

## 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 4 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590335

研究課題名（和文） 膵癌前駆病変の悪性化に関わる第8番染色体短腕上の責任遺伝子の同定

研究課題名（英文） Identification of the responsible genes on 8p involved in the malignant transformation of the precancerous lesions in the pancreas.

研究代表者

泥谷 直樹 (HIJIYA NAOKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80305036

研究成果の概要（和文）：膵臓における前癌病変が、悪性化して浸潤癌になる過程で高頻度に失われるゲノム領域を明らかにした。さらに、その領域に存在する癌の悪性化に関わる責任遺伝子を抽出した。その遺伝子は、膵癌細胞に導入すると細胞周期を停止して増殖を抑制したことから、がん抑制遺伝子としての機能を有することが分かった。今後、この遺伝子およびその関連分子が膵癌の新規の診断法および治療法の標的分子となり得ることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Genomic region, which is frequently lost in the process of malignant transformation of pancreatic precancerous lesions was clarified. Furthermore, the responsible gene located on this region was identified. This gene was shown to function as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer by the finding that the introduction of this gene into pancreatic cancer cells had induced their cell cycle arrest followed by the decreased proliferation. It is expected in future that this gene and the related molecules can become a new diagnostic and therapeutic target of the pancreatic cancer.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：膵癌・がん抑制遺伝子・増殖

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌の5年生存率は極めて不良で10%未満に過ぎず、最も予後不良な癌の一つである。膵癌の発症メカニズムは不明であるが、種々の癌遺伝子(*k-ras*)や癌抑制遺伝子(*p16<sup>INK4a</sup>*, *p53*, *DPC4*, *BRCA2*)の異常が報告されており、他の癌と同様にゲノム異常が蓄積することによって発症するものと推測されている。一

方、膵癌の網羅的ゲノム解析もこれまでに多数報告されているが、そのほとんどが浸潤癌の解析であり、検出される多くのゲノム異常の中から発癌に関わるゲノム異常のみを抽出することは困難である。従って膵癌の発症メカニズムを解明するためには、膵癌の前駆病変のゲノム異常と浸潤癌のゲノム異常を詳細に比較検討することが必要である。

私は、既に予備実験によって、1) 19 例の通常型膵管癌とともに、2) 10 例の浸潤性 IPMN (上皮内腫瘍の一部が浸潤癌に進展している症例) の浸潤部分、3) 10 例の浸潤性 IPMN の非浸潤部分、4) 8 例の非浸潤性 IPMN (腫瘍が上皮内に留まり、浸潤していない症例) のゲノム異常を高解像度アレイ Comparative Genomic Hybridization (CGH) 法にて解析した。なお、間質細胞の混入を避けるために腫瘍細胞は Laser - Captured Microdissection (LCM) 法を用いて選択的に回収し、解析した。

この解析結果から以下の結論を得た。

- (1) 通常型膵管癌と浸潤性 IPMN の浸潤部はほぼ同様のゲノム異常パターンを示す。
- (2) 浸潤性 IPMN の浸潤部と非浸潤部で有意に異なるゲノム異常は、8 番染色体短腕 11. 22- テロメア末端 (8p11. 22-ter) の欠失のみである。
- (3) 浸潤性 IPMN の非浸潤部と非浸潤性 IPMN で有意に異なるゲノム異常は、1p36. 33, 1q21. 2-24. 1, 19q13. 2 の増幅と 4p15. 1, 4q13. 1-13. 2, 5q11-14. 1 の欠失である。

## 2. 研究の目的

私は以上の preliminary な研究成果から、8p11. 22-ter に存在し、欠失によって発現抑制を起こす遺伝子のなかに IPMN からの浸潤癌発生に重要な癌抑制遺伝子が存在するとの仮説を得るに至った。そこで本研究では、8p11. 22-ter に存在する癌抑制遺伝子の単離を目的とする。

私は既に、膵癌細胞株のゲノム異常も調べ、12 株中 8 株で 8p11. 22-ter の欠失を認めている。本研究ではこれらの細胞株を解析することで癌抑制遺伝子候補を単離、同定したいと考えている。

本研究では、今後、以下の項目について解析を進める。

### (1) 膵癌の進展に關与する癌抑制遺伝子候補の抽出

- ① アレイ CGH 解析で 8p11. 22-ter の欠失の有無を調べた 12 種の膵癌細胞株について、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析を行う。
- ② 8p11. 22-ter が欠失していない細胞株群に比べて欠失している細胞株群で発現が有意に低下している 8p11. 22-ter 上の遺伝子を、癌抑制遺伝子候補として抽出する。
- ③ アレイ解析で得られた結果の Validation を行う。具体的には、抽出された候補遺伝子について、膵癌症例における mRNA レベルおよびタンパクレベルの発現を、Real

time PCR 法および免疫組織化学法で調べる。

### (2) 癌抑制遺伝子の同定

① 候補遺伝子の発現が低下している 8p11. 22-ter 欠失細胞株に候補遺伝子を導入 (過剰発現) して、細胞形質に与える影響をみる。具体的には、細胞増殖能や細胞周期、浸潤能等を調べる。候補遺伝子が発現している細胞株には siRNA 導入により候補遺伝子をノックダウン (発現抑制) して、同様の機能解析を行う。

② ①で細胞形質に変化をもたらした候補遺伝子については、細胞株を免疫不全マウスに播種して in vivo における機能を調べる。以上の解析結果より癌抑制遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 膵癌細胞株の網羅的発現解析 と候補遺伝子の抽出

① 膵癌細胞株より mRNA 抽出キット (Qiagen, RNeasy Micro Kit) を用いて、mRNA を回収する。

② 回収した mRNA の品質評価を Agilent 2100 Bioanalyzer で行う。

③ mRNA を逆転写後、ラベル化してアレイ (Agilent, 4x44K 発現アレイ) とハイブリダイズする。

④ 発現解析ソフト (Agilent, GeneSpring GX) を用いて、8p11. 22-ter 欠失のない細胞と 8p11. 22-ter 欠失細胞の遺伝子発現を比較して、8p11. 22-ter 欠失細胞で有意に発現低下・消失している 8p11. 22-ter 上の遺伝子を癌抑制遺伝子候補として抽出する。

### (2) 膵癌組織における候補遺伝子の発現動態の確認

アレイ解析結果の Validation として、抽出された候補遺伝子が実際に膵癌組織で発現が低下・消失しているかを RNA レベル (Real time PCR 法) およびタンパクレベル (免疫組織化学) で確認する。

① 膵癌症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から腫瘍細胞を LCM 法で回収し、RNA 抽出キット (Qiagen, RNeasy FFPE Kit) を用いて RNA を抽出する。LightCycler 480 System (Roche) を用いて Real time PCR 法で、候補遺伝子の発現を調べる。

② 候補遺伝子タンパクを認識する抗体を用いて膵癌症例の FFPE 組織切片における発現を免疫組織化学的に解析する。

### (3) 候補遺伝子の機能解析

① 候補遺伝子の cDNA を NBRC より入手して、レンチウイルスシステム (Invitrogen) を用いて候補遺伝子発現ウイルスを作製する。

② 候補遺伝子の発現が低下・消失している 8p 欠失細胞株にウイルスを感染させて、候補遺伝子の発現を確認後、細胞増殖能 (MTS アッセイ, Promega)、Apoptosis 制御能 (ヒストン/DNA 断片 複合体検出 ELISA キット, Promega)、細胞周期解析 (FACSCalibur, BD)、浸潤能 (マトリゲルインベージョンチャンバー, BD) の変動を調べる。候補遺伝子を発現している細胞株には siRNA を導入して、発現抑制後、同様の機能解析を行う。

③ ②で発現変化に伴い細胞形質の変動が認められた候補遺伝子については、免疫不全マウスに細胞を移植して in vivo における機能解析を行う。

以上の解析結果に基づき癌抑制遺伝子を同定する。

#### (4) 癌抑制遺伝子のシグナル伝達機構の解明と、新規の診断法・治療法の開発への応用

① 癌抑制遺伝子を膀胱癌細胞株に導入して網羅的発現解析を行い、導入によって発現が変動する遺伝子を調べる。解析結果をパスウェイ解析データベース (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity Systems) に連携して、導入した癌抑制遺伝子が担うシグナル伝達機構の概要を得る。

② このシグナル伝達機構を構成する分子の中で、臨床検体 (尿液や血液、膀胱生検組織等) 中に含まれる腫瘍細胞成分で実際に発現が変動している分子を探索し、診断あるいは治療の標的分子候補とする。

### 4. 研究成果

#### (1) 膀胱癌細胞株の網羅的発現解析 と候補遺伝子の抽出

膀胱癌細胞株 12 株の網羅的発現解析を行い、8p11.22-ter の欠失がある 8 株とない 4 株の間で発現プロファイルの比較をした。その結果、欠失がある細胞株で発現が有意に低下している 8p11.22-ter 上に存在する遺伝子を 9 個抽出した。次に、Real time PCR 法でアレイ解析の結果を検証したところ、抽出された 9 個の遺伝子はいずれも 8p11.22-ter の欠失細胞株で発現抑制されていることが確認できた。

#### (2) 膀胱癌組織における候補遺伝子の発現動態の確認

膀胱癌細胞株の発現解析で抽出された 9 個の遺伝子が実際の膀胱癌検体でも発現抑制されていることを調べるために免疫組織化学を施行した。9 個の遺伝子のうち免疫組織化学に適応可能な抗体が入手できたのは 2 遺伝子のみであったが、いずれもアレイ解析の結果

と矛盾しないタンパクレベルでの発現変動の所見を得ることができた。現在、残りの遺伝子についても免疫組織化学に使用可能な抗体の購入や作製を進めており、入手次第、解析を行う予定である。

#### (3) 候補遺伝子の機能解析

癌抑制遺伝子候補として抽出された 9 個の遺伝子が本当に膀胱癌細胞で癌抑制遺伝子として機能しているかを調べた。まず 9 個の遺伝子を膀胱癌細胞株で発現回復させるために、それぞれの遺伝子を導入したレンチウイルスを作製した。各々のウイルスを感染した細胞で目的の遺伝子産物が RNA レベルおよびタンパクレベルで産生されていることを確認後、以下の項目について検討した。

##### ① 増殖能

8p11.22-ter の欠失により 9 個すべての候補遺伝子の発現が低下している膀胱癌細胞株に、9 種類のレンチウイルスをそれぞれ感染させて一過性に遺伝子発現を回復させ、増殖能への影響をみた。9 個の候補遺伝子のうち 3 個の遺伝子において、発現回復により細胞増殖は有意に抑制された。同様の結果は、8p11.22-ter が欠失しているその他の膀胱癌細胞株でも確認された。

##### ② アポトーシス誘導能

増殖抑制能を有する 3 遺伝子について増殖抑制の機序としてアポトーシス誘導が関わっているかを調べた。いずれの遺伝子もその発現回復にて膀胱癌細胞にアポトーシスを誘導しなかった。

##### ③ 細胞周期

増殖抑制に関わる 3 個の遺伝子のうち最も増殖抑制能が顕著であった遺伝子 X に注目して、細胞周期への影響をみた。遺伝子 X の発現回復により、膀胱癌細胞は G1 期に止まる細胞が増えたことから、G1 期停止によって細胞増殖が抑制されることが分かった。

##### ④ 浸潤能

9 種類のレンチウイルスを感染させて、マトリゲルインベージョンチャンバーを用いて増殖能への影響をみた。9 個の候補遺伝子のうち 1 個の遺伝子において、発現回復により浸潤能は抑制された。現在、検証実験を試みているところである。

#### (4) 癌抑制遺伝子のシグナル伝達機構の解明と、新規の診断法・治療法の開発への応用

##### ① シグナルパスウェイの解明

一過性に遺伝子 X 発現を回復させた細胞で、どのような遺伝子の発現変動が生じているのかを、網羅的発現解析により調べた。その結果、G1 期の細胞増殖停止に関わる遺伝子およびその関連遺伝子の発現が変動していることが分かった。現在、リン酸化タンパクア

レイを用いて、タンパク活性化のパスウェイを半網羅的に解析しているところである。

## ② ノックアウトマウスの作製

今回同定した遺伝子が、膵癌の癌抑制遺伝子として機能することを遺伝学的に証明するためにノックアウトマウスの作製を試みている。既に膵癌を自然発症するモデルとして活性化型変異 Kras 遺伝子を膵臓特異的に発現するマウスが知られている。このマウスにおいて、同定した増殖抑制遺伝子を欠失させると、膵癌の発生・進展が亢進することが予想される。現在、ターゲティングジーンを作製し、ES 細胞の樹立を進めているところである。

## 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 11 件)

- ① Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M. Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. PLoS One. 査読有 2013;8(2):e56165. doi: 10.1371/journal.pone.0056165.
- ② Matsuo M, Nakada C, Tsukamoto Y, Noguchi T, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Moriyama M. MiR-29c is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell proliferation by targeting RCC2. Mol Cancer. 査読有 2013 Feb 25;12(1):15.
- ③ Yamada Y, Mori H, Hijiya N, Matsumoto S, Takaji R, Kiyonaga M, Ohta M, Kitano S, Moriyama M, Takaki H, Fukuzawa K, Yonemasu H. Extrahepatic bile duct cancer: invasion of the posterior hepatic plexuses--evaluation using multidetector CT. Radiology. 査読有 2012 May;263(2):419-28. doi: 10.1148/radiol.12111024.
- ④ Matsuura K, Nakada C, Mashio M, Narimatsu T, Yoshimoto T, Tanigawa M, Tsukamoto Y, Hijiya N, Takeuchi I, Nomura T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M. Downregulation of SAV1 plays a role in pathogenesis of high-grade clear cell renal cell carcinoma. BMC Cancer. 査読有 2011 Dec 20;11:523. doi: 10.1186/1471-2407-11-523.
- ⑤ Inoue T, Matsuura K, Yoshimoto T, Nguyen LT, Tsukamoto Y, Nakada C, Hijiya N, Narimatsu T, Nomura T, Sato F, Nagashima Y, Kashima K, Hatakeyama S, Ohyama C, Numakura K, Habuchi T, Nakagawa M, Seto M, Mimata H, Moriyama M. Genomic profiling of renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease. Cancer Sci. 査読有 2012 Mar;103(3):569-76. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02176.x.
- ⑥ Matsumoto S, Mori H, Kiyonaga M, Sai M, Yamada Y, Hijiya N, Shibata K, Ohta M, Kitano S, Takaki H, Fukuzawa K, Yonemasu H. "Peripancreatic strands appearance" in pancreatic body and tail carcinoma: evaluation by multi-detector CT with pathological correlation. Abdom Imaging. 査読有 2012 Aug;37(4):602-8. doi: 10.1007/s00261-011-9803-0.
- ⑦ Kuroda A, Tsukamoto Y, Nguyen LT, Noguchi T, Takeuchi I, Uchida M, Uchida T, Hijiya N, Nakada C, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Matsuura K, Seto M, Ito H, Fujioka T, Moriyama M. Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. PLoS One. 査読有 2011;6(7):e22313. doi: 10.1371/journal.pone.0022313.
- ⑧ Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M. Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 $\alpha$ , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. J Pathol. 査読有 2011 Jun;224(2):280-8. doi: 10.1002/path.2860.
- ⑨ Yamada Y, Mori H, Hijiya N, Matsumoto S, Takaji R, Ohta M, Kitano S, Moriyama M. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas complicated with intraductal hemorrhage, perforation, and fistula formation: CT and MR imaging findings with pathologic correlation. Abdom Imaging. 査読有 2012 Feb;37(1):100-9. doi: 10.1007/s00261-011-9723-z.
- ⑩ Nakamura K, Tsukamoto Y, Hijiya N, Higuchi Y, Yano S, Yokoyama S, Kumamoto T, Moriyama M. Induction of GNE in myofibers after muscle injury. Pathobiology. 査読有 2010;77(4):191-9. doi: 10.1159/000292652.
- ⑪ Uchida M, Tsukamoto Y, Uchida T,

Ishikawa Y, Nagai T, Hijiya N, Nguyen LT, Nakada C, Kuroda A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Noguchi T, Matsuura K, Tanigawa M, Seto M, Ito H, Fujioka T, Takeuchi I, Moriyama M. Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based comparative genomic hybridization. J Pathol. 査読有 2010 May;221(1):96-105. doi: 10.1002/path.2686.

〔学会発表〕(計9件)

- ① 清永 麻紀, 森 宣, 松本 俊郎, 山田 康成, 高司 亮, 泥谷 直樹, 守山 正胤, 破裂による腹膜炎で発見された膝粘液性嚢胞腫瘍の1例、第48回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2012 9/28-30、長崎
- ② 高司 亮, 山田 康成, 松本 俊郎, 本郷 哲央, 首藤 利英子, 清永 麻紀, 森 宣, 岩下 幸雄, 太田 正之, 北野 正剛, 泥谷 直樹, 守山 正胤, Primary hepatic neuroendocrine carcinoma の1例、第48回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2012 9/28-30、長崎
- ③ 中田 知里, 塚本 善之, 松浦 恵子, グエン・トゥン・ラム, 泥谷 直樹, 内田 智久, 佐藤 文憲, 三股 浩光, 瀬戸 加大, 守山 正胤, 腎淡明細胞癌における miR-210 の過剰発現の意義、第70回日本癌学会総会、2012 9/19-21、札幌
- ④ 成松 隆弘, 松浦 恵子, 泥谷 直樹, 中田 知里, 井上 享, 野村 威雄, 佐藤 文憲, 瀬戸 加大, 三股 浩光, 守山 正胤, 腎淡明細胞癌転移予測因子としての 9p24.1-p13.3 loss の可能性、第70回日本癌学会総会、2012 9/19-21、札幌
- ⑤ 清永 麻紀, 森 宣, 山田 康成, 松本 俊郎, 高司 亮, 泥谷 直樹, 守山 正胤, MDCT による肝外胆管癌の Posterior hepatic plexuses への浸潤評価、第71回日本医学放射線学会学術集会、2012 4/12-15、横浜
- ⑥ 成松 隆弘, 松浦 恵子, 泥谷 直樹, 中田 知里, 井上 享, 野村 威雄, 竹内 一郎, 瀬戸 加大, 佐藤 文憲, 守山 正胤, 三股 浩光、網羅的ゲノム解析による腎癌転移関連遺伝子の同定と解析、第100回日本泌尿器科学会、2012 4/21-24、横浜
- ⑦ 中村 憲一郎, 内田 智久, 木村 成志, 岡崎 敏郎, 迫 祐介, 荒川 竜樹, 泥谷 直樹, 守山 正胤, 熊本 俊秀、血管内リンパ腫2剖検例の臨床病理学的検討、第51回日本神経学会総会、2010 5/20-22、東京

- ⑧ 赤木 智徳, 猪股 雅史, 衛藤 剛, 安田 一弘, 白石 憲男, 泥谷 直樹, 守山 正胤, 北野 正剛、大腸癌のリンパ節転移に關与する責任遺伝子の同定と機能解析、第111回日本外科学会定期学術集会、紙上開催
- ⑨ 高司 亮, 山田 康成, 松本 俊郎, 本郷 哲央, 森 宣, 太田 正之, 北野 正剛, 泥谷 直樹, 守山 正胤, 多発膵管状腺癌の1例、第46回日本医学放射線学会秋季臨床大会、2010 9/18-20、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

泥谷 直樹 (HIJIYA NAOKI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：80305036

### (2) 研究分担者

守山 正胤 (MORIYAMA MASATSUGU)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：90239707