1) (1qter->1p32-36.1;:6q27->6p21.3), der (3) t (X;3) (p11.2;p25), i (5p), del (6) (p21.3), +7, +i (8q), +9, der (9) t (9;17) (p13;q21) x2, +der (10) t (10;15) (p11.2;q24.1), +11, +der (12) t (2;12) (q33;q13), dic (7;13) (q32;p11.2), +der (13) t (13;21) (q12;q22), +der (13) (20qter->20q13.1;:13q14->13p11.2;:12q15->12qter), der (14) t (14;16) (p11.2;q22), +der (15) (15qter->15p13;:7;:13q14->13q32;:2q11.2->2q37;:3p21->3p25;:Xp11.2->Xp22.3;:11p11.2->11qter), -18, del (19) (p13.1) x2, +der (20) (20p12->20q11.2;:13q14->13q32;:2q11.2->2pter), der (22) t (16;22) (q11.2;p1

1. 2), +der(22)t(14;22)(q11.2;p13),
+dim(no. 13) (15)

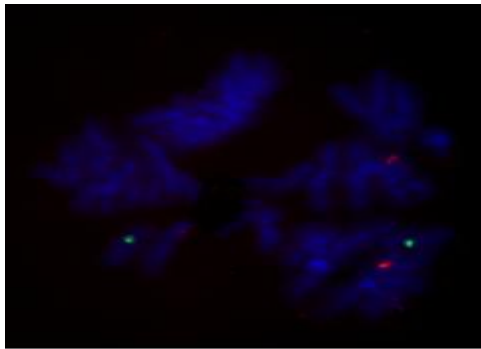
このような複雑な染色体転座を部位 10 個の細胞株について網羅的に解析し転移部位を示した。

染色体転座部位



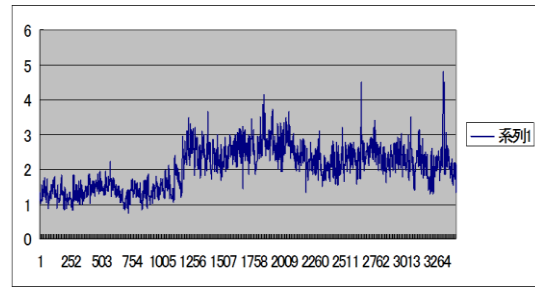
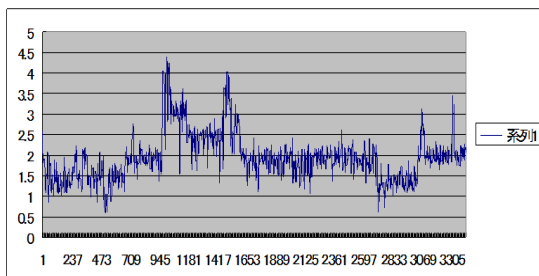
また実際に転座の詳細を解析するため FISH 法での確認を行った。

FISH 像の一例



その中で高頻度に染色体異常を認めた部位の一つである 8p12 に位置する乳癌において融合遺伝子が報告されている NRG1 が膵臓癌においても関連する可能性を考えゲノムアレイ法および FISH 法で詳細な染色体切断点を解析した。8P12 に存在する NRG1 は細胞株 22 株中の 2 株 (9%) において、NRG1 内でゲノム切断が認められた。

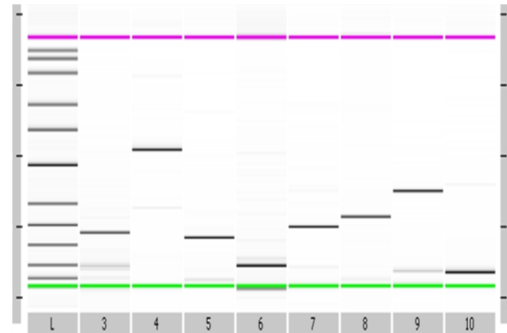
陽性例のゲノムアレイ像



その 2 例について NRG1 に対して染色体転座関連遺伝子について FISH 法にて NRG1 遺伝子のスプリットを確認した細胞株について、詳細な解析を行い t(8;17)(p11.2;q23)、t(8;18)(p23;q12) を有した細胞株 A と t(7;8)(q11.2;p11.2) i(8q) を有した細胞株 B について、細胞株 A ではエクソン 1 の近傍に、一方、細胞株 B での切断点は、エクソン 9 から 17 の間に切断点が存在することを明らかにした。

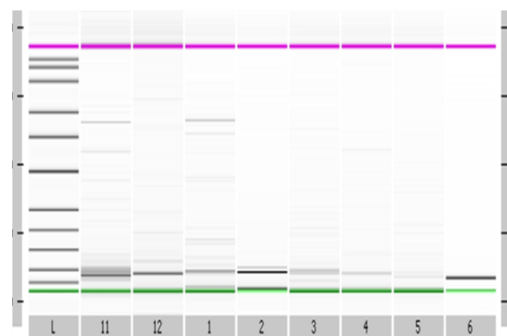
さらに対象の細胞株についての NRG1 の発現を解析した。NRG1 は 10 種類以上の isoform が報告されているため各 isoform を網羅するようにプライマーを設定し RT-PCR にて検討を行った。

陽性例 1 RT-PCR 結果



と陽性例 1 では発現を認めある種の isoform が考えられた。

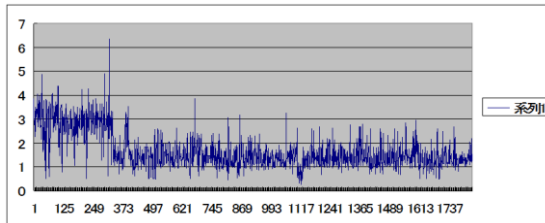
陽性例 2 RT-PCR 結果



陽性例 2 は発現を認めなかった。

さらに 8 番染色体、17 番染色体、および 18 番染色体に予測される転座関連遺伝子を探索するために cDNA バブル PCR 法を用いて相手遺伝子の探索を行った。

特に 18 番染色体についてはゲノムアレイ法にて数のように詳細な切断が解析しえた。



バブル PCR を用いて候補である複数の遺伝子について bubblePCR を行ったが有意な相手電子の同定には至っていない。現在さらなる解析を行っている。

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 3 件)

1. Yoshida N, Naito Y, Kugai M, et al. Efficacy of Magnifying Endoscopy with Flexible Spectral Imaging Color Enhancement in the Diagnosis of Colorectal Tumors. Journal of Gastroenterology、査読有、46 巻、2011: 65-72

2. Yoshida N, Naito Y, Sakai K, et al. Outcome of endoscopic submucosal dissection for colorectal tumors in elderly people. International Journal of colorectal disease、査読有、25 巻、455-460

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 直久 (YOSHIDA NAOHISA)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：50340089