

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25年6月3日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590314

研究課題名（和文） 肺癌ゲノム異常の解析とその臨床応用に関する研究

研究課題名（英文） Genomic analysis of lung cancer and its application to clinical medicine

研究代表者

河内 茂人 (KAWAUCHI SHIGETO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80284511

研究成果の概要（和文）：癌の発生進展に関与する全ゲノム網羅的なゲノム DNA コピー数異常、遺伝子プロモーターメチル化異常を解析し、相互関係を統計的に解明することにより、患者の治療や管理のために有用な情報を得るための分子遺伝学的検査法の開発を目的とした。末梢型腺癌 80 例以上の解析を予定していたが、研究の遂行が遅延したため現在までに約 30 例の解析が終了している。今後とも研究目的を達成すべく研究を継続する予定である。

研究成果の概要（英文）：Whole genome DNA copy number aberration and promoter CpG methylation, which generally influences the progression of cancer, were used to analyze the sample genomic DNA extracted from the lung cancer tissues that were surgically resected from the patients. The aim of the present study was to elaborate a clinical test that aids the prognostic estimation and therapeutic selection. At present, approximately 30 lung cancers have been analyzed. Further analysis is required to complete the study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：肺癌、アレイ CGH、ゲノム不安定性、エピジェネティクス、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

どのような癌もゲノム不安定性に由来する遺伝子、染色体の異常を基盤として発生すると考えられている。加えて癌の発生には、遺伝子プロモーター CpG 領域メチル化（以下、プロモーターメチル化）等のエピジェネティ

ックな遺伝子発現調節機構における異常の関与が重要であり、癌はこれらの異常の蓄積の結果として発生進展すると考えられている。しかし、同一臓器かつ同一組織型の癌の範疇においても、その発生進展に関与するこれらの異常には個々の癌毎に相違があり、それらの異常と癌の臨床病理学のおよび腫瘍

生物学的特徴を明らかにすることは、「根拠に基づいた医療」 evidence-based medicine の実践のためにも重要であると考えられる。

これまでにわれわれは、古典的染色体 CGH 法を用いた癌の分子遺伝学的研究を、肺癌を含めたヒト悪性腫瘍を対象に行なってきた。本来 CGH 法は癌の発生、進展に関連する染色体 DNA コピー数の増加、減少等の異常をスクリーニング的に検索するための技術として開発されたものである。アレイ CGH 法の登場により癌ゲノム DNA コピー数異常の解析精度は、最高で数 kb にまで向上し、1 から少数個の遺伝子 DNA のコピー数異常を一度の解析で全ゲノム領域にわたり網羅的に検出することが可能となり、真に癌の発生進展に関与する遺伝子(群)の同定が可能となった。

癌遺伝子や癌抑制遺伝子の発現調節機構異常を引き起こす主要な原因のひとつとして、遺伝子 DNA コピー数変異とともに、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構の異常が指摘されているが、このようなエピジェネティックな遺伝子発現調節機構異常の代表として、遺伝子プロモータメチル化が挙げられる。これまでに開発されてきたプロモータメチル化解析法は、個々の遺伝子プロモータ DNA CpG 集積領域のメチル化解析に主眼をおいた方法が主流であったが、近年、DNA メチル化の網羅的解析技術が開発されている。DNA メチル化網羅的解析法は、アレイ CGH 法との併用により癌の細胞遺伝学的発生進展過程解明のために極めて有用であると考えられる。

2. 研究の目的

肺癌の凍結組織材料を用いてアレイ比較ゲノム交雑法(アレイ CGH)法による解析を行い、癌の発生進展に関与する遺伝子(群)を同定する。対象とする肺癌は外科手術の適応となる頻度の高い末梢型腺癌で、80例以上を目標とする。その結果から、リンパ節転移、再発、患者予後等臨床事項に関連の深い遺伝子変化を統計的に検索し、リンパ節転移予測や患者予後推定への臨床応用を行う。肺癌の凍結組織材料より抽出したゲノム DNA を用いて、アレイ比較ゲノム交雑法(アレイ CGH)法および DNA メチル化アレイ解析法(MIAMI法)により、癌の発生進展に関与する遺伝子群の DNA コピー数異常およびメチル化異常を全ゲノム網羅的に検索する。その結果をもとに、リンパ節転移、再発予後、生命予後等、患者の臨床経過に関連の深い遺伝子 DNA コピー数異常や CpG メチル化異常を同定し、相互関係を統計的に解明することにより、術前患者の臨床経過予測や術後追加治療法選択等の、治療方針決定のために有用な情報を得るための検査法の確立を目指す。

3. 研究の方法

アレイ CGH 法および網羅的 DNA メチル化アレイ解析法の併用により、肺癌の発生進展に関与する遺伝子(群)の解明と、そのジェネティックおよびエピジェネティックな異常に対する高精度かつ網羅的な解析が可能となれば、解析結果の臨床応用も含め包括的な肺癌研究のために利するところが大きいと考えられる。今回の研究では、肺癌の凍結組織材料より抽出したゲノム DNA を用いて、アレイ CGH 法および、DNA メチル化アレイ解析法のうち全ゲノム領域の解析が可能である MIAMI 法を用いて、癌の発生進展に関与する遺伝子(群)の DNA コピー数異常ならびにメチル化異常を全ゲノム領域に渡り網羅的に解析する。対象とする肺癌は、外科手術の適応となる頻度の高い末梢型腺癌を中心とする。今回の研究では 80 例以上の解析を予定している。その結果から、リンパ節転移、再発、患者予後等、肺癌治療上重要な臨床事項に関連の深い遺伝子 DNA コピー数異常や DNA メチル化異常、それらの間の相互関係を統計的に解明し、患者予後を含めた臨床事項の予測や治療法選択のための簡便な分子遺伝学的検査法の確立、ならびに臨床管理、治療の指標となるアルゴリズムの作成を行なう。

4. 研究成果

平成 22 年度は主にアレイ CGH 法による解析を行なう予定であったが、実質的な研究開始は 23 年度以降となった。対象には、肺癌のうち外科手術の適応となる頻度の高い腺癌を中心とした。術前治療を受けていない患者から外科的に切除された凍結癌組織材料による 80 例以上の解析を予定した。

アレイ CGH 法は、検体ゲノム DNA の増加、減少、欠失等の異常を、スライド上に貼付するターゲット DNA に対応する全ての領域について、一回の解析で網羅的に検索する分子遺伝学的解析法である。今回のアレイ CGH 法の施行にあたっては、約 4200 個の BAC を貼付した MacroGen 社製 BAC アレイスライドを用いた。アレイ CGH 法の解析精度は最高で数 Kbp[ベースペア]であり、従来の方法に比較し、解析精度飛躍的向上が達成された。われわれの行うアレイ CGH 法は、次の行程からなる。

- (1) 凍結癌組織材料からのマイクロダイセクション法による癌細胞核 DNA(検体 DNA)の抽出。
- (2) 検体 DNA を蛍光色素 Cy5、正常ヒト・リンパ球 DNA(対照 DNA)は蛍光色素 Cy3 で標識の後、両者をブロッキング DNA と混合し、CGH プローブの作製。
- (3) CGH プローブをアレイスライド上でハイ

ブリダイゼーション。レーザーキャナーで蛍光画像の取込み(図1左)。
(4)専用ソフトウェアで解析(図1右)。

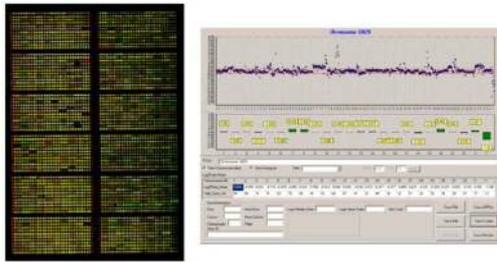


図1. アレイスライドの蛍光画像(左)と、その解析結果(右)

ゲノム遺伝子プロモーターCpG領域の網羅的解析は、当初DNAメチル化アレイ法(Microarray-based Integrated Analysis of methylation by Isoschizomers; MIAMI)により行う予定であった。平成24年度に、本法によるゲノム網羅的DNAメチル化解析を試みたが、結果の再現性に問題のあることが判明し、急速、網羅的DNAメチル化解析法として実績のあるメチル化DNA免疫沈降法(MeDIP-chip法)を採用することとした。MeDIP-chip法は、抗5'-メチル化シチジン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、5'-メチル化シチジンの豊富な領域を選択的に抽出し、遺伝子CpG領域をターゲットとしたマイクロアレイ上でハイブリダイゼーション、検出を行うものである。現在、肺癌組織より抽出したゲノムDNAを用いて、MeDIPchip法により肺癌の発生進展に関与する全遺伝子CpG領域メチル化異常の網羅的解析を行ない、約30例の解析を完了した。当初の研究目的を達成するためには、80例以上のメチル化異常解析を完了し、その結果をもとにリンパ節転移、再発予後、生命予後等との関連の深いCpGメチル化異常を同定し、さらに既に解析済みの肺癌ゲノムDNAコピー数異常との関係を統計的に評価する必要がある。

MeDIP-chip法は、CpGメチル化異常のスクリーニングを目的とした網羅的解析法である。したがって、メチル化異常として抽出された遺伝子プロモーター領域の確認検査が必要である。平成23年度後半には九州大学生体防御医学研究所の共同研究課題(九州大学・生体防御医学研究所ゲノミクス・エピゲノミクス共同利用課題)に採用され、次世代シーケンサーによるMeDIP法解析結果の評価、解析精度の確認を平行して行っている。

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5件)

- ① Ito H, Oga A, Furuya T, Ikemoto K, Amakawa G, Chochi Y, Kawauchi S, Sasaki K. Elucidation of proliferative capability of mononuclear tetraploid cells, emerging spontaneously from diploid cells, using image cytometry and fluorescence in situ hybridization. *Cell Prolif.* 2013; 46:356-363. 査読有
- ② Takizawa K, Nakashima T, Mizukami T, Kuramitsu M, Endoh D, Kawauchi S, Sasaki K, Momose H, Kiba Y, Mizutani T, Furuta RA, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Degenerate polymerase chain reaction strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus during blood screening. *Transfusion.* 2013; 17. doi: 10.1111/trf.12193. 査読有
- ③ Suehiro Y, Okada T, Shikamoto N, Zhan Y, Sakai K, Okayama N, Nishioka M, Furuya T, Oga A, Kawauchi S, Maeda N, Tamesa M, Nagashima Y, Yamamoto S, Oka M, Hinoda Y, Sasaki K. Germline copy number variations associated with breast cancer susceptibility in a Japanese population. *Tumour Biol.* 2013; 34: 947-952. 査読有
- ④ 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.* 2011; 86:192-198, 査読有
- ⑤ 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.* 2011; 25 :1603-1611. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- ① 河内茂人. 最近の婦人科病理の話題：細胞診と分子遺伝学的知見を加えて. 第27回日本臨床細胞学会中国四国連合会総会, 2012.7.29, ビッグハート出雲(島根)
- ② 河内茂人. 分葉状内頸部腺過形成、悪性腺腫、内頸部型粘液性腺癌の分子病理学的比較研究. 第26回日本臨床細胞学会九州連合会総会, 2011.9.3, 宮崎市民プラザ(宮崎)

〔図書〕(計1件)

- ① 河内茂人, 佐々木功典. 文光堂, 組織学的異型度(Grading). 腫瘍病理鑑別診断アトラス 卵巣腫瘍(本山悌一ほか編) 2012, p221-224,

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河内 茂人 (KAWAUCHI SHIGETO)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80284511

(2) 研究分担者

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